**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GISELE FERNANDA GREGHI

**Avaliação do perfil de expressão gênica de bovinos suplementados com
selênio, vitamina E e óleo de canola: A interação dieta-gene-qualidade da
carne**

Versão corrigida

GISELE FERNANDA GREGHI

Avaliação do perfil de expressão gênica de bovinos suplementados com selênio, vitamina E e óleo de canola: A interação dieta-gene-qualidade da carne

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Saran Netto

Pirassununga
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

G819a Greghi, Gisele Fernanda
Avaliação do perfil de expressão gênica de bovinos
suplementados com selênio, vitamina E e óleo de canola:
a interação dieta-gene-qualidade da carne / Gisele
Fernanda Greghi. -- Pirassununga, 2014.
165 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Arlindo Saran Netto.

1. Antioxidantes 2. Colesterol 3. Lipídios.
I. Título.

GREGHI, G. F. Avaliação do perfil de expressão gênica de bovinos suplementados com selênio, vitamina E e óleo de canola: A interação dieta-gene-qualidade da carne.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Com imenso amor e gratidão
Aos meus pais José e Tata,
Às minhas irmãs Fabiana e Gislaine,
À minha sobrinha Gabriela*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder vida, saúde e determinação para buscar na fé e no amor a construção do bem e da sabedoria dia após dia.

A Nossa Senhora de Aparecida, minha Santinha protetora que me rege e ilumina.

Aos meus pais por não pouparem esforços para a realização dos sonhos de suas três filhas, por sempre buscarem oferecer a nós três o melhor, por acreditarem nas nossas escolhas, por nos incentivarem e nos ensinarem a crer em Deus acima de tudo. Admiro vocês pela determinação, caráter, simplicidade, inteligência e bondade que possuem. Tenho muita sorte em tê-los como modelos para seguir. Meu amor pelos dois é infinito! Estejam certos de que todo meu empenho será a fim de retribuí-los.

Às minhas irmãs pelo companheirismo, pelos conselhos, pelo amor, pelo incentivo sempre. Com toda certeza vocês são responsáveis pela minha formação, pois enquanto nossos pais trabalhavam eram vocês que cuidavam de mim em casa e no colégio, me ajudaram desde pequeninha nas lições de casa. Sinto muita saudade de ter vocês todos os dias comigo!

À minha querida Gabriela por ser a prova da perfeição divina, uma fonte de renovação e de muita alegria para mim.

Ao meu cunhado Henrique, obrigada pelo cuidado, carinho e conselhos valiosos em cada etapa.

Ao meu cunhado Jean Patrick, obrigada pelo interesse em meu projeto e em minha vida acadêmica. Você é um exemplo para mim! Mestre, doutor, pós-doc e pesquisador numa das maiores empresas mundiais da sua área, um exemplo de profissional a ser seguido.

Aos meus cunhados, obrigada por serem para mim os irmãos que sempre sonhei em ter.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, por proporcionar a realização do curso de Mestrado.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Arlindo Saran Netto por prontamente me aceitar como sua orientada e mais uma vez me conceder a oportunidade de aprender. Obrigada por confiar em meu trabalho, por dedicar seu tempo precioso diante de tantas responsabilidades que desempenha em prol da Universidade.

À amiga e pesquisadora Andréia O. Latorre pela co-orientação e pelos ensinamentos. Fiquei extremamente honrada em tê-la me ajudando. Sempre gentil e dedicada despertou em mim profunda admiração pela profissional que é e pela pessoa que representa.

Ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu pelo empenho em me ajudar e orientar inúmeras vezes. Com certeza sua dedicação foi fundamental para que este trabalho fosse realizado. Sem o seu apoio, o qual incluiu espaço físico, material de laboratório e, sobretudo, o seu conhecimento, não teria caminhado até aqui. Sou muito grata por ter me acolhido e ter aceitado ser meu co-orientador quando na verdade seu papel foi muito além.

Ao Prof. Dr. Júlio Balieiro pela orientação com as análises estatísticas, pela dedicação ao projeto, pelo interesse em me ajudar. Obrigada por sua colaboração e por todas as conversas que trocamos, as quais muito me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César, agradeço a atenção e o carinho durante a realização de sua disciplina e por ter me aceito como sua aluna PAE. Obrigada pela orientação durante o preparo das aulas e os bons momentos compartilhados junto aos alunos da Zootecnia.

Aos alunos da Zootecnia, obrigada pelo carinho e participação junto a mim durante a realização do PAE, em especial, à Tati Ninomya por organizar os encontros extras com a turma.

À Profa. Dra. Mônica Roberta Mazalli, obrigada por ter me concedido o prazer de ser sua aluna e ter participado de seu experimento. Admiro seu entusiasmo, alegria e dedicação à pesquisa.

Aos professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos por me concederem a honra de cursar suas disciplinas e aprender assuntos relevantes para minha pesquisa: Prof. Dra. Mariza Pires de Melo, Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti, Prof. Dr. Raul Franzolin Neto.

À Profa. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira por me aceitar na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia como aluna em sua disciplina para pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Flavio Augusto Portela Santos e ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pelos ensinamentos transmitidos durante a realização de suas disciplinas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

À Ester e ao Paulo Cesar Raspantini, obrigada pelo carinho e cordialidade. Obrigada pela ajuda para a realização do experimento, pelos ensinamentos e pelos bons momentos.

À querida Dra. Ligia Mesquita, obrigada por sanar minhas dúvidas e me receber com carinho e dedicar sua atenção a mim e ao meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Fernando Mesquita pela ajuda durante a fase experimental, pela amizade e por nos conceder a alegria de nos tornarmos famílias amigas junto a sua querida esposa Sibeles e seu lindo filho Luís Antônio.

À Thays Mayra Leme por gentilmente receber e armazenar materiais do experimento em seu laboratório, obrigada por sua atenção e cuidado.

À Lisia C. Bertonha por permitir a coleta das amostras dos bovinos confinados durante seu projeto.

A toda a equipe de funcionários do Abatedouro- Escola da Universidade de São Paulo: Elso Carlos Terciotti, Benedito Ap. Rodrigues, Mario Benedito de Oliveira, Dorival D. de Oliveira, Maurício C. de O. Pagotti, Mauricio Ap. Scharlack e Camila Molina.

Aos animais utilizados neste experimento que assim como muitos outros cederam suas vidas para gerar alimentos e contribuíram para pesquisa.

Aos meus cães, Hugo e Meg, pelo amor incondicional, companheirismo e inspiração pela Medicina Veterinária.

Aos funcionários e amigos do Hovet- FMVZ/USP de Pirassununga, mais que especiais, uma família: Dr. Ubiraem Mario Schalch, Dra. Josane Leão Ferraz, Cecília, Rose, Ceila, José Carlos Pacheco, Gerson e Vanderley, Zico, Paulo Roberto, Rosilene, Érika e João.

À Pâmela Alexandre e Arina Rochetti pela ajuda e companheirismo no laboratório, sempre gentis e dispostas a ajudar.

A uma companheira de bancada muito especial, Maria Carolina Rodrigues. Uma pessoa linda em todos os aspectos. Admiro seu amor a Deus e desejo de coração seu sucesso e felicidade.

A todos os pós-graduandos do CEBER, em especial: Ana Paula Silva, Roberta Carvalho, Priscila Levy, Katiéli Welter, Raphael Marques, Delaila Juliana, Andre Palma, Madeline Rezende Mazon, Simone Garcia, Juliana Monteiro Balage, Anderson Cabral e Clayton André Zotti.

A todos os pós-graduandos do ZAB, obrigada pela ótima convivência durante esta etapa de minha vida, em especial, Fernanda Cavallari Castro, Hugo Fernandes, Katia Lancellotti Schwarz, Ramon Cesar Botigelli, Rodrigo Barreto, Maria Helena Coelho Cruz, Fabiane Gilli Zaffalon, Fabiana Bressan, Paulo Fantinato, Pedro Rato Lisboa Pires, Laís Pessoa, Deborah Pedroso, Juliano Rodrigues Sangalli, Rafael Vilar Sampaio, Carol Habermann.

Aos amigos da portaria, obrigada por sempre me receberem com alegria: João Vitor M. do Nascimento, Mayko D. Metzner, Vivaldo de Paula, Ademilson Bagatini, João Paulo Duarte, José Eriberto de Oliveira.

Aos amigos Cynthia Silva, Priscila Boff, Piter Teodoro, Henrique Lopes e Gabriel De Carli, obrigada pelo carinho e apoio. O valor da amizade de vocês é inestimável!

Ao casal amigo Alana Martins e Carlos Bitencourt pela amizade e companheirismo. Alana, sua amizade é uma benção em minha vida! Obrigada por cada gesto de carinho!

À amiga Cristiana Tschorny Moncau pelo companheirismo, conversas, conselhos e apoio, sempre. Mais uma amizade concretizada durante a pós.

Ao amigo Roney Ramos, obrigada pelo seu carinho e atenção. Sou grata a sua amizade, sei o quanto ela é especial, mesmo distantes, sempre me lembro de você com muito carinho e admiração.

À Fernanda Baptistella e André Taneguchi, obrigada pela linda e sincera amizade que juntos construímos.

Aos amigos Andréia, Paulinha, Hélio, Bernadete e Felipe pelo carinho e apoio. Vocês fazem toda a diferença nos meus dias. Se antes de vocês minha família era pequena, agora com vocês ela é do tamanho ideal!

Aos amigos Daniel Oliveira e Jucimara Cardoso, pelo carinho, muitas conversas, bons momentos e incentivo.

A todos os meus amigos que há tanto tempo trabalham comigo e com meus pais, tempo este que nos permitiu a construção de laços de carinho. Obrigada Zildinha, Cristina, Val, Vicente, Celso, Carlos, José Ricardo e Maria.

Muitas pessoas queridas estiveram comigo durante estes dois últimos anos, para minha felicidade, sei que muitas delas continuarão participando dos meus dias. Que Deus permita-me retribuí-las!

Diretriz

*Por dentro de nós,
Consciência em Deus.*

*No lar,
Amor nas leis de Deus.*

*No trabalho,
Servir com Deus.*

*Na rua,
Seguir com Deus.*

*Juntos dos outros,
Lembrar-nos de Deus.*

*Em tudo,
Pensar em Deus.*

Emmanuel

RESUMO

GREGHI, G.F. **Avaliação do perfil de expressão gênica de bovinos suplementados com selênio, vitamina E e óleo de canola: A interação dieta-gene-qualidade da carne.** 2014. 165f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

A produção mundial de carne bovina corresponde a 58,856 milhões de toneladas, das quais 9,92 milhões de toneladas de carne são produzidas pelo Brasil. Com o maior rebanho bovino comercial (aproximadamente 209 milhões de bovinos), nosso país ocupa posição de destaque no mercado da carne bovina: 1º em exportação (2,03 milhões de toneladas) e 2º em produção e consumo (40 kg/habitante/ano). Ao longo dos anos a produção de carne bovina aumentou, assim como as críticas no campo da saúde humana devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados e a possível, mas ainda questionável relação com doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Por estas razões uma série de pesquisas tem sido realizada na tentativa de alterar a composição do perfil de ácidos graxos da carne, o que consequentemente afeta sua estabilidade oxidativa. Para avaliar a influência de componentes específicos da dieta sobre as respostas do organismo e seus efeitos sobre a produção e a qualidade de carne, tem se avaliado a expressão individual de genes, ou seja, tem se utilizado a transcriptômica. A partir do uso desta ferramenta, o presente estudo avaliou a interação entre a suplementação com selênio, vitamina E e/ou óleo de canola e a expressão de genes-chave na regulação das vias antioxidante, lipogênica e colesterolêmica na espécie bovina. Bovinos Nelore (n=48) não castrados, peso inicial ± 350 kg, alocados em *calan gate* nas dependências do Departamento de Zootecnia da FZEA-USP Pirassununga, SP foram divididos em 4 grupos: Controle (**C**): dieta base; (**Se + Vit E**): 2,5 mg de Se e 500 UI de vitamina E /kg de MS; (**Canola**): adição de 3% de óleo de canola/kg de MS; (**Se + Vit E + Canola**): adição de 2,5mg de Se, 500 UI de vitamina E e 3% de óleo de canola /kg de MS. Ao final de 12 semanas, foram abatidos (peso final ± 456 kg) e amostras de fígado, músculo *L. dorsi* e tecido adiposo subcutâneo coletadas para análise da expressão gênica de *NFE2L2*, *GPX1*, *GPX4*, *GSR*, *GCLG*, *GSS*, *SREBF1*, *PPARA*, *SCD*, *HMGCR*, *ACAT1*, *ACAT2* e *LCAT*. Os dados foram analisados pelo PROC MIXED SAS (2005), as médias foram comparadas por meio de contrastes avaliados pelo teste t de Student e a correlação entre as expressões gênicas hepáticas foram estimadas por meio do coeficiente de correlação de Pearson. O tecido hepático foi mais sensível às mudanças na taxa

de transcrição de mRNA. Os animais que receberam a suplementação com Se junto a Vitamina E apresentaram maior expressão de genes citoprotetores (*NFE2L2*, $P \leq 0,05$; *GPX1*, $P \leq 0,08$; *GPX4*, $P \leq 0,03$; *GSS*, $P \leq 0,06$), lipogênico (*SCD*, $P \leq 0,06$) e colesterolêmico (*HMGCR*, $P \leq 0,06$) em relação aos que receberam o óleo de canola. Estes, por sua vez, apresentaram maior quantidade de mRNA para *LCAT* ($P \leq 0,05$) em relação aos que receberam suplementação com antioxidantes. As expressões gênicas de *SREBF1* (lipogênico; $P \leq 0,03$) e *ACAT1* (colesterolêmico; $P \leq 0,08$) foram maiores para os animais que receberam estes antioxidantes associados ao óleo de canola em comparação aos que receberam tais nutrientes de forma segregada. Os resultados estimulam estudos com estes antioxidantes e fontes de ácidos graxos poli-insaturados como o óleo de canola diante do potencial destes, seja para a qualidade da carne, seja para uso terapêutico na saúde animal ou do homem. Contudo, é necessário cautela, pois estes antioxidantes podem tanto induzir genes citoprotetores, quanto genes lipogênicos e colesterolêmicos e, a maneira pela qual tal ativação ocorre sugere a participação do *NFE2L2*.

Palavras-chave: ácidos graxos, antioxidantes, colesterol, lipídios, *NFE2L2*, nutrição.

ABSTRACT

GREGHI, G.F. **Evaluation of gene expression profile in cattle supplemented with selenium, vitamin E and canola oil: The interaction diet-gene-meat quality.** 2014. 165f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

World beef production corresponds to 58.856 million tons, of which 9.92 million tons of meat are produced by Brazil. With the largest commercial cattle herd (approximately 209 million animals), our country occupies a prominent position in the beef market: 1st in exports (2.03 million tons) and 2nd in production and consumption (40 kg / capita /year). Over the years, beef production increased, as critical in the field of human health due to its high content of saturated fatty acids and a possible but still questionable relationship with cardiovascular disease, diabetes and cancer. For these reasons a lot of research has been conducted in an attempt to change the composition of the meat fatty acids, which consequently affects the oxidative stability of the meat. To evaluate the influence of specific dietary components on the responses of the body and its effects on the production and quality of meat, has evaluated the expression of individual genes, or has used transcriptomics. From the use of this tool, the present study evaluated the interaction between supplementation with selenium, vitamin E and/or canola oil and the expression of key genes in the regulation of antioxidant, lipogenic and cholesterolemic pathways in cattle. Nelore (n= 48) uncastrated, initial weight $\pm$ 350kg, allocated in calan gate in the Department of Animal Science, FZEA Pirassununga-USP, SP were divided into 4 groups: **Control (C)**: basic diet; **(Se + Vit E)**: 2.5 mg Se and 500 IU vitamin E/kg DM; **(Canola)**: addition of 3% canola/kg of DM oil; **(Se + Vit E + Canola)**: adding 2.5 mg Se, 500 IU vitamin E and 3% canola/kg of DM oil. After 12 weeks, they were slaughtered (final weight $\pm$ 456 kg) and samples of liver, *L. dorsi* muscle and subcutaneous adipose tissue collected for analysis of gene expression of *NFE2L2*, *GPX1*, *GPX4*, *GSR*, *GCLG*, *GSS*, *SREBF1*, *PPARA*, *SCD*, *HMGCR*, *ACAT1*, *ACAT2* and *LCAT*. Data were analyzed using PROC MIXED (SAS 2005), the means were compared by contrasts evaluated by Student's t test and the correlation between hepatic gene expression were estimated using the Pearson correlation coefficient. The liver tissue was more sensitive to changes in the rate of transcription of mRNA. Animals that received supplementation with Vitamin E and Se had higher expression of cytoprotective genes (*NFE2L2*, $P \leq 0.05$; *GPX1*, $P \leq 0.08$; *GPX4*, $P \leq 0.03$;

GSS, $P \leq 0.06$), lipogenic (*SCD*, $P \leq 0.06$) and cholesterolemic (*HMGCR*, $P \leq 0.06$) compared to those receiving canola oil. These, in turn, showed a higher amount of mRNA for LCAT ($P \leq 0.05$) than those who received supplementation with antioxidants. The gene expressions of *SREBF1* (lipogenic, $P \leq 0.03$) and *ACAT1* (cholesterolemic, $P \leq 0.08$) were higher for animals receiving these antioxidants associated with canola oil compared to those which received these nutrients isolated. These results stimulate more studies about antioxidants and polyunsaturated fatty acids such as canola oil because of their potential either for the quality of the meat, either for therapeutic use in animal or human health. However, caution is needed because these antioxidants can both induce cytoprotective genes, as well as lipogenic and cholesterolemic genes, and the way this activation occurs suggests the involvement of *NFE2L2*.

Keywords: antioxidants, cholesterol, fatty acids, lipids, *NFE2L2*, nutrition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção mundial de carne bovina.....	38
Figura 2- Evolução do abate de bovinos no terceiro trimestre - Brasil - Trimestres 2008-2013.....	39
Figura 3- Visão geral do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos e a origem de CLA.....	43
Figura 4- Esquema do metabolismo do selênio em mamíferos.....	47
Figura 5- Estrutura química da vitamina E.....	49
Figura 6- Óleo de Canola- ácidos graxos (%).....	52
Figura 7- Integração da nutrigenômica à pesquisa em nutrição animal.....	55
Figura 8- Sequência das “ômicas”.....	55
Figura 9- Via de sinalização NFE2L2-ARE.....	58
Figura 10- Modelo regulatório proposto para o papel do NFE2L2 na homeostase lipídica hepática.....	59
Figura 11- Ciclo oxidação-redução da glutathiona.....	60
Figura 12- Genes regulados pela isoforma SREBF1.....	64
Figura 13- Ativação de SREBP e sua migração para o núcleo.....	65
Figura 14- Mecanismo de ativação dos PPARs.....	67
Figura 15- A síntese de MUFAs por SCD e a síntese hepática de éster de colesterol e triacilgliceróis.....	69
Figura 16- a) Animais alocados em lotes, b) mas com alimentação individual.....	75
Figura 17- a) Vista diafragmática do fígado; b) local da coleta da amostra do fígado em uma das carcaças do experimento.....	78
Figura 18- a) Localização anatômica do músculo <i>L. dorsi</i> ; b) local da coleta da amostra (9º EIC) em uma das carcaças do experimento.....	78
Figura 19- a) Corte das amostras de músculo e gordura; b) Acondicionamento das amostras de tecido adiposo para posterior imersão em nitrogênio líquido....	79
Figura 20- Esquema das etapas de extração de RNA de amostras de tecido hepático....	81
Figura 21- Esquema das etapas de extração de RNA de amostras de tecido muscular e adiposo.....	82
Figura 22- a) Preparo do tampão de corrida para eletroforese- TAE; b) Gel de agarose 0,8% em corrida.....	83

Figura 23- Amostras de RNA total extraído do músculo <i>L. dorsi</i> após eletroforese em gel de agarose a 0,8% com visualização das bandas 18S e 28S.....	84
Figura 24- a e b): Cálculo da eficiência dos genes <i>18S</i> e <i>NFE2L2</i> baseado no <i>slope</i> ; c): Diferença de Ct dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos.....	87
Figura 25- Quantificação relativa da expressão gênica para o <i>NFE2L2</i> em a) Tecido hepático ($^{\#}P\leq 0,05$) e b) Tecido muscular.....	94
Figura 26- Quantificação relativa da expressão dos genes antioxidantes. a) <i>GPX1</i> em tecido hepático ($^{##}P\leq 0,08$); b) <i>GPX1</i> em tecido muscular; c) <i>GPX4</i> em tecido hepático ($^{*}P\leq 0,03$); d) <i>GPX4</i> em tecido muscular ($^{**}P\leq 0,06$); e) <i>GSR</i> em tecido hepático; f) <i>GCLC</i> em tecido hepático e g) <i>GSS</i> em tecido hepático ($^{**}P\leq 0,06$).....	95
Figura 27- Quantificação relativa da expressão dos genes lipogênicos. a) <i>SREBF1</i> em tecido hepático ($^{*}P\leq 0,03$); b) <i>SREBF1</i> em tecido muscular; c) <i>SREBF1</i> em tecido adiposo; d) <i>PPARA</i> em tecido hepático; e) <i>SCD</i> em tecido hepático ($^{**}P\leq 0,06$) e f) <i>SCD</i> em tecido adiposo.....	96
Figura 28- Quantificação relativa da expressão dos genes colesterolêmicos. a) <i>HMGCR</i> em tecido hepático ($^{**}P\leq 0,06$); b) <i>HMGCR</i> em tecido adiposo; c) <i>ACAT1</i> em tecido hepático ($^{##}P\leq 0,08$); d) <i>ACAT2</i> em tecido hepático e e) <i>LCAT</i> em tecido adiposo ($^{\#}P\leq 0,05$).....	97
Figura 29- Correlação entre EG <i>NFE2L2</i> vs.: a) <i>GPX1</i> , b) <i>GPX4</i> , c) <i>GSR</i> , d) <i>GCLC</i> , e) <i>GSS</i> , f) <i>SREBF1</i> , g) <i>PPARA</i> , h) <i>SCD</i> , i) <i>HMGCR</i> , j) <i>ACAT1</i> , l) <i>ACAT2</i> , m) <i>LCAT</i>	99
Figura 30- Correlação entre EG <i>SREBF1</i> vs.: a) <i>SCD</i> , b) <i>HMGCR</i> , c) <i>ACAT1</i> , d) <i>ACAT2</i> , e) <i>LCAT</i>	100
Figura 31- Correlação entre EG <i>PPARA</i> vs.: a) <i>SCD</i> , b) <i>HMGCR</i> , c) <i>ACAT1</i> , d) <i>ACAT2</i> , e) <i>LCAT</i>	101
Figura 32- Modelo proposto para a interação dieta-gene observada nos bovinos suplementados com Se e vitamina E e/ou óleo de canola no presente estudo.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais alterações moleculares e metabólicas observadas em ratos <i>knockout</i> para <i>SREBF1</i> por Liang et al., (2002).....	65
Tabela 2- Peso e ganho de peso médio (kg) dos animais segundo os grupos no período do experimento.....	76
Tabela 3- Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca).....	76
Tabela 4- <i>Primers</i> Taqman® Gene Expression Assays usados para a realização da técnica de PCR em tempo real.....	85
Tabela 5- Equação de regressão (y) e R^2 das reações de amplificação para cada gene-tecido e suas respectivas eficiências (%)......	86
Tabela 6- Condições da termociclagem utilizada para a técnica de PCR-RT.....	88
Tabela 7- Análise das amplificações (Ct) do gene referência <i>18S</i> pelo programa Bestkeeper.....	91
Tabela 8- Análise das amplificações (Ct) dos genes-alvo pelo programa Bestkeeper..	92
Tabela 9- Quantificação relativa da expressão gênica.....	93
Tabela 10- Valores dos coeficientes de correlação entre <i>NFE2L2</i> e demais genes estudados.....	98
Tabela 11- Valores dos coeficientes de correlação entre <i>SREBF1</i> e genes lipogênicos e colesterolêmicos.....	100
Tabela 12- Valores dos coeficientes de correlação entre <i>PPARA</i> e genes lipogênicos e	

colesterolêmicos.....	101
-----------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ACAT	Acil-CoA-colesterol aciltransferase
AG	Ácido graxo
ALA	Ácido alfa-linoleico
AP	Aparelho de Golgi
ARE	Elemento responsivo a esterol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
cDNA	DNA complementar
CHO	Carboidrato
CLA	Ácido linoleico conjugado
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CV	Coefficiente de variação
DEPC	Dietílico dicarbonato
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DHA	Ácido docosaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPA	Ácido docosapentaenóico
E	Eficiência
EC	Éster de colesterol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIC	Espaço intercostal
eNOS	Óxido nítrico endotelial
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FAS	Ácido graxo sintase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCL	Glutamato cisteína ligase
GCLC	Glutamato cisteína ligase subunidade catalítica
GCLM	Glutamato cisteína ligase subunidade modificadora
GPAT	Microsomal glicerol fosfato aciltransferase
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSR	Glutathione reductase
GSS	Glutathione sintetase
GSSG	Glutathione oxidada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HHE	4-hidroxihexenal
HMGCR	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

HPRT	Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
HNE	4-hidroxinonenal
HepG2	Linhagem celular humana de hepatoma
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>L. dorsi</i>	<i>Longissimus dorsi</i>
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Molar
Máx	Máximo
Média A	Média aritmética
Média G	Média geométrica
Min	Mínimo
mRNA	RNA mensageiro
MS	Matéria seca
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
N	Amostra
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NIID	Normalmente identicamente independentemente distribuído
NFE2L2	Fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2
nSREBP	Forma madura de SREBP
PCAPS	Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga
PCR-RT	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
PO	Por via oral
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PPRE	Elemento de resposta hormonal ao proliferador de peroxissomo
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
PUFA-BP	Proteína de ligação a PUFA
PUFA-RE	Elemento responsivo a PUFA
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RXR	Receptor X do ácido retinóico
SCAP	Proteína de escolta de SREBP
SCD	Estearoil-CoA desaturase ou delta-9-desaturase
Se	Selênio
SHO	Receptou nuclear órfão
SISP	Sistema de Inspeção Estadual
S1P/S2P	Protease sítio1 e sítio 2
SREBP	Proteína responsiva ao elemento esterol
TAE	Tris-acetato- EDTA
TAG	Triacilglicerol
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultra-violeta

Vit E

Vitamina E

VLDL

Lipoproteína de muito baixa densidade

Vs.

Versus

LISTA DE UNIDADES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
R\$	Real
US\$	Dólar
Bp	Par de base
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol
h	Gramma
h	Hora
kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
ppm	Partes por milhão
s	Segundo
UI	Unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	33
3 HIPÓTESES E OBJETIVO.....	36
3.1 Hipóteses.....	36
3.2 Objetivo.....	36
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	38
4.1 Produção mundial de carne bovina.....	38
4.2 Produção brasileira de carne bovina.....	39
4.3 Características que afetam a qualidade da carne.....	40
4.3.1 Ácidos graxos na carne bovina.....	41
4.3.1.1 A síntese de CLA e a importância para a saúde.....	42
4.3.2 Estabilidade oxidativa da carne.....	45
4.4 Os nutrientes.....	46
4.4.1 Selênio (Se).....	46
4.4.2 Vitamina E.....	48
4.4.3 Óleo de canola	52
4.5 Nutrigenômica.....	54
4.5.1 Transcriptômica.....	56
4.6 Os genes e seus produtos.....	56
4.6.1 Fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (<i>NFE2L2</i>).....	56
4.6.2 Genes antioxidantes.....	59
4.6.2.1 Glutathione Peroxidase (<i>GPX</i>) e Glutathione redutase (<i>GSR</i>).....	59
4.6.2.2 Glutathione, Glutamato cisteína ligase catalítica (<i>GCLC</i>) e Glutathione sintetase (<i>GSS</i>).....	62
4.6.3 Genes lipogênicos.....	63
4.6.3.1 Proteína de ligação responsiva ao elemento esteroide (<i>SREBF1: sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>).....	63
4.6.3.2 Receptor ativado por proliferador de peroxissomo-alfa (<i>PPARA</i>).....	66

4.6.3.3 Delta-9-desaturase ou estearoil-CoA-desaturase (<i>SCD</i>).....	68
4.6.4 Genes colesterolêmicos.....	70
4.6.4.1 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (<i>HMGCR</i>).....	70
4.6.4.2 Acil-CoA-colesterol aciltransferase (<i>ACAT</i>).....	71
4.6.4.3 Lecitina-colesterol aciltransferase (<i>LACT</i>).....	73
5 MATERIAL E MÉTODOS	75
5.1 Local da realização do experimento.....	75
5.2 Animais e Instalações.....	75
5.3 Dietas Experimentais.....	76
5.4 Abate.....	77
5.5 Procedimento analítico.....	79
5.5.1 Extração de RNA	79
5.5.1.1 Extração de RNA de tecido hepático.....	79
5.5.1.2 Extração de RNA de tecido muscular e adiposo.....	81
5.5.2 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total extraído dos tecidos hepático, muscular e adiposo	83
5.5.3 Protocolos adotados para as etapas de DNase e conversão de RNA para cDNA.....	84
5.5.4 Análise da expressão gênica relativa pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT).....	84
5.5.5 Quantificação relativa da expressão gênica.....	88
5.6 Análise Estatística.....	89
6 RESULTADOS	91
6.1 Amplificações dos genes de referência e genes-alvo	91
6.2 Quantificação relativa da expressão gênica.....	92
6.3 Coeficientes de correlação entre expressões gênicas.....	98
7 DISCUSSÃO	103
7.1. Amplificações dos genes de referência e genes-alvo.....	103
7.2 Quantificação relativa da expressão gênica.....	104
7.2.1 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>NFE2L2</i>	104

7.2.2 Quantificação relativa da expressão dos genes antioxidantes	107
7.2.2.1 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>GPX1</i> e <i>GPX4</i>	107
7.2.2.2 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>GSR</i>	110
7.2.2.3 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>GCLC</i> e <i>GSS</i>	111
7.2.3 Quantificação relativa da expressão dos genes lipogênicos.....	112
7.2.3.1 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>SREBF1</i>	112
7.2.3.2 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>PPARA</i>	114
7.2.3.3 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>SCD</i>	116
7.2.4 Quantificação relativa da expressão dos genes colesterolêmicos.....	119
7.2.4.1 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>HMGCR</i>	119
7.2.4.2 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>ACAT1</i> e <i>ACAT2</i>	121
7.2.4.3 Quantificação relativa da expressão gênica de <i>LCAT</i>	122
 8 CONCLUSÃO	 125
 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 127
 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 130
 11 ANEXO	 164

1 INTRODUÇÃO

O consumidor está cada vez mais consciente da relação existente entre dieta e saúde, o que o faz no momento da compra optar por alimentos mais nutritivos, mais seguros, isentos de conservantes e/ou aditivos não naturais, com baixo teor de gordura e com um perfil lipídico que valorize ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Em resumo, o consumidor deseja alimentos com componentes funcionais que desempenhem papéis importantes na manutenção da saúde e na prevenção de doenças.

Para a carne bovina, grande atenção é dada aos lipídios, busca-se por: aumento no teor de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série n-3 e do ácido linoleico conjugado (CLA); redução no teor de ácidos graxos saturados.

Contudo, maior participação de ácidos graxos insaturados na composição da carne pode prejudicar a vida de prateleira e, conseqüentemente, os atributos sensoriais da carne, assim como gerar compostos prejudiciais à saúde decorrentes da lipoperoxidação, entre eles, os malonaldeídos. Com a finalidade de evitá-los, é feito o uso de antioxidantes para estabilizar os efeitos da incorporação de ácidos graxos de cadeia longa insaturados e, portanto, mais suscetíveis à oxidação e geração de radicais livres. Entre os antioxidantes mais usados em alimentos estão o selênio e a vitamina E.

Entre as estratégias estudadas para melhorar o valor nutricional e, ao mesmo tempo a estabilidade oxidativa da carne, está a suplementação dos animais com diferentes minerais e suplementos alimentares naturais.

A suplementação dos animais como forma de enriquecer o produto final- o alimento- seja ele a carne, o leite ou os ovos, têm duas grandes vantagens. Primeira vantagem, os animais recebem os nutrientes e beneficiam-se destes durante a metabolização e distribuição destes por seus tecidos; segunda, a suplementação torna-se mais segura para o homem, pois garante um alimento enriquecido de forma natural e com quantidade tolerável para humanos (BOU et al., 2009).

A conversão metabólica dos componentes da dieta é mecanismo de controle para a expressão gênica (GONÇALVES et al., 2009), a partir da suplementação dos animais podemos influenciar sua produtividade, saúde e até mesmo a composição dos alimentos de origem animal.

Para entender a maneira como a alimentação pode alterar a expressão de genes, estudos têm sido realizados no campo da nutrigenômica, a qual tem como objetivo primordial estudar as influências da nutrição sobre o genoma.

No organismo animal, um dos mais importantes sistemas de defesa contra o aumento de radicais livres é o sistema enzimático regido pelas glutathionas peroxidase (GPX) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A produção de glutathionas, assim como a detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e xenobióticos está relacionada ao fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NFE2L2), o regulador mestre da resposta antioxidante (HYBERTSON et al., 2011) e um dos motivos pelos quais tem sido um dos fatores de transcrição mais estudados.

Muitos destes estudos demonstraram os antioxidantes, por exemplo, selênio e vitamina E, como potentes ativadores do *NFE2L2* (NUMAKAWA et al., 2006; FENG et al., 2009; DWORSKI et al., 2011; BRIGELOUS-FLOHÉ et al., 2012; NITURE et al., 2014).

Huang et al. (2010) propuseram um modelo molecular no qual o *NFE2L2* é também um ativador transcricional de genes críticos do metabolismo lipídico como o *SREBF1* (*sterol regulatory element binding transcription fator 1*), o qual codifica a proteína responsiva ao elemento esterol (SREBP).

Formas maduras de SREBPs migram do retículo endoplasmático para o núcleo e ativam a transcrição do gene *HMGCR*, gene relacionado à síntese de colesterol.

As SREBPs são também fatores de transcrição para o gene da enzima delta-9-desaturase (*SCD*) (KEATING et al., 2005), gene este responsável pela síntese endógena de ácido linoleico conjugado (CLA) (NTAMBI, 1999).

Renaville et al., Sampath e Ntambi (2006) relataram que a expressão do gene *SCD* é também regulada por outro fator, o receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPARA).

O PPARA, presente primariamente no fígado, possui de 3.000 a 4.000 genes-alvo envolvidos em numerosos processos metabólicos hepáticos, incluindo oxidação de ácidos graxos, cetogênese, gluconeogênese, metabolismo de aminoácidos, proliferação celular e resposta de fase aguda (MANDARD et al., 2004).

O estudo da interação nutriente-gene é complexo. Cada nutriente pode ter numerosos genes-alvo com afinidade e especificidade diferentes, até mesmo a partir da regulação de apenas um único fator de transcrição nuclear que afetará centenas a milhares de genes. Ainda, as vias de sinalização ativadas por estes nutrientes podem estar sobrepostas, sendo seus efeitos de ativação ou inibição.

Entretanto, a identificação de nutrientes capazes de interferir em genes de vias antioxidante, lipogênica e colesterolêmica contribuirá para a qualidade da carne, pois estes

genes influenciam no valor nutritivo, na estabilidade oxidativa e no perfil lipídico do alimento.

Com novos estudos e o entendimento da interação entre os genes e a dieta, estes nutrientes poderão representar componentes bioativos na proteção do organismo, no melhoramento do desempenho zootécnico, padrão sanitário, qualidade da carne e saúde do consumidor.

2 JUSTIFICATIVA

Em 2050 a população mundial atingirá a marca dos 9 bilhões de pessoas. Caso este aumento se confirme, até a metade do século a produção de alimentos precisará crescer 70% (FAO, 2014). Portanto, maximizar a produção de alimentos é imprescindível para evitar a escassez de comida para a população. Entre os sistemas de produção pecuários, o da carne necessitará responder com 470 milhões de toneladas ao ano, o que corresponde a mais que o dobro da produção atual (MAPA, 2012). Tal aumento na demanda poderá ser um ótimo mercado para o nosso país, que ocupa o primeiro lugar na exportação e segundo lugar na produção e consumo (USDA, 2014), além de possuir o maior rebanho comercial bovino do mundo, o qual é formado por principalmente por animais zebuínos (80%), dos quais 90% são Nelore (ABIEC, 2014).

Entretanto, a carne bovina assim como outros alimento de origem animal ricos em ácidos graxos saturados, ácidos graxos da série n-6 e colesterol, tem seu consumo relacionado a doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2011) tais doenças são responsáveis por 31%, 13% e 2% das causas de morte no mundo, respectivamente. Ainda, a previsão desta organização é de que, em 2030, 23,6 milhões de pessoas morram em decorrência de doenças cardiovasculares. Embora a associação entre o consumo de carne e a ocorrência de tais doenças seja inconclusivo (BERTOLAMI, 2012), muitos médicos, nutricionistas e a própria mídia referem-se à ingestão de carne vermelha como uma grande vilã para a saúde humana.

Com o auxílio *da* nutrigenômica poderemos determinar com precisão a suplementação necessária de nutrientes ideais como antioxidantes e ácidos graxos essenciais na produção de bovinos confinados contribuindo para o valor nutricional da carne, de forma a torná-la mais saudável e benéfica a saúde do consumidor humano, pois a carne bovina trata-se de um importante alimento rico em diversos nutrientes como o ferro, vitaminas do complexo B, zinco e proteínas que são de 95% até 100% digeríveis pelo corpo humano.

Alguns nutrientes já foram identificados como agentes protetores do organismo contra enfermidades que ameaçam a população. Entre eles estão o selênio, vitamina E e ácido linoleico conjugado (CLA), o qual é encontrado em maior teor em alimentos proveniente dos ruminantes, tais quais como a carne e o leite.

Com novos estudos e o entendimento da interação entre os genes e a nutrição, poderemos encontrar maneiras de aumentar a participação destes nutrientes na composição da

carne bovina, enriquecendo-a com componentes bioativos na proteção do organismo e contribuindo para a qualidade do alimento e a qualidade de vida do homem.

3 HIPÓTESES E OBJETIVO

3 HIPÓTESES E OBJETIVO

3.1 Hipóteses

A dieta suplementada com selênio associado a vitamina E e/ou óleo de canola altera a expressão de genes das vias antioxidante, lipogênica e colesterolêmica de bovinos Nelores confinados.

A suplementação com selênio e vitamina E induz a expressão de genes antioxidantes.

A suplementação com óleo de canola ativa a expressão do gene responsável pela síntese de CLA (*SCD*) e inibe a expressão do gene que codifica a enzima limitante para a síntese do colesterol (*HMGCR*).

A suplementação com selênio, vitamina E e óleo de canola é sinérgico aos efeitos da suplementação com antioxidantes (selênio e vitamina E) aos efeitos da suplementação com óleo de canola.

3.2 Objetivo

Avaliar os efeitos da dieta suplementada com selênio associado a vitamina E e/ou óleo de canola sobre a expressão de genes das vias antioxidante, lipogênica e colesterolêmica de bovinos Nelore confinados.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Produção mundial de carne bovina

A produção mundial de carne bovina, segundo o relatório divulgado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em abril de 2014, corresponde a 58,856 milhões de toneladas.

Neste cenário, o lugar de maior produtor mundial de carne bovina é ocupado pelos Estados Unidos com produção de 11,23 milhões de toneladas de carne, ou seja, quase 20% da produção mundial. Em segundo lugar está o Brasil com 9,92 milhões de toneladas de carne, seguido pela União Europeia (7,58 milhões de toneladas), China (5,76 milhões de toneladas) e Índia (4 milhões de toneladas) (Figura 1).

Figura 1- Produção mundial de carne bovina. Fonte: USDA, 2014

O consumo de carne bovina também é maior entre os norte-americanos (11,172 milhões de toneladas), seguido pelos brasileiros (7,925 milhões de toneladas), europeus (7,720 milhões de toneladas) e chineses (6,263 milhões de toneladas) (USDA, 2014).

Já a exportação deste setor é liderada pelo Brasil (2,03 milhões de toneladas), seguido pela Índia (1,875 milhões de toneladas), Austrália (1,56 milhões de toneladas) e Estados Unidos (1,14 milhões de toneladas) (USDA, 2014).

A perspectiva para o mercado da carne bovina é de crescimento: entre 2009 e 2014 houve alta de 2,2%, entre novembro de 2013 e abril de 2014 foi registrado um novo aumento na produção correspondente a 0,4%. Segundo o USDA (2014) o mercado mundial de carne bovina crescerá ainda mais nos próximos anos.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014), a demanda global por produtos pecuários aumentará, sendo necessário que a produção seja elevada em 70% até 2050, ano para o qual a população é estimada em 9,6 bilhões de habitantes.

4.2 Produção brasileira de carne bovina

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2014), o Brasil detém o maior rebanho bovino comercial, o qual é formado por aproximadamente 209 milhões de bovinos. Cerca de 80% destes animais são de raças zebuínas (*Bos indicus*), que são animais de comprovada rusticidade e adaptação ao ambiente predominante no Brasil. Dentre estas raças, a Nelore corresponde a 90% desta parcela.

O Brasil ocupa posição de destaque no mercado da carne bovina: 2º em produção e consumo (40 kg/habitante/ano), 1º em exportação (USDA, 2014).

De acordo com os dados publicados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014), a produção de carne bovina brasileira corresponde a 9,92 milhões de toneladas. Em 1994, a produção brasileira era de 5,481 milhões de toneladas, ou seja, nos últimos 20 anos a produção brasileira cresceu cerca de 80%.

De acordo com o último relatório publicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no 3º trimestre de 2013, o abate de bovinos no Brasil atingiu pela segunda vez consecutiva novo recorde histórico na série trimestral, com a marca de 8,913 milhões de cabeças abatidas. O 3º trimestre de 2013 também foi o oitavo trimestre consecutivo em que se observou aumento da quantidade de bovinos abatidos, confirmando o bom desempenho da bovinocultura brasileira (Figura 2).

Figura 2- Evolução do abate de bovinos no terceiro trimestre - Brasil - Trimestres 2008-2013. Fonte: IBGE, 2014

Segundo o indicador ESALQ/BM&F Bovespa, o preço médio da arroba bovina de julho a setembro de 2013 foi de R\$ 104,95, variando de R\$ 100,44 a R\$ 110,80. No mesmo período do ano anterior, o preço médio foi de R\$ 93,24, variando de R\$ 88,71 a R\$ 97,21 a arroba, representando aumento médio anual de 12,57% (IBGE, 2014).

Quanto à participação brasileira nas exportações de carne bovina, o USDA (2014) revelou que esta é responsável por cerca de 20% do total de exportação (Brasil: 2,03 milhões de toneladas exportadas).

Segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior, o desempenho das exportações brasileiras de carne bovina no 3º trimestre de 2013 foi superior aos obtidos no trimestre anterior e no mesmo período de 2012, tanto em volume quanto em faturamento (US\$ 1.483,609 milhões). Observou-se que o aumento do faturamento ocorreu em função do aumento da quantidade de carne bovina *in natura* exportada, haja vista que o preço médio da tonelada no 3º trimestre de 2013 recuou 4,4% e 1,7% frente ao mesmo período do ano anterior e o 2º trimestre de 2013, respectivamente (IBGE, 2014).

Os dez principais países importadores da carne bovina *in natura* do Brasil no 3º trimestre de 2013, respondendo juntos por 87,3% das importações, foram: Rússia (26,4%), Hong Kong (18,1%), Egito (13,6%), Venezuela (11,0%), Chile (6,2%), Irã (4,0%), Argélia (2,3%), Itália (2,2%), Holanda (1,9%) e Filipinas (1,6%).

4.3 Características da qualidade da carne

Ao longo dos anos a carne tem recebido críticas no campo da saúde humana devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados, pois o consumo destes pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares. Contrariamente, os PUFA, geralmente encontrados em baixas concentrações na carne, especialmente os da série n-3, podem ser benéficos à saúde (MAC-RAE et al., 2004).

Por estas razões uma série de pesquisas tem sido realizadas na tentativa de alterar a composição do perfil de ácidos graxos da carne, sobretudo por meio da suplementação dos animais com alimentos ricos em PUFA, particularmente com óleos vegetais. Tal dieta pode alterar a composição da carne e prover ingredientes que afetam a estabilidade oxidativa (vida de prateleira) e o *flavour* da carne (WOOD et al., 1999).

4.3.1 Ácidos graxos na carne bovina

Os lipídios da carne bovina são na grande maioria triacilgliceróis (80 a 90%), até 20% fosfolipídios e menos de 3% ésteres de colesterol e ácidos graxos não esterificados. No tecido adiposo, é maior a presença de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e menor de fosfolipídios, os quais, por sua vez, são os que apresentam maiores teores de ácidos graxos insaturados (MEDEIROS, 2002).

À medida que a carcaça apresenta maior teor de gordura, maior também é a participação de tecido adiposo intramuscular e de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, havendo uma correlação positiva entre o grau de marmoreio da carne e o teor de C14:0, C16:0, C18:1 em amostras de músculo *Longissimus lumborum* (KAZALA et al., 2006).

A composição dos ácidos graxos depositados nos tecidos bovinos tem duas origens: a síntese *de novo* no tecido adiposo e a incorporação dos ácidos graxos presentes na circulação sanguínea, provenientes da dieta.

Os ácidos graxos provenientes da dieta sofrem influência do processo de biohidrogenação ruminal, a qual diminui a quantidade de ácidos graxos insaturados absorvidos no intestino (CHURCH, 1988).

A composição da gordura na carcaça bovina depende da dieta do animal, sendo possível a modificação do perfil de ácidos graxos por estratégias de alimentação com suplementação de PUFA's. Porém, a composição lipídica da carne pode ser afetada por diferentes fatores: músculo amostrado, tempo de consumo de ácidos graxos n-3, quantidade consumida diariamente, fonte de lipídio da dieta, proteção contra a biohidrogenação.

Por intermédio da nutrição animal tem se buscado diminuir os teores de ácidos graxos saturados e colesterol e priorizar de ácidos graxos insaturados, em especial, o ácido linoleico conjugado (CLA) (BAUMAN; GRINARI, 2001), contribuindo assim, para a possibilidade de planejamento da composição da carne de acordo com a necessidade e demanda pelo consumidor (GAMA, 2004).

Segundo Araújo (2008), o termo “ácido linoleico conjugado” refere-se a um grupo de isômeros do ácido octadecadienóico (C18:2). As duplas ligações no CLA são conjugadas e não separadas por grupos metileno (-CH₂-), formando um sistema conjugado 9-11, 10-12 e 11-13. Em razão da biohidrogenação ruminal, o leite e a carne são os alimentos que apresentam os maiores teores de CLA, sendo que na carne este teor pode variar de 1,2 a 5,6 mg/g de gordura.

4.3.1.1 A síntese de CLA e importância para a saúde

Os alimentos compostos por lipídios são hidrolisados pela ação de microrganismos ao chegarem no rúmen. Tais microrganismos transformam os lipídios em ácidos graxos, glicerol ou outros compostos (CHURCH,1988). Após serem hidrolisados, os ácidos graxos são submetidos ao processo de isomerização e biohidrogenação ainda no rúmen, aumentando o grau de saturação destes e consequentemente sua absorção pelas células do intestino delgado (BARROS, 2001).

Um grande número de espécies de bactérias do rúmen produz CLA a partir da biohidrogenação do ácido linoleico e linolênico por meio de enzimas específicas. Estas bactérias podem ser divididas em dois grupos: bactérias do grupo (A) hidrogenam, principalmente, ácidos linoleico e linolênico formando ácido trans-11 octadecenóico ou ácido vacênico (C18:1 trans-11), além de menores quantidades de outros isômeros de posição e estereoisômeros do mesmo ácido e bactérias do grupo (B) que são capazes de hidrogenar uma ampla variedade de ácidos octadecenóicos formando ácido esteárico (C18:0) (PARIZA et al., 1990).

Ou seja, os CLAs são intermediários do processo de biohidrogenação ruminal. Inicialmente foi proposto que a principal origem dos CLAs seria como intermediário da biohidrogenação do ácido linoleico (C18:2) por meio da ação de bactérias gram-negativas e anaeróbicas *Butyrvibrio fibrisolvens*. O isômero cis 9-trans11 pode ser absorvido ou biohidrogenado para ácido vacênico (C 18:1, ácido octadecenóico trans 11). Após a absorção, este ácido pode ser convertido a CLA cis 9-trans 11 pela enzima estearoil-CoA desaturase ou delta-9-desaturase (SCD) (BAUMGARD, 2000).

O ácido linoleico pode ser convertido em CLA trans 10- cis 12 através da ação da bactéria *Propionibacter*. A carne bovina pode conter CLA trans 10- cis 12, tanto quanto ácido trans 10 octadecenóico. Por analogia à formação do ácido trans-11 octadecenóico na via de biohidrogenação de CLA cis 9- trans11; o ácido trans10 octadecenóico também pode formar CLA trans 10- cis 12 por biohidrogenação do ácido linoleico no rúmen (VERHULST et al., 1987).

Outros estudos mostraram que o aumento de ácido linolênico também aumentava o teor de CLA, mesmo a biohidrogenação deste não produzindo CLA. Descobriu-se que a explicação para esta discrepância estava na síntese de uma enzima, particularmente, pelo fígado, tecido adiposo e glândula mamária, a delta-9-desaturase (SCD). Esta enzima mostrou

O atual enfoque do mercado aos produtos de origem animal tem sido direcionado à busca de alimentos ricos em CLAs caracterizados como alimentos funcionais (SILVA et al., 2006). Além de sua contribuição energética, dependendo de sua composição em ácidos graxos, a gordura de origem animal potencialmente está envolvida na saúde humana por ser mais digestível e por atuar na prevenção de distúrbios cardiovasculares, apresentar efeitos antiteratogênicos e anti-inflamatórios (CHILLIARD et al., 2003).

Estima-se que uma pessoa de 70 kg deve consumir 3 g de CLA/dia, pois estes têm demonstrado propriedades anticarcinogênicas e antioxidantes em experimentação animal. Dos vários isômeros de CLAs, o cis 9-trans 11 tem sido considerado o mais ativo biologicamente, em razão de ser o isômero preferencialmente incorporado aos fosfolipídios da membrana, ou seja, diferentemente dos outros tipos, são incorporados diretamente aos fosfolipídios e oferecem um mecanismo adicional de defesa contra os radicais livres. Adicionalmente, os CLAs contribuem para a redução do colesterol e alteram a relação LDL/HDL em modelos animais experimentais, contudo por mecanismos ainda não muito bem esclarecidos (ARAÚJO, 2008).

Pariza e Há (1990) identificaram o CLA cis 9-trans 11 como um potente anticarcinogênico natural, enquanto o trans 10-cis 12 foi identificado como um eficaz agente “repartidor de nutriente” capaz de redirecionar o destino dos nutrientes consumidos entre a síntese de gordura e a síntese de proteína. Essa ação faz com que uma maior proporção dos nutrientes seja redirecionada para a síntese de proteína, o que permite reduzir o teor de gordura no leite e na carne (McGUIRE et al., 1997; PARK et al., 1997).

Estudos mostraram que a suplementação com CLA modula uma gama de biomarcadores que sugerem tanto um decréscimo na proliferação celular, como um aumento da apoptose (IP et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados por Whale et al. (2004) usando linhagens celulares de glândula mamária e próstata. Neste estudo foram utilizadas misturas de CLA e o uso dos isômeros cis 9-trans 11 e trans 10-cis 12 separadamente, evidenciaram efeitos em mecanismos de sinalização celular associados com inibição de gênese de tumores e proliferação celular que incluem: indução do redox de enzimas, atenuação da ativação do fator de transcrição induzida pela citoquinona, ativação de isoformas de proteínas C quinase específicas envolvidas em eventos proliferativos ou apoptóticos, modulação da produção de eicosanóides (da expressão gênica à formação do produto). Portanto, é evidente a existência da interação nutriente-gene para os efeitos anticancerígenos deste ácido graxo, mas o mecanismo exato da ação anticarcinogênica do CLA ainda não é bem compreendido.

Em 2001, Ip et al. afirmaram que a ação anticarcinogênica do CLA era atribuída a sua ação antioxidante. No mesmo ano, Igarashi e Miyazawa trabalhando com linhagens celulares humanas de hepatoma (HepG2) verificaram que a proliferação celular foi inibida na presença de CLA quando comparados a células controle após 72 horas. Para medir se o efeito inibitório do CLA no crescimento celular era originado da peroxidação lipídica, as células foram incubadas em um meio que continham antioxidantes como α -tocoferol e BHT. Entretanto, a adição destes antioxidantes, no meio com CLA, não reverteu a inibição do crescimento induzido pelo CLA sugerindo que o efeito inibitório do crescimento nestas células é causado por mudanças não conhecidas no metabolismo dos ácidos graxos, pois o conteúdo de lipídios e ácidos graxos claramente aumentou nas células suplementadas com CLA comparadas às células controle.

Os CLAs também são capazes de influenciar na composição corporal de animais e do homem, sendo o isômero trans 10-cis 12 o principal contribuinte para a redução no conteúdo de gordura corporal. Existem vários mecanismos propostos para tal efeito, entre eles: diminuição da esterificação de ácidos graxos em triacilgliceróis (EVANS et al., 2002), interferência do isômero no programa de diferenciação dos adipócitos e diminuição da lipogênese (OSTROWSKA et al., 1999), e aumento da lipólise (PARK et al., 1997).

O aumento do consumo CLA e PUFA n-3 pelo homem é fortemente recomendado por nutricionistas (MAC-RAE et al., 2004), sendo a carne naturalmente enriquecida por estes uma boa fonte regular desses ácidos graxos importantes e alternativa aos caros suplementos nutricionais (WATERS et al., 2008).

4.3.2 Estabilidade oxidativa da carne

A carne bovina além de proteínas é fonte de vitaminas e minerais como, por exemplo, o selênio (CHAN et al., 1995). Estes elementos são importantes para a saúde, pois são necessários para o normal funcionamento do organismo uma vez que enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (GPX) necessitam destes como cofatores ou integrantes de suas moléculas para a proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (GUTTERIDGE, 1995).

Da mesma forma, estes elementos influenciam na qualidade da carne, não só em seu valor nutritivo, mas também em sua vida de prateleira (DECKER; XU, 1998).

A oxidação lipídica é a principal causa da deterioração da qualidade da carne e afeta diretamente muitas das suas características: valor nutritivo, cor, sabor, textura e segurança

(BOU et al., 2009). Além disso, a oxidação de lipídios gera produtos tóxicos ao organismo com perigosos efeitos biológicos relacionados a doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (COHN, 2002; ESTERBAUER et al., 2001; SCHROEPFER, 2002).

A susceptibilidade da carne à oxidação lipídica depende de inúmeros fatores, dentre eles o nível de ácidos graxos poli-insaturados presentes no músculo (ALLEN; FOEGEDING, 1981).

4.4 Os nutrientes

Do ponto de vista molecular, os nutrientes são "moléculas de sinalização" capazes de resultar na mudança da expressão de genes, proteínas e metabolismo (MULLER; KERSTEN, 2003).

4.4.1 Selênio (Se)

O selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius, mas só quase um século e meio depois, em 1957, foi reconhecida sua essencialidade na saúde animal (McDOWELL, 1992).

O estudo pioneiro de Schwarz e Foltz, no final da década de 50, identificou o papel protetor do selênio ao evitar a necrose hepática em ratos (SCHWARZ; FOLTZ, 1957 *apud* McDOWELL, 1992).

Em 1973, descobriu-se que ele fazia parte do sítio ativo da enzima glutathione peroxidase (FLOHE et al., 1973).

Em 1974, Omaye & Tappel encontraram relação semilogarítmica entre a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX) em diversos tecidos de frangos e a quantidade de selênio da dieta. Desde então, esta é a função mais importante do selênio nos vertebrados e a atividade da glutathione peroxidase (GPX) é considerada um dos melhores indícios do "status" de selênio e de sua utilização.

A deficiência de Se induz a baixa atividade da GPX, deixando a célula exposta à ação nociva das espécies reativas de oxigênio (EROs), o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

No metabolismo do selênio em mamíferos, os metabólitos de selênio provenientes da alimentação entram na célula e se juntam ao *pool* já existente. O metabolismo ocorre por

diferentes vias gerando selenito, o qual é utilizado como fonte de selênio para a síntese de selenocisteína, precursora das selenoproteínas (Figura 4).

Figura 4- Esquema do metabolismo do selênio em mamíferos. Fonte: Cominetti et al. (2011), adaptada pela autora

O selênio exerce suas funções por meio das selenoproteínas, sendo que aproximadamente metade das selenoproteínas já caracterizadas apresenta função antioxidante e, dentre os diferentes grupos, o mais numeroso é o da GPX (COMINETTI et al. 2011).

Os processos celulares que necessitam da presença de selenoproteínas incluem a biossíntese de dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) para o DNA, a remoção de peróxidos que promovem danos às células, a redução de proteínas ou lipídios oxidados, a regulação da sinalização redox, o metabolismo dos hormônios tireoidianos, o transporte e o armazenamento do selênio e possivelmente o dobramento de algumas proteínas (PAPP et al., 2007).

Portanto, a deficiência de selênio acarreta na oxidação dos tecidos e ocorrência de doenças.

Além disso, sabe-se da sua importância na modulação da resposta imune e a suplementação com Se já demonstrou efeito protetor/ quimiopreventivo contra o câncer (SURAI, 2006).

A identificação do papel do selênio em enzimas antioxidantes (FLOHE et al., 1973) e seu possível efeito sobre alguns tipos de câncer (RAYMAN, 2008; MICKE et al., 2009;

BROZMANOVÁ et al., 2010) tem estimulado o seu consumo na forma de suplementos provenientes de diferentes fontes em todo o mundo (RAYMAN 2008; SONI et al., 2010).

O potencial terapêutico do uso de selênio ainda não foi suficientemente explorado, mas acredita-se que essa classe de nutriente seja promissora como agente farmacológico (NOGUEIRA; ROCHA, 2011).

A suplementação de animais de produção com Se contribui para a melhoria da saúde animal e da qualidade dos alimentos, devido ao seu papel antioxidante, sobretudo diante do metabolismo dos lipídios, prevenindo a formação de compostos de oxidação, os quais podem comprometer a vida de prateleira e as propriedades organolépticas e, uma vez ingeridos, serem prejudiciais à saúde humana (ARAÚJO, 2008).

Para bovinos de corte a exigência de selênio é de aproximadamente 0,1% da MS da dieta, segundo o NRC (1996).

O fornecimento de Se para bovinos de corte além de melhorar a atividade de GPX, contribui para aumentar o consumo de Se pelo homem em áreas deficientes deste mineral (JUNIPER et al., 2008).

Segundo Combs Jr. (2001), entre 500 milhões e 1 bilhão de pessoas no mundo têm deficiência deste oligoelemento essencial.

No Brasil, Maihara et al. (2004) verificaram que a ingestão diária de selênio entre universitários e idosos do Estado de São Paulo está abaixo das exigências (55µg de Se/dia/adulto segundo o *Institute of Medicine*, 2000).

4.4.2 Vitamina E

A vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop na Universidade da Califórnia. Primeiramente, ela foi chamada de fator “X” até que em 1925 Sure e Evans propuseram o nome atual, respeitando a ordem alfabética. Devido às descobertas dos primeiros experimentos ao longo da década de 20, a vitamina E ficou conhecida pela sua importância na reprodução, pois sua deficiência havia causado degeneração testicular em cobaias (McDOWELL, 1989).

Ao longo dos anos, tornou-se reconhecida como nutriente essencial para o crescimento e saúde dos animais, que a estocam no fígado e no tecido adiposo, além de ser encontrada em quantidades variáveis nos demais tecidos (LIU et al., 1995).

O termo "vitamina E" refere-se a uma família de 8 homólogos que são sintetizados pelas plantas a partir do ácido homogentísico. Todos derivados do 6-cromanol com diferença no número e posição de grupos metil na estrutura do anel.

Os quatro homólogos tocoferol (alfa, beta, gama e sigma) têm uma cadeia lateral de 16 carbonos saturados, ao passo que os homólogos de tocotrienóis (alfa, beta, gama e sigma) têm três ligações duplas na cadeia lateral (ARAÚJO, 2008) (Figura 5).

Figura 5- Estrutura química da vitamina E. Fonte: Araújo, 2008

A vitamina E é exemplo de antioxidante fenólico. Tais moléculas prontamente doam o hidrogênio do grupo hidroxila (-OH) da estrutura em anel aos radicais livres. Ao doar o hidrogênio, o composto fenólico em si torna-se um radical livre relativamente não reativo, porque o elétron não emparelhado no átomo de oxigênio é geralmente rearranjado sobre a estrutura de anel aromático, aumentando assim a sua estabilidade (SCOTT, 1997).

Localizada principalmente dentro da bicamada fosfolipídica das membranas celulares, a concentração da vitamina E pode ser de apenas uma molécula a cada 2000 moléculas fosfolipídicas, uma vez que, após a sua reação com radicais livres, ela é rapidamente regenerada por outros antioxidantes (KAGAN, 1998).

Entre os antioxidantes que participam da reciclagem da vitamina E está a glutathione, sob a forma reduzida (GSH):

Do ponto de vista nutricional, a forma mais importante de vitamina E é α-tocoferol, pois a atividade antioxidante é da seguinte ordem: alfa>beta>gama>sigma (ARAÚJO, 2008).

Os radicais livres são neutralizados pelo α-tocoferol antes que a oxidação se propague entre os ácidos graxos altamente insaturados nas membranas celulares e subcelulares. O anel

cromanol do α -tocoferol é colocado entre os grupos dos fosfolipídios e a cadeia lateral fitol interage com as cadeias de ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios por meio de interações de *Van der Waals* no interior da membrana (BUCKLEY et al., 1995). O produto de oxidação primária de α -tocoferol é uma α -tocoferilquinona e em seguida a hidroquinona é excretada na bile ou degradada nos rins.

A localização específica do α -tocoferol na membrana e a mobilidade lateral desta molécula permitem maior proteção de ácidos graxos poli-insaturados altamente susceptíveis à peroxidação por espécies reativas de oxigênio, produzidas pelas enzimas ligadas às membranas adjacentes (McDOWELL et al., 1996).

Estudos com bovinos há anos vem constatando importantes benefícios do uso da suplementação dietética de vitamina E. Sua propriedade antioxidante tem demonstrado:

- auxiliar a atividade fagocitária de macrófagos e neutrófilos (BADWEY; KARNOVSKY, 1980);
- proteger contra a toxicidade de metais pesados (WHANGER, 1981);
- controlar a mastite (SMITH; CONRAD, 1987);
- fortalecer a resistência às infecções virais (BECK et al., 1994);
- manter a estabilidade oxidativa e preservar a cor e o sabor da carne (LIU et al., 1995);
- aumentar a maciez da carne (ROWE et al., 2004);
- contribuir para o acúmulo de ácidos graxos n-3 no tecido muscular (JUÁREZ et al., 2011);
- prevenir o aparecimento de doenças infecciosas em bezerros (KRUEGER et al., 2014).

Assim como para bovinos, os estudos com suplementação de vitamina E em humanos têm mostrado resultados favoráveis. Em 1983, Steinberg e colaboradores, demonstraram que o consumo crescente de vitamina E inibiu a progressão da doença vascular por meio da prevenção da oxidação de LDL. Dez anos depois, estudos epidemiológicos evidenciaram que a vitamina E da dieta influenciava o risco de aparecimento de doença cardiovascular. Nos Estados Unidos, tanto o *Nurses Health Study* envolvendo 87.000 mulheres (STAMPLER et al., 1993) quanto o *Health Professionals Follow-up Study* com 40.000 homens (RIMM et al., 1993) concluíram que pessoas que tomavam suplementos com ≥ 100 mg/dia de vitamina E, por pelo menos 2 anos, tiveram incidência $\approx 40\%$ menor de infarto do miocárdio e mortalidade cardiovascular do que aqueles que não usaram suplementos.

A suplementação de vitamina E para humanos pode ser apropriada terapeuticamente para moderar alguns aspectos de doenças degenerativas tais como a doença de Parkinson, reduzir a gravidade das doenças neurológicas, reduzir a lesão no tecido resultante de isquemia e reperfusão durante cirurgias, atrasar o desenvolvimento de cataratas e melhorar a mobilidade de doentes com artrite (KIM et al., 2010; RODRIGO et al., 2013).

De acordo com Bellizzi et al. (1994), cerca de metade do α -tocoferol em uma dieta típica do norte europeu, como no Reino Unido, é derivado de óleos vegetais. Gorduras animais, vegetais e carnes contribuem com cerca de 10%; frutas, cereais e produtos lácteos contribuem com cerca de 4% e menos de 2% são obtidos de ovos, peixes e legumes.

A variação do consumo de vitamina E pode ser atribuída principalmente ao tipo e quantidade de óleos alimentares usados em diferentes países e da proporção dos homólogos diferentes nos óleos. Por exemplo, o óleo de semente de soja contém 121,4 mg de α -tocoferol/kg de óleo, o óleo de oliva 140,5 e o de canola 183,9. O consumo destes óleos varia muito entre os países. No Brasil, prevalece na população o consumo do óleo de soja (89% segundo PHILLIP, 2008), o qual é rico em σ -tocoferol (225,7 mg/kg de óleo) que é a forma menos ativa biologicamente (GUINAZ et al., 2009).

O Grupo de Trabalho do *Nutrition International Life Sciences Institute* da Europa (1990) sugeriu a ingestão diária de 12 mg de α -tocoferol para o consumo diário de 14 g de PUFA's a fim de compensar o consumo elevado de óleo de soja, em certos países, onde mais de 50% de vitamina E no consumo é contabilizado pela forma sigma.

Outra forma de incrementar o consumo humano de vitamina E, seria a partir de alimentos enriquecidos com tal vitamina. A carne pode ser um destes alimentos.

De fato, Lynch et al. (1999) observaram que bovinos suplementados com vitamina E apresentaram maior teor de α -tocoferol na carne e no leite.

Para bovinos de corte nas fases de crescimento e engorda a exigência de vitamina E é de 15-60 UI/kg de MS (NRC, 1996).

Quanto a sua toxicidade, parece ser muito baixa. Em humanos, há evidências de danos pela sua ação pró-oxidante se consumida em doses muito altas, acima de 1000 mg/dia (BROWN et al., 1997).

Os sinais de deficiência de vitamina E estão relacionados com a presença de danos em membranas celulares e extravasamento do conteúdo da célula. Distúrbios provocados, por exemplo, por vestígios de PUFA's peroxidados nas dietas dos animais com baixas concentrações de vitamina E são miopatias cardíacas ou do esqueleto, neuropatias e necrose do fígado (McLAREN et al., 1993). Segundo os mesmos autores, os primeiros sinais para o

diagnóstico desta deficiência incluem o extravasamento de enzimas musculares tais como a creatina quinase e piruvato quinase no plasma, o aumento dos níveis dos produtos de peroxidação de lipídios no plasma e aumento da hemólise de eritrócitos.

A deficiência de vitamina E em bovinos caracteriza-se por lesão distrófica nos músculos e é denominada “doença do músculo branco” (VALBERG; HODGSON, 2006).

4.4.3 Óleo de canola

O termo canola, derivado de “CANadian Oil Low Acid”, foi registrado por uma empresa canadense, a Western Canadian Crushers Associations, nos anos 80 para designar o produto advindo do melhoramento genético da colza desenvolvido a fim de diminuir sua toxicidade, reduzindo para menos de 2% o ácido erúico e o de máximo 30 micromoles de glucosinolatos por grama de matéria seca. Com o passar dos anos a palavra canola tornou-se um termo genérico e não mais um termo canadense, nem somente uma marca com registro industrial (NOLLI, 2012).

Segundo a tabela TACO (2011), em 100 gramas de óleo de canola há 7,9 g de ácidos graxos saturados; 28,4 g de poli-insaturados e 62,6 g de monoinsaturados (Figura 6).

Figura 6- Óleo de Canola- ácidos graxos (%). Fonte: Tabela TACO, 2011

Segundo Furuya et al. (1997), o óleo de canola apresenta aproximadamente 10% de ácido linolênico (C18:3 n-3), 22% de ácido linoleico (C18:2 n-6) e 58% de ácido oleico (C18:1 n-9).

O óleo de canola é considerado um alimento saudável, pois apresenta elevada quantidade de ácidos graxos da família ômega-3, vitamina E (17,1 mg/100 g) e o menor teor

de gordura saturada de todos os óleos vegetais. Ainda, ele contém n-6 e n-3 na proporção 2:1 e é considerado o óleo mais rico em n-3 depois do óleo de linhaça (*FOODS INGREDIENTS BRASIL*, 2010).

Segundo Fallon e Enig (2002), o óleo de canola é um dos mais saudáveis para o coração e há registro na literatura de que reduz os teores de colesterol, triacilglicerol e mantém as plaquetas saudáveis.

O enriquecimento de alimentos de origem animal com ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) tem despertado grande interesse da indústria alimentícia, contribuindo para o aparecimento no mercado brasileiro de alimentos que visam conquistar a parcela da população preocupada em ingerir dietas mais saudáveis, pois estes estão associados à redução de doenças cardiovasculares, neoplasias, colite ulcerativa, podendo também proteger pacientes com lesões pré-neoplásicas de cólon (HUI, 1996).

De acordo com estudos de Simopoulos et al. (1999) e Fagundes (2002), as doenças degenerativas como diabetes, artrite e câncer, estão relacionadas em parte à desproporção atual da concentração dos ácidos ômega-6 e ômega-3 que constituem nossa alimentação, ou seja, grande concentração de ômega-6 e escassez de ômega-3. Assim, é consenso científico de que é necessário reduzir a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 das dietas e aumentar a concentração de ácidos ômega-3.

Os humanos e os animais carnívoros podem converter o ácido α -linoleico (ALA, n-3) em: ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5, n-3), docosapentaenóico (DPA, C22:5, n-3) e docosaenóico (DHA, C22:6, n-3); o ácido linoleico em ácido araquidônico (AA, C20:4, n-6). Ainda que seja reconhecida a competição entre as famílias n-3 e n-6, pelas mesmas enzimas de desaturação (delta-6-desaturase), estas preferem os ácidos ômega-3 em relação aos ômegas-6 (FAGUNDES, 2002).

Os ácidos graxos ômega-3 são antitrombóticos, antiarrítmicos, pouco pró-inflamatórios, reduzem os lipídios do sangue e têm propriedades vasodilatadoras. Esses efeitos benéficos foram demonstrados na prevenção de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes tipo 2 e artrite reumatoide, entre outras (FAGUNDES, 2002).

A família ômega-6 produz eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando o risco de situações como: neoplasias malignas, morte súbita, cardiopatias, vasoconstrição, hipertensão arterial sanguínea, elevação da taxa de triglicerídeos e artrite, entre outras doenças inflamatórias (FAGUNDES, 2002).

Por intermédio da nutrição animal é possível alterar a composição da carne no que diz respeito à concentração de ácidos graxos (GAMA, 2004). O aumento da concentração de CLAs nos produtos de origem animal pode ser obtido por dietas que visem o aumento do próprio CLA no rúmen como também de seu precursor para síntese endógena, o ácido vacênico (BAUMAN; LOCK, 2006). Altos teores de ácido linoleico inibem irreversivelmente a hidrogenação de ácido vacênico (octadecenóico trans-11), aumentando a quantidade de substrato para a síntese endógena do CLA cis 9-trans 11 (HARFOOT, 1973).

Estudos relataram a possibilidade de modificações no perfil de ácidos graxos da carne pela suplementação da dieta com fontes lipídicas a base de óleos, sebos e gorduras (KITESSA et al., 2001; PALMQUIST, 2001, SANTOS et al., 2007).

Segundo Grummer (1992) e Jenkins (1993), o processo de biohidrogenização foi menos intenso quando foram usados suplementos de gordura altamente insaturada no rúmen, como óleo vegetal, o que acarretou em maior participação de PUFAs no leite e na carne.

No entanto, há limitação nas informações sobre os efeitos da suplementação com lipídios na dieta animal, em particular, quanto aos efeitos de óleos de plantas em dietas de gado de corte sobre a delta-9-desaturase, o ácido vacênico e CLA (PAVAN; DUCKETT, 2007).

4.5 Nutrigenômica

A Nutrigenômica é o estudo da interação dos componentes da dieta com o genoma e das alterações resultantes na expressão gênica, na estrutura e função das proteínas e em outros metabólitos (SUBBIAN, 2008).

Na produção animal, pesquisas na área da nutrigenômica têm investigado a interação nutriente-gene e os efeitos desta relação sobre a produção, a qualidade de carne-leite-ovos, a reprodução, a manifestação de doenças e as respostas imunológicas, entre outras respostas do organismo (GHORMADE et al., 2011) (Figura 7).

Figura 7- Integração da nutrigenômica à pesquisa em nutrição animal. Fonte: Ghormade et al. (2011), adaptada pela autora

Sob este aspecto, a nutrigenômica promete ser importante aliada para a produção animal, principalmente para sistemas intensivistas, nos quais a alimentação contribui com parcela significativa para a melhoria do desempenho zootécnico, bem como para a rentabilidade econômica.

Para estudar o efeito dos componentes dietéticos sobre o genoma, a nutrigenômica faz uso de modernas ferramentas de pesquisas conhecidas como tecnologias "ômicas": a transcriptômica (estudo da expressão gênica global ao nível de mRNA); a proteômica (estudo de todas as proteínas de uma célula em particular, tecido ou compartimento) e a metabolômica (a etapa final na compreensão da função dos genes e suas proteínas) (Figura 8).

Figura 8- Sequência das "ômicas". Fonte: Katz-Jaffe et al. (2009), adaptada pela autora

A aplicação de tais "ômicas" permite novos conhecimentos sobre o curso dos processos moleculares no organismo animal e avaliação mais precisa das propriedades biológicas dos alimentos. Entre elas, a transcriptômica tem demonstrado que elementos

orgânicos, minerais e vitaminas são capazes de modificar a transcrição de genes com potencial de alterar as respostas biológicas e metabólicas envolvidas com o crescimento e a diferenciação celular (AFAMN; MULLER, 2006).

4.5.1 Transcriptômica

Para compreender a relação entre genoma e funcionamento das células, os cientistas têm procurado estudar os produtos do genoma, ou seja, RNA e proteínas.

O produto inicial da expressão do genoma é o transcriptoma, um conjunto de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) derivadas dos genes que codificarão proteínas cuja função biológica será exigida pela célula em um determinado momento (GHORMADE et al., 2011).

Assim, a transcriptômica é o estudo deste conjunto de mRNA presentes nas células de um determinado tecido.

O objetivo do uso desta ferramenta é determinar o nível de expressão de todos os genes ou de um subconjunto de genes selecionados presentes em amostras de tecidos (GHORMADE et al., 2011).

A quantidade de mRNA presente nos tecidos pode ser avaliada indiretamente após ele ter sido extraído e usado para criar uma fita de DNA complementar (cDNA). Já na forma de cDNA, o material pode ser submetido à Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT), uma técnica quantitativa que por meio do monitoramento da fluorescência liberada durante a amplificação do DNA permite avaliar o número de moléculas produzidas a cada ciclo (JOZEFCZUK; ADJAYE, 2011).

Dessa maneira, a transcriptômica pode ser utilizada, por exemplo, para avaliar a influência de componentes específicos da dieta sobre a expressão individual de genes de interesse a um dado estudo.

4.6 Os genes e seus produtos

4.6.1 Fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (*NFE2L2*)

A regulação de fatores de transcrição nucleares é a principal maneira pela qual a nutrição pode alterar a expressão gênica (AFMAN; MULLER, 2006).

O gene *fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NFE2L2)* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 2, contém 10 éxons e 32.515 bp (início:19.659.540 bp, término: 19.692.054 bp) (NCBI, 2014).

O gene *NFE2L2* codifica o fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NCBI, 2014). Este fator de transcrição nuclear controla a expressão e indução coordenada de uma bateria de genes citoprotetores que codificam enzimas de desintoxicação e proteínas antioxidantes. Portanto, desempenha um papel crítico para a proteção e a sobrevivência da célula (KASPAR et al., 2009).

A regulação gênica do *NFE2L2* parece fornecer uma explicação para as conexões entre o estresse oxidativo e cerca de 200 doenças humanas que envolvem vários processos fisiológicos, cada um refletindo em uma rede de produtos de muitos genes (HYBERTSON et al., 2011).

Os estudos com o *NFE2L2* iniciaram-se em 1988 quando Paul Talalay e colaboradores descreveram uma proteína com resíduos cisteína altamente reativa contra a carcinogênese química. Tal fato levou à descoberta de uma elaborada rede proteínas citoprotetoras altamente induzidas e controladas pela via Keap1-NFE2L2 (MARCHAN; BOLT, 2013).

No entanto, ao nível molecular, os mecanismos fisiológicos reguladores envolvidos na ativação de *NFE2L2* não são completamente conhecidos.

De forma simplificada, o modelo proposto para a ação do *NFE2L2* descreve que este se encontra retido no citoplasma por um inibidor, o Keap1. A proteína Keap1 ligada ao filamento de actina age como um sensor de estresse oxidativo e eletrofílico por meio de resíduos de cisteína. Sob condições normais, o Keap1 inibe a transcrição do fator *NFE2L2* e trabalha como um adaptador para a ubiquitinação e degradação proteossomal do *NFE2L2*. Por outro lado, quando eletrófilos ou espécies reativas de oxigênio reagem com os grupos sulfidril-cisteína presentes no Keap1, ocorre a ubiquitinação e a degradação deste, enquanto a proteína *NFE2L2* é estabilizada e ativada. A fosforilação dos resíduos de serina e treonina presentes em *NFE2L2* pelas quinases (MAPKS, P13K e PKC) facilita a dissociação entre *NFE2L2* e Keap1 e a subsequente translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, *NFE2L2* liga-se a pequena proteína Maf (sMaf) e a outros fatores e promove a transcrição de genes que possuem a região promotora ARE - “Antioxidant Response Element” ou elemento responsivo a antioxidante (KIM et al., 2010) (Figura 9).

Figura 9- Via de sinalização NFE2L2-ARE. Fonte: Nguyen et al. (2009), adaptada pela autora

O ligar e desligar de NFE2L2 protege as células contra danos provocados pelos radicais livres, impede a apoptose e garante a sobrevivência celular (NGUYEN et al., 2009).

Ao ligar-se às regiões promotoras ARE, o fator de transcrição NFE2L2 regula a expressão de genes da via antioxidante, portanto regula a homeostase do redox celular e de respostas citoprotetoras permitindo a adaptação e sobrevivência em condições de estresse (LEE; JOHNSON, 2004).

O significado do NFE2L2 está começando a ser reconhecido também no metabolismo lipídico. Em uma revisão realizada por Vomhof-Dekrey e Picklo (2012), foram compilados os dados de estudos sobre os efeitos do NFE2L2 sobre o metabolismo lipídico.

Os primeiros a apresentarem o NFE2L2 como um regulador do metabolismo lipídico foram Tanaka et al. (2008), pois observaram que ratos *NFE2L2*^{-/-} *knockout* apresentavam expressão gênica hepática elevada para proteínas associadas à síntese lipídica.

Wu et al. (2011) examinaram como a ativação hepática de *NFE2L2* poderia afetar a expressão de genes responsáveis pela síntese de ácidos graxos/lipídios e também encontraram o *NFE2L2* como um inibidor para síntese de ácidos graxos e lipídios.

Huang et al. (2010) propuseram 2 mecanismos moleculares pelos quais o NFE2L2 pode regular o metabolismo lipídico hepático (Figura 10):

- via ativação direta do receptor nuclear órfão (ou pequeno parceiro heterodímero, o *SHP*)- regulador essencial da acumulação de lipídios no fígado;
- via ativação de *SCD*, *SREBF1*, *PPAR-γ* e *FAS*.

Figura 10- Modelo regulatório proposto para o papel do NFE2L2 na homeostase lipídica hepática. Fonte: Huang et al. (2010), adaptada pela autora

4.6.2 Genes antioxidantes

4.6.2.1 Glutathiona Peroxidase (GPX) e Glutathiona redutase (GSR)

O gene *GPX1* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 22, contém 2 éxons e 1.169 bp (início: 51.325.106, término: 51.326.274 bp). O gene *GPX4*, na mesma espécie, localiza-se no cromossomo 7, contém 7 éxons e 2.422 bp (início: 45.205.077bp, término: 45.207.498 bp). O gene *GSR*, também em *Bos taurus*, localiza-se no cromossomo 27, contém 12 éxons e 30.189 bp (início: 25.943.355 bp, término: 25.973.543 bp) (NCBI, 2014).

O gene *GPX* codifica membros da família da glutathiona peroxidase e o gene *GSR* codifica a enzima glutathiona redutase (NCBI, 2014).

A glutathiona peroxidase (GPX) foi descrita por Mills em 1957. Trata-se de uma enzima antioxidante formada por um resíduo de cisteína ligado covalentemente ao selênio, cuja atividade é exercida ao consumir o substrato GSH (glutathiona reduzida) e convertê-lo a glutathiona oxidada (GSSG). A regeneração do GSH no meio celular é efetuada pela glutathiona redutase (GSR) tendo como agente redutor o NADPH. A GPX catalisa a redução do peróxido

de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH a GSSG (SURAI, 2006). Tal mecanismo está ilustrado na Figura 11.

Figura 11- Ciclo oxidação-redução da glutatona. Fonte: Cominetti et al. (2011), adaptada pela autora

A família de GPX integra o grupo de selenoproteínas e têm em seu sítio ativo quatro átomos de selênio, sendo sua biossíntese induzida por selênio (HOLBEN, 1999).

A presença de selênio na estrutura da GPX permite que exista uma alta relação entre a concentração sanguínea e tissular de Se com a atividade dessa enzima. A deficiência de Se induz a baixa atividade da GPX, deixando a célula exposta à ação nociva das EROs, o que produz alterações na estrutura de lipídios, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares.

Daun e Akesson (2004) encontraram correlação significativa entre a atividade da GPX e o conteúdo de selênio em diferentes órgãos bovino. A exemplo, a atividade da GPX está relacionada com níveis de selênio no fígado de bovinos e, portanto, há maior atividade dessa enzima nos tratamentos com maior consumo e maior acúmulo de selênio no fígado.

Atualmente, quatro membros da família da GPX têm função conhecida.

A GPX clássica (GPX1), a selenoproteína mais abundante em mamíferos, foi a primeira a ser identificada e está presente no citosol das células, no qual age como antioxidante reduzindo peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos livres e transformando-os respectivamente em água e álcool (COMINETTI et al., 2011).

A GPX gastrointestinal (GPX2) é a selenoproteína mais importante no cólon e protege o organismo de mamíferos da toxicidade causada por hidroperóxidos lipídicos (COMINETTI et al., 2011).

A GPX extracelular (GPX3) tem expressão elevada nos rins e pode ter função antioxidante nos túbulos renais ou espaços extracelulares (COMINETTI et al., 2011).

A GPX fosfolipídio (GPX4) é diretamente responsável pela redução de hidroperóxidos lipídicos. Ela reage com hidroperóxidos fosfolipídicos e com hidroperóxidos pouco solúveis, além de metabolizar colesterol e hidroperóxidos de éster de colesterol em lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (COMINETTI et al., 2011). A GPX4 também reduz com eficiência hidroperóxidos de timina, de lipoproteínas e de ésteres de colesterol e é a única GPX capaz de reduzir hidroperóxidos incorporados a membranas (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

A síntese de selenoproteínas é totalmente dependente da disponibilidade de selênio. Quando há baixa ingestão, ocorre maior direcionamento do mineral para síntese de determinadas selenoproteínas, enquanto outras recebem quantidades menores. Acredita-se que a ordem de direcionamento de selênio para as GPX seja: $GPX2 > GPX4 > GPX3 = GPX1$. Em razão disto, algumas enzimas perdem sua atividade mais rapidamente na deficiência de selênio. Outras podem não apresentar alterações em casos de deficiência moderada de selênio, perdendo atividade somente após deficiência grave e prolongada do mineral. A perda de atividade implica também na redução da estabilidade da enzima, o que, por sua vez, reduz os níveis dos respectivos mRNA. Esta característica é menos importante do que a perda de atividade da enzima, mas as diferenças na estabilidade dos mRNA específicos de cada selenoproteína influenciarão no direcionamento do selênio para cada uma delas. Em casos de depleção do mineral, selenoproteínas que apresentam maior estabilidade são sintetizadas mais rapidamente em relação àquelas menos estáveis, sendo que a GPX1 e a GPX3 são aquelas que apresentam resposta mais rápida à depleção de selênio e após a repleção demoram mais tempo para se tornar detectáveis e atingir novamente os níveis máximos de expressão (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

Por muito tempo nossa visão esteve restrita a proteção fornecida pelos antioxidantes, especialmente, a enzimas como as glutatonas peroxidase.

Contudo, nas últimas décadas tal visão foi ampliada e o estresse oxidativo passou a ser abordado considerando-se também o desequilíbrio na origem dos genes, na forma como eles se expressam e na maneira como eles são regulados. Sob esta ótica, pesquisas tem analisado a expressão de genes antioxidantes como forma de avaliar o estresse oxidativo e, mais que isso, como um meio para compreender as vias pelas quais estes genes são ativados, como são ativados e quais as consequências da ativação destes para o organismo.

4.6.2.2 Glutationa, Glutamato cisteína ligase catalítica (*GCLC*) e Glutationa sintetase (*GSS*)

O gene *GCLC* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 23, contém 17 éxons e 44.646 bp (início: 6,921.942 bp, término: 6,966.587 bp). O gene *GSS*, na mesma espécie, localiza-se no cromossomo 13, contém 14 éxons e 25.227 bp (início: 64.842.129 bp, término: 64.867.355 bp) (NCBI, 2014).

Os genes *GCLC* e *GSS* codificam enzimas necessárias para a síntese de glutatona-glutamato cisteína ligase catalítica e glutatona sintetase, repectivamente (NCBI, 2014).

A glutatona é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos cisteína, ácido glutâmico e glicina. Ela é encontrada nos tecidos de todos os mamíferos, sendo presente em altas concentrações no fígado.

A glutatona pode estar na forma tiol-reduzida (GSH) ou dissulfido-oxidada (GSSG), sendo a forma predominante a GSH (LU, 2009).

A principal função da glutatona é a detoxificação de xenobióticos e seus metabólicos. Todos os organismos aeróbios estão sujeitos a certo nível de estresse oxidativo fisiológico da respiração mitocondrial. Os intermediários que são formados, superóxido e peróxido de hidrogênio, podem levar à produção de radicais de oxigênio tóxicos que podem causar a peroxidação lipídica e lesão celular. Para evitar esta situação, o peróxido de hidrogênio produzido endogenamente é reduzido pela GSH na presença da glutatona peroxidase.

A GSH é sintetizada no citoplasma de praticamente todas as células (MEISTER; ANDERSON, 1983).

A primeira etapa da biossíntese de GSH é limitante, sendo catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL). A GCL é composta de uma subunidade catalítica (*GCLC*) ou modificadora (*GCLM*). A *GCLC* exibe toda a atividade catalítica da enzima, bem como a inibição da síntese de GSH por *feedback* (SEELIG et al., 1984). A *GCLM* é enzimaticamente inativa, mas desempenha importante função reguladora (HUANG et al., 1993).

A segunda etapa da síntese de GSH é catalisada pela glutatona sintetase (*GSS*). Esta enzima não foi estudada de forma tão extensiva quanto a GCL. Geralmente, a *GSS* não é considerada importante na regulação da síntese de GSH, mas evidências acumuladas sugerem *GSS* pode desempenhar papel fundamental em determinados tecidos e/ou sob condições de estresse (LU, 2009). Por exemplo, Luo et al. (1998) observaram que os níveis de GSH e a atividade de *GSS* foram menores no músculo esquelético após trauma cirúrgico enquanto a atividade *GCL* não foi alterada. Huang et al. (2000), concluíram que a maior expressão dos

genes *GSS* e *GCLC* aumentou a síntese de GSH acima do observado quando apenas a expressão de *GCLC* estava aumentada.

Portanto, é importante avaliar tanto a *GCLC* quanto a *GSS* quando se estuda regulação da síntese de GSH, sobretudo sob condições de estresse.

Em ratos, os genes *GCL* e *GSS* são regulados pelo *NFE2L2* (WILD et al., 1999). Em seres humanos, o estresse oxidativo também regula a expressão de *GCL* via *NFE2L2*-ARE (CHAN; KWONG, 2000), assim como a expressão de *GSS* (LEE et al., 2005).

4.6.3 Genes lipogênicos

4.6.3.1 Proteína de ligação responsiva ao elemento esterol (*SREBF1: sterol regulatory element binding transcription fator 1*)

O gene *SREBF1* codifica a proteína de ligação responsiva aos elementos esteróis SREBP-1c. Em bovinos *Bos taurus*, localiza-se no cromossomo 19, contém 21 éxons e 16.162 bp (início: 35.234.544 bp, término: 35.250.705 bp) (NCBI, 2014).

As proteínas de ligação responsiva aos elementos esteróis (SREBPs) codificadas por este gene são reguladoras mestras da homeostase lipídica (WANG et al., 2014). Tais proteínas ativam a transcrição de genes que contêm o elemento responsivo aos esteróis (SREs), sendo por isso também chamadas de fatores de transcrição (WANG et al., 1994).

SREBPs ativam diretamente a expressão de mais de 30 genes responsáveis pela síntese e captação de ácidos graxos, colesterol, triacilgliceróis, fosfolipídios e NADPH, um co-fator requerido em várias etapas da síntese destas moléculas. No fígado, SREBPs regulam a produção de lipídios para a exportação para o plasma sob a forma de lipoproteínas e para a bile sob a forma de micelas (HORTON et al., 2002).

Existem 3 isoformas de SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2. A SREBP-1c, a forma predominante no fígado e na maioria dos outros tecidos, dedica-se primordialmente a síntese de ácidos graxos (SHIMOMURA et al., 1997).

A isoforma SREBP-1c regula genes responsáveis pela síntese das enzimas acetil-CoA sintetase, acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase (FAS), estearoil-CoA-dessaturase (SCD), aciltransferase-glicerol-3-fosfato e, ainda, ativa três genes necessários para gerar NADPH (SHIMOMURA et al., 1998) (Figura 12).

Figura 12- Genes regulados pela isoforma SREBP-1c. Fonte: Horton et al. (2002), adaptada pela autora

As SREBPs estão inseridas na membrana do retículo endoplasmático de uma grande variedade de tecidos. Para entrar no núcleo e agir como um fator de transcrição, o domínio do terminal NH_2 de cada SREBP deve ser proteoliticamente libertado da membrana. Três proteínas são necessárias para o processamento de SREBP: a proteína de escolta (SCAP) e as proteases sítio-1 (S1P) e sítio-2 (S2P). Quando o SREBP está inserido nas membranas do retículo endoplasmático, seu domínio de regulação COOH-terminal liga-se ao domínio do terminal COOH de SCAP. A SCAP é tanto uma escolta para SREBPs como um sensor de esteróis. Quando as células possuem pouco colesterol, a SCAP acompanha a SREBP do RE para o aparelho de Golgi (AP), onde as duas proteases residem. No aparelho de Golgi, a S1P, uma serina- protease ligada à membrana cliva a SREBP no circuito luminal entre os seus dois segmentos que atravessam a membrana, dividindo a molécula SREBP ao meio. O domínio terminal NH_2 é, em seguida, libertado da membrana através de uma segunda clivagem mediada por S2P, uma metaloproteínase de zinco ligada à membrana. O SREBP nuclear (nSREBP), a forma madura, transloca-se para o núcleo e ativa a transcrição ligando-se a elementos responsivos ao esterol (SREs) nas regiões promotoras /potenciadoras de múltiplos genes-alvo (HORTON et al., 1999).

Ao contrário, na presença de esteróis o processo de clivagem proteolítica é inibido (NTAMBI, 1999) (Figura 13).

Figura 13- Ativação de SREBP e sua migração para o núcleo. Fonte: Horton et al. (2002) e Ntambi (1999), adaptadas pela autora

Dez diferentes modelos de ratos geneticamente manipulados que não possuem ou sobre-expressam um único componente da via de SREBP foram produzidos nos últimos 6 anos, entre eles o estudo de Liang et al. (2002) realizado com ratos *SREBF1*^{-/-} *knockout* observou alterações moleculares e metabólicas nestes animais (Tabela1).

Tabela 1- Principais alterações moleculares e metabólicas observadas em ratos *knockout* para *SREBF1* por Liang et al. (2002)

Variáveis	Resultado observado em ratos <i>knockout</i> para <i>SREBF1</i>	
Quantidade de nSREBPS	<1a; <1c; >2	
Expressão gênica	<i>HMGCR</i>	1,3 x >
	<i>FAS</i>	0,3 x <
	<i>LDLR</i>	NA
Síntese	Ácidos Graxos	0,5 x <
	Colesterol	3 x >
Conteúdo hepático	Ácidos Graxos	NA
	Colesterol	1,2 x >
	TAG	0,4 x <
Níveis plasmáticos	Colesterol	0,8 x <

FAS: ácido graxo sintase; LDLR: receptor de LDL; TAG: triacilgliceróis

NA: não alterou; x >: número de vezes maior; x <: número de vezes menor

Tabela adaptada de Liang et al., (2002)

Os papéis desempenhados pelo gene *SREBF1* e pelas proteínas SREBPs são complexos, por isso tornaram-se objeto de estudos para muitos pesquisadores interessados no estudo do metabolismo lipídico e seus produtos.

4.6.3.2 Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo-alfa (PPARA)

O gene *PPARA* em bovinos *Bos Taurus* localiza-se no cromossomo 5, contém 11 éxons e 83.869 bp (início: 117.150.468 bp, término: 117.234.336 bp) (NCBI, 2014).

O gene *PPARA* codifica a proteína PPARA- o receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo-alfa (NCBI, 2014). O *PPARA* é frequentemente expresso nos tecidos onde o catabolismo de ácidos graxos tem um papel importante, ou seja, principalmente no fígado, nos rins, no coração e nos músculos (BARBIER et al., 2003).

Os receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPARs) são receptores promíscuos presentes nas células de vários órgãos, que quando ativados atuam como fator de transcrição. São subdivididos em PPAR-alfa, PPAR-gama e PPAR-delta (ou beta).

PPAR-alfa (PPARA) são ativados por ácidos graxos, eicosanóides e fibratos. PPAR-gama, por metabólitos do ácido araquidônico, lipoproteína de baixa densidade oxidada e tiazolidinedionas. Enquanto que os PPAR-delta ainda não têm suas funções e regulação compreendidas, apenas demonstram uma distribuição generalizada nos tecidos (ELANGBAN et al., 2001).

Os PPAR alfa e gama são as duas principais categorias destes receptores. Ambos são caracterizados pela sua capacidade de influenciar o metabolismo de lipídios, a homeostase da glicose, a proliferação celular, diferenciação e apoptose, bem como a resposta inflamatória, por ativação da transcrição de genes-alvo (PUDDU et al., 2002).

Após a ativação do PPAR por agonistas, ele é translocado para o núcleo e heterodimeriza com outro receptor nuclear, o receptor nuclear X ácido retinóico (RXR) e, subsequentemente, interage com um elemento sensível ao proliferador de peroxissomo (PPRA) no gene-alvo. A região específica do DNA no gene alvo em que o PPAR se liga é denominada de elemento localizado de resposta hormonal ao proliferador de peroxissomo (PPRE). O resultado desta ligação é o recrutamento da maquinaria transcricional básica contendo RNA-Polimerase II, a qual transcreve o DNA para mRNA. A interação de receptores nucleares com a sequência de síntese de RNA é indireta e requer outras proteínas adaptadoras, denominadas co-ativadores, que podem modular a atividade biológica de PPAR.

A ativação transcricional de genes alvo pelo PPAR resulta na síntese de proteínas e diferentes efeitos biológicos (DESVERGNE et al., 1999) (Figura 14).

Figura 14- Mecanismo de ativação por PPARs. Fonte: Grygiel-Górniak (2014), adaptada pela autora

Os ligantes agonistas naturais do PPARA são ácidos graxos (especialmente os PUFAs) e eicosanóides, como leucotrieno B4 e outros derivados do ácido araquidônico (NEVE et al., 2000).

Os ácidos graxos n-3 possuem três características essenciais para ligação perfeita com o PPARA: cabeça polar (grupo carboxílico), região de ligação (longa cadeia) e cauda hidrofóbica. Além disto, por serem altamente insaturados, prontamente estimulam o PPAR (SHEU et al., 2005).

Quando a concentração de ácidos graxos aumenta, o PPARA é sensibilizado e estimula a transcrição de genes dos sistemas responsáveis pela oxidação dos ácidos graxos, a qual ocorre principalmente no fígado e evita o acúmulo de gordura, a esteatose. Portanto, a ativação do PPARA resulta em maior queima de energia e redução de ácidos graxos estocados (RAO; REDDY, 2004).

Kota et al. (2005) publicaram uma revisão sobre as ações biológicas do PPARA reunindo as descobertas de vários pesquisadores, entre elas:

- o papel fundamental de agonistas de PPARA na regulação da β -oxidação de ácidos graxos;
- o estímulo à absorção celular dos ácidos graxos através do aumento da expressão da proteína de transporte de ácidos graxos e ácido graxo translocase;
- a promoção da expressão de enzimas do citocromo P450 levando a hidroxilação de ácidos graxos;

- a diminuição dos níveis de triacilgliceróis;
- a ativação de Apo A-1, a principal apolipoproteína da lipoproteína de alta densidade (HDL);
- os efeitos anti-inflamatórios em células vasculares: inibição da expressão induzida por citocinas VCAM-1 e o aumento da expressão da síntese endotelial de óxido nítrico (eNOS).

Todos estes resultados demonstram a importância da expressão do gene *PPARA* para a fisiologia e fisiopatologia do organismo animal e os motivos pelos quais ele instiga muita pesquisa na área médica e mais recentemente também na área de produção de alimentos.

Alimentos em que a composição lipídica seja alvo de interesse, como a carne e o leite, justificam a investigação do *PPARA*, pois além de influenciar a oxidação e a síntese lipídica, ele pode estar relacionado a uma enzima-chave para a síntese de ácido linoleico conjugado, a enzima delta-9-desaturase (RENAVILLE et al., 2006; WATERS et al., 2009).

4.6.3.3 Delta-9-desaturase ou estearoil - CoA dessaturase (SCD)

O gene *SCD* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 26, contém 4 éxons e 10.373 bp (início: 21.137.945, término: 21.148.317 bp). Este gene codifica a enzima estearoil - CoA dessaturase ou delta-9-desaturase (NCBI, 2014).

A estearoil - CoA dessaturase (SCD) é uma enzima do retículo endoplasmático (RE) que catalisa a biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) a partir de ácidos graxos saturados. Os substratos preferidos são palmitoil e estearoil-CoA-redutase, que são convertidos em palmitoleoil e oleoil-CoA-redutase, respectivamente. Estes produtos são os MUFAs mais abundantes no organismo animal e são substratos para a síntese de vários tipos de lipídios, incluindo fosfolipídios, triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (EC).

MUFAs são mediadores na transdução de sinal e na diferenciação celular (BRADLEY et al., 2008). Além disto, já foi demonstrado influenciarem a apoptose e a mutagênese em alguns tumores (HARDY et al., 2003). Assim, levando-se em conta as múltiplas funções de MUFAs, a variação na atividade de SCD em mamíferos pode afetar uma grande variedade de respostas fisiológicas importantes, incluindo a diferenciação celular, a sensibilidade à insulina, a taxa metabólica, a adiposidade, a aterosclerose, a obesidade e o câncer.

A expressão de *SCD* e a subsequente síntese de ácido oleico (C18:1) é necessária para a função fisiológica normal do organismo, apesar das dietas de mamíferos fornecerem níveis abundantes de ácido oleico (PATON; NTAMBI, et al., 2009).

Os MUFAs sintetizados endogenamente por SCD provavelmente servem como os principais substratos para a síntese de triacilgliceróis e ésteres de colesterol hepático. As enzimas envolvidas na síntese *de novo* dos triacilgliceróis e ésteres de colesterol incluem a delta-9-desaturase (SCD), a acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT), a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e a microsomal glicerol fosfato aciltransferase (GPAT), todas localizadas na membrana do RE (Figura 15).

Figura 15- A síntese de MUFAs por SCD e a síntese hepática de éster de colesterol e triacilgliceróis. Fonte: Paton e Ntambi (2009), adaptada pela autora

Sob condições de elevada concentração de colesterol celular, a expressão de SCD protege a célula dos efeitos nocivos do colesterol livre, fornecendo MUFAs para a conversão em éster de colesterol através da ação da ACAT para serem armazenados na forma de lipoproteínas, pois o excesso de colesterol livre é reconhecido como desencadeador da morte celular (PUTON; NATMBI et al., 2009).

A maior parte da nossa compreensão sobre o gene *SCD* é derivada de modelos de roedores. No entanto, vários estudos recentes têm observado a proporção MUFA/ácidos graxos saturados e a atividade e expressão do *SCD* em seres humanos, assim como em outras espécies.

Em bovinos, os estudos chamam a atenção para o papel desta enzima na modulação da síntese de ácido linoleico conjugado (CLA), um ácido graxo de grande interesse para a composição lipídica do leite e da carne (WATERS et al., 2009).

4.6.4 Genes colesterolêmicos

4.6.4.1 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (*HMGCR*)

O gene *HMGCR* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 10, contém 20 éxons e 20.631 bp (início: 6.692.478 bp, término: 6.713.108 bp). Este gene codifica a enzima limitante para a síntese do colesterol (NCBI, 2014).

O colesterol é um álcool de origem exclusivamente animal, fundamental para a viabilidade da vida. Ele é precursor de sais biliares, hormônios esteroides e vitamina D, desempenhando importante função no metabolismo de cálcio e fósforo. Em teoria, todos os tecidos que possuem células nucleadas são capazes de sintetizar colesterol, entretanto, a síntese na maior parte dos mamíferos ocorre primariamente no fígado (ARAÚJO, 2008).

O colesterol é sintetizado a partir do acetil-CoA, em uma via composta por cinco etapas. Primeiramente, três moléculas de acetil-CoA são convertidas em mevalonato, através da reação que é limitante da velocidade, sendo essa etapa catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (*HMGCR*). Na segunda etapa, o mevalonato é fosforilado pelo ATP e, por meio de uma descarboxilação, formam-se duas unidades de isopentenil-pirofosfato. Em seguida, seis dessas unidades de isoprenoides ativas formam o esqualeno, o qual é convertido a lanosterol. A última etapa ocorre na membrana do retículo endoplasmático, sendo caracterizada pela transformação do lanosterol em colesterol.

A regulação da biossíntese de colesterol foi reconhecida pela primeira vez há mais de 60 anos (GOULD et al., 1953 *apud* CHAMBERS; NESS, 1998). Tal regulação ocorre na etapa catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase. Dessa forma, a síntese de colesterol é inibida pelo produto final (mevalonato), jejum, glucagon, glicocorticoides e lipoproteínas de baixa densidade- LDL-colesterol captada via receptores de LDL (receptores da apo B-100 e apo E), a fim de evitar o acúmulo destas, pois nas artérias do homem, especialmente nas artérias coronarianas, uma vez oxidadas, tornam-se fator primordial para o desenvolvimento da aterosclerose (VALK; HORNSTRA, 2000).

Sendo assim, o *feedback* regulado pela expressão do gene de *HMGCR* hepático é uma etapa importante para a homeostase do colesterol.

O mecanismo molecular pelo qual esta regulação ocorre tem sido objeto de extensa investigação. Vários modelos têm sido propostos para explicar este *feedback*: regulação por mudanças na fluidez da membrana (SABINE; JAMES, 1976), alterações no estado de fosforilação (AREBALO et al., 1982) e alterações na taxa de transcrição (LISCUM et al.,

1983; GOLDSTEIN et al., 1990). Dentre estes, a regulação ao nível da transcrição recebeu a maior atenção (BROWN; GOLDSTEIN, 1997).

A regulação ao nível transcricional propõem a participação do elemento de resposta ao esterol (SER), mais especificamente, a ligação entre proteínas nSREBPs- SREs localizados na região flanqueadora 5' do gene *HMGCR*. Foi proposto que quando os níveis de colesterol celular caem, uma proteinase é ativada e produz formas maduras de SREBPs. Estas migram a partir do retículo endoplasmático para o núcleo e ativam a transcrição do gene da *HMGCR* (BROWN; GOLDSTEIN, 1997; VALLET et al., 1996).

A maioria dos estudos sobre a regulação da síntese do colesterol utilizou como modelos roedores e, é sabido que há diferenças na regulação da síntese de colesterol entre as espécies atribuíveis a transcrição de *HMGCR* hepático. Em *hamsters*, o colesterol da dieta diminuiu os níveis de SREBP maduro (SHIMOMURA et al., 1997); em ratos, os níveis de SREBPs maduros e a taxa de transcrição de *HMGCR* não foram afetados pelo colesterol dietético (LOPEZ et al., 1997).

Portanto, analisar outras espécies quanto ao comportamento deste gene frente às dietas e à síntese de colesterol é imprescindível para a compreensão da via de regulação deste gene para cada uma delas, assim como de seus efeitos para o metabolismo em cada espécie.

4.6.4.2 Acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT)

O gene *ACAT* codifica isoformas da enzima acil-CoA-colesterol aciltransferase. Existem 2 isoformas de *ACAT*: *ACAT1* e *ACAT2*. A isoforma *ACAT1* é codificada pelo gene *ACAT1*, o qual, em bovinos *Bos taurus*, localiza-se no cromossomo 15, contém 12 éxons e 29.056 bp (início: 17.999.932 bp, término: 18.028.987 bp). Enquanto a isoforma *ACAT 2* é codificada pelo gene *ACAT2*, o qual, em bovinos *Bos taurus*, localiza-se no cromossomo 9, contém 9 éxons e 15.463 bp (início: 97.466.440 bp, término: 97.481.902 bp) (NCBI, 2014).

A Acil-CoA-colesterol aciltransferase (*ACAT*) é uma enzima localizada no retículo endoplasmático, presente em uma grande variedade de tecidos humanos e de outros animais.

A *ACAT* catalisa a formação de ésteres de colesterol (EC) a partir de colesterol e de ácidos graxos de cadeia longa sob a forma de LDL (CHANG et al., 1997). Além de armazenar o colesterol intracelular, a *ACAT* desempenha papéis fisiológicos importantes, incluindo a montagem hepática de lipoproteínas e a absorção do colesterol dietético (WILSON; RUDEL, 1994). Em condições patológicas, a acumulação de ésteres de colesterol produzidos por *ACAT* é característica para a formação de células espumosas nas lesões ateroscleróticas

(MIYASAKI et al., 1998). Por estas razões, a ACAT tem sido um alvo farmacêutico para o desenvolvimento de agentes capazes de baixar o colesterol e/ou anti-aterosclerose (KRAUSE; BOCAN et al., 1995).

O entendimento sobre o papel fisiológico das isoformas ACAT1 e ACAT2 ainda é incompleto. Alguns pesquisadores afirmam que a proteína ACAT1 tem importante papel catalisador no fígado, mas não no intestino (LEE et al., 1998) e que a ACAT2 é importante no fígado e intestino delgado apenas do feto (CHANG et al., 2000). Outros propõem que a ACAT1 é fisiologicamente menos importante no fígado, pois é predominantemente expressa em células de Kupffer; ao passo que a ACAT2 é mais importante, pois é expressa exclusivamente em hepatócitos e na porção apical de células da mucosa intestinal de primatas não humanos (LEE et al., 2000). Meiner et al. (1996) descobriram que em camundongos *ACAT1*^{-/-} *knockout* a atividade da enzima ACAT total e os níveis de éster de colesterol hepático são normais. Outros têm como hipótese que a ACAT1 é expressa para manter o equilíbrio intracelular de colesterol livre e esterificado, ao passo que a ACAT2 está associada com a absorção intestinal de colesterol e as funções específicas de hepatócitos, tais como a montagem de partículas de lipoproteína e a produção de bile (LEE et al., 2001).

Smith et al. (2004) realizaram um estudo para quantificar a expressão de *ACAT* em diferentes tecidos humanos a fim de determinar a abundância relativa de transcritos de mRNA de *ACAT1* e *ACAT2*. Eles observaram que os transcritos de *ACAT1* predominam no fígado e de *ACAT2* no duodeno, tendo a ACAT2 um papel regulador importante no fígado e no intestino.

Contudo, os níveis de expressão relativa de *ACAT1* e *ACAT2* são diferentes entre os animais já estudados.

Enquanto a ACAT1 foi encontrada como a principal isoenzima do fígado humano adulto, ratos e macacos têm a ACAT2 como a principal isoenzima no fígado (MEINER et al., 1997; LEE et al., 2001).

Kushwaha et al. (2005) observaram em babuínos que a expressão de *ACAT1* foi maior no fígado, ao passo que a expressão de *ACAT2* foi maior no duodeno e jejuno. Neste estudo eles também notaram que a expressão de *ACAT1* foi maior em animais com altas respostas lipêmicas para lipídios na dieta, sugerindo que as diferenças na expressão de *ACAT1* possa afetar a concentração de colesterol no plasma e, parcialmente, contribuir para a hiperlipidemia induzida pela dieta.

As incertezas sobre a atividade das isoformas e os níveis de mRNA de *ACAT1* e *ACAT2* impede que a importância fisiológica destas e de seus produtos possam ser definidos

com clareza. Esta falta de dados torna difícil conceber moduladores *ACAT*-específicos capazes de influenciar a secreção hepática de colesterol, a secreção biliar, a absorção do colesterol a partir da dieta e a formação de ésteres de colesterol. Portanto, para o preenchimento destas lacunas, faz-se necessário destinar maior atenção para a pesquisa do gene *ACAT*.

4.6.4.3 Lecitina-colesterol aciltransferase (*LCAT*)

O gene *LCAT* em bovinos *Bos taurus* localiza-se no cromossomo 18, contém 6 éxons e 3.246 bp (início: 35.544.366 bp, término: 35.547.611 bp). Este gene fornece instruções para a síntese da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (NCBI, 2014). Esta enzima desempenha importante papel na remoção de colesterol do sangue e tecidos.

Em 1966, Glomset identificou a *LCAT* como importante força motriz para o transporte reverso do colesterol, processo este que se refere à remoção do excesso de colesterol dos tecidos periféricos mediada por HDL. Mediante a esterificação do colesterol em HDL, a *LCAT* mantém o gradiente de colesterol livre entre a membrana celular e a superfície da partícula de HDL, gerando um fluxo contínuo de colesterol da célula para lipoproteínas e impedindo a transferência de colesterol de volta para a célula. Na forma de HDL, o colesterol esterificado é entregue para o fígado e, finalmente, para a excreção biliar.

Além do papel essencial no transporte reverso de colesterol, a captação de colesterol mediada pela *LCAT* sob a forma de HDL é essencial para aquisição de colesterol para produção de glicocorticóides pela adrenal (HOESTRA et al., 2009; VERGEER et al., 2011).

Os estudos realizados ao longo dos últimos 50 anos evidenciaram a importância da *LCAT*, mas ainda não está claro seu papel exato. Considerando a complexa interação de *LCAT* com lipoproteínas na circulação, serão necessários mais estudos para determinar seu papel e se a utilização de um ativador de *LCAT* poderá se tornar uma estratégia terapêutica promissora para reduzir o risco de doenças, tais quais as cardiovasculares (KUNNEN; VAN ECK, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local da realização do experimento

A pesquisa foi conduzida no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em Pirassununga, SP.

5.2 Animais e Instalações

Quarenta e oito bovinos Nelore machos, não castrados, com aproximadamente 2 anos, peso inicial médio de 350kg, em fase de terminação foram alocados em confinamento com portões eletrônicos do tipo *calan gate*, permanecendo em lotes (12 animais/lote), alimentados individualmente (Figura 16).

Figura 16- a) Animais alocados em lotes, b) alimentação individual (GREGHI, 2012)

O período de adaptação à dieta foi de 14 dias. O período experimental foi de 12 semanas. O consumo foi monitorado diariamente por meio de pesagens dos alimentos antes do fornecimento e das sobras no dia seguinte.

Durante este período foram realizadas pesagens dos animais a cada 28 dias, sendo a pesagem inicial (1) após a fase de adaptação e a pesagem final (4) antes do abate (Tabela 2).

Tabela 2- Peso e ganho de peso médio (kg) dos animais segundo os grupos no período do experimento

Peso médio (kg)/ Grupo	Controle	Se + Vit E	Canola	Se + Vit E + Canola
Pesagem 1	336,0	356,5	354,3	353,2
Pesagem 2	368,8	388,5	388,0	394,7
Pesagem 3	404,8	424,3	436,7	434,5
Pesagem 4	433,0	453,0	467,8	472,2
Ganho de peso no período	97,0	96,5	113,5	119,0

Os animais pertenceram ao Projeto FAPESP “Influência da inclusão de óleo de canola, selênio e vitamina E na qualidade da carne de bovinos em confinamento e seus efeitos na nutrição e saúde de humanos”, referente ao auxílio 2011/20987-9 e a bolsa de pós-doutorado 2010/20689-5.

5.3 Dietas Experimentais

A dieta total conteve 30% de volumoso (silagem de milho) e 70% de concentrado na matéria seca segundo as exigências nutricionais recomendadas pelo NRC, (1996) (Tabela 3).

Tabela 3- Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca)

Ingredientes	% da matéria seca
Milho Grão Seco	48,12
Farelo de Soja 46%	13,6
Polpa de Citrus Peletizada	18,2
Silagem de Milho	30,0
Uréia	0,8
Núcleo Mineral	1,0
Sulfato de Amônia	0,05
Cloreto de Potássio	0,2
Rumensin	0,03
NUTRIENTES	
Proteína Bruta, %	14,6
Proteína Degradável no Rúmen, %	9,9
NDT, % ¹	74,5

1 - Estimado pela fórmula de Weiss et al. (1992)

Os tratamentos foram:

-Controle (**C**): Dieta base;

-Selênio + vitamina E (**Se+Vit E**): adição de 2,5 mg de Se e 500 UI de vitamina E por quilograma de matéria seca da dieta;

-Óleo de canola (**Canola**): adição de 3% de óleo de canola por quilograma de matéria seca da dieta;

-Selênio + vitamina E + óleo canola (**Se+Vit E+ Canola**): adição de 2,5 mg de Se, 500 UI de vitamina E e 3% de óleo de canola por quilograma de matéria seca da dieta.

A fonte de selênio utilizada para a suplementação dos animais foi o selênio orgânico Sel-Plex®, Alltech.

A fonte de a vitamina E foi a Lutavit E50®, BASF. Segundo o certificado de análise desta empresa, composta por 51% de alfa-tocoferil acetato (Anexo 1).

O óleo de canola fornecido para os animais foi avaliado quanto ao perfil de ácidos graxos pelo Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (Anexo 2).

5.4 Abate

Ao final do experimento, os bovinos (peso final ± 456 kg) foram abatidos no Abatedouro Escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), o qual utiliza o Sistema de Inspeção Estadual (SISP).

Após o período de jejum de 12 horas, os animais foram insensibilizados por concussão cerebral e abatidos por sangria na veia jugular em posição vertical, seguida de esfolagem, evisceração, inspeção, serragem das carcaças ao meio, toalete e pesagem das carcaças quente.

No momento do abate foram obtidas frações de:

- fígado: lobo hepático esquerdo (Figura 17);

Figura 17- a) Vista diafragmática do fígado. Fonte: Netter, 2008; b) local da coleta da amostra do fígado em uma das carcaças do experimento (GREGHI, 2012)

- músculo: 9º espaço intercostal (EIC) do *L. dorsi* (Figura 18);

Figura 18- a) Localização anatômica do músculo *L. dorsi*- Fonte: Gray, 1918- adaptada pela autora; b) local da coleta da amostra (9º EIC) em uma das carcaças do experimento (GREGHI, 2012)

- tecido adiposo subcutâneo: junto ao músculo *L. dorsi*.

Cada fração coletada foi imediatamente dividida em 3 amostras de cerca de 1 cm³, que juntas foram embaladas em papel alumínio previamente identificado e armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises de expressão gênica (Figura 19).

Figura 19- a) Corte das amostras de músculo e gordura; b) Acondicionamento das amostras de tecido adiposo para posterior imersão em nitrogênio líquido (GREGHI, 2012)

5.5 Procedimento analítico

5.5.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído das amostras congeladas com o uso de kits seguindo-se o protocolo do fabricante. Cada protocolo foi realizado de 5 em 5 amostras para evitar contaminação ou tempo prolongado de extração, o que poderia comprometer a qualidade do RNA extraído.

5.5.1.1 Extração de RNA do tecido hepático

Para o tecido hepático foi utilizado o RNeasy Tissue Mini Kit QIAGEN®.

Para cada amostra de fígado, foram utilizados 30 mg de tecido. A amostra foi macerada por pistilo em *ependorf* de 1,5 mL junto de tampão RLT, o lisado foi centrifugado por 3 min em velocidade máxima (10.000 x *g*). Cuidadosamente, foi removido o sobrenadante, pipetado e transferido para um novo tubo de microcentrifugação. Foram

adicionados 700 µL de álcool 70% para lavar o lisado e estes foram misturados imediatamente com a ponteira. O resultante foi transferido para uma coluna de *spin* RNeasy colocada num tubo de recolha de 2 mL e este foi centrifugado durante 15 s a 10.000 x g e o evacuado foi descartado. Na mesma coluna foram adicionados 700 uL do tampão RW1, centrifugados durante 15 s a 10.000 x g para lavar a membrana da coluna de *spin*. Ainda na mesma coluna, após o descarte do escoado, 500 uL do tampão RPE foram adicionados à coluna de *spin* RNeasy e centrifugados durante 15 s a 10.000 x g para novamente lavar a membrana da coluna de *spin*. Mais uma vez o evacuado foi descartado e mais 500 uL do tampão RPE foram adicionados à coluna de *spin* RNeasy e centrifugados durante 2 min a 10.000 x g para mais uma lavagem da membrana da coluna de *spin*. A coluna de *spin* RNeasy foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 mL e descartado o tubo de recolha antigo com o evacuado e, então o novo tubo foi centrifugado a toda a velocidade (10.000 x g) durante 1 minuto. Mais uma vez, a coluna de *spin* RNeasy foi colocada em um novo tubo de recolha de 1,5 mL, foram adicionados 30 uL de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna de *spin* e esta foi centrifugada durante 1 min a 10.000 x g para que o RNA fosse eluído. Então, o *eppendorf* com a amostra de RNA foi colocado em meio ao gelo moído em um isopor e levado até freezer a -80° C, no qual foi conservado para as posteriores análises (Figura 20).

Figura 20- Esquema das etapas de extração de RNA de amostras de tecido hepático.

Fonte: RNeasy Tissue Mini Kit QIAGEN®, 2010- adaptada pela autora

5.5.1.2 Extração de RNA do tecido muscular e adiposo

Para os tecidos muscular e adiposo foram utilizados os RNeasy Lipid Tissue Mini Kits da QIAGEN®.

Para a extração de cada amostra de RNA do tecido muscular e adiposo foram utilizados *ependorfs* de 1,5 mL preparados com 1 mL de Quiazol, nos quais foram inseridas as amostras excisadas dos tecidos (até 100 mg). As amostras foram rompidas e maceradas com uso de pistilos e tesoura e, o lisado foi cuidadosamente pipetado em um novo *ependorf*. Este foi deixado na bancada a temperatura ambiente (15-25 °C) por 5 min, então foram adicionados 200 uL de clorofórmio e agitado vigorosamente por 15 s. Novamente foi deixado na bancada a temperatura ambiente (15-25 °C) por 3 min e centrifugado 10.000 x *g* por 15 min a 4°C. Depois da centrifugação, a amostra separou-se em 3 fases: incolor e aquosa com o RNA; branca; vermelha. Em algumas amostras houve ainda uma quarta fase abaixo da vermelha, a qual ocorreu quando havia muita gordura. O sobrenadante aquoso foi pipetado e

transferido para um novo tubo. Foram adicionados 600 uL de etanol 70%, agitados no vórtex e transferidos para uma coluna de *spin* em tubo coletor de 2 mL. Este novo tubo foi centrifugado por 15 s a 10.000 x *g* em temperatura ambiente (15-25 °C). O evacuado foi descartado e foram adicionados 700 uL de Tampão RW1 a coluna de *spin* e esta centrifugada por 15 s a 10.000 x *g* em T ambiente (15-25 °C). Após novo descarte, foram adicionados 500 uL do tampão RPE a coluna e esta centrifugada por 15 s a 10.000 x *g* em T ambiente (15-25 °C). Mais 500 uL do tampão RPE foram adicionados a coluna e esta foi centrifugada por 2 min, 10.000 x *g*, T ambiente (15-25 °C). Então a coluna foi colocada em um novo tubo coletor de 2 mL e centrifugada a velocidade máxima por 1 min. A coluna foi novamente colocada em um novo tubo de coleta de 1,5 mL, foram adicionados 30 uL de água livre de RNA diretamente na coluna e esta foi centrifugada por 1 min, 10.000 x *g*. Então, o *ependorff* com a amostra de RNA foi colocado em meio ao gelo moído em um isopor e levado até freezer a -80° C, no qual foi conservado para as posteriores análises (Figura 21).

Figura 21- Esquema das etapas de extração de RNA de amostras de tecido muscular e adiposo. Fonte: RNeasy Lipid Tissue Mini Kit QIAGEN®, 2009- adaptada pela autora

5.5.2 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total extraído dos tecidos hepático, adiposo e muscular

Após extração do RNA total, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Spectrophometer- Thermo Scientific) a 260 e 280 nm. A pureza de cada amostra foi determinada pela razão de A260/A280, sendo consideradas amostras adequadamente puras aquelas com valores entre 1,90 a 2,10.

A integridade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida Tris-Acetato- EDTA (TAE).

Para o preparo da solução estoque (10X) de tampão de corrida, foram usados 500 mL de água destilada para dissolver 48,4 g de Tris (Tris base PM:121,2 g/mL). Junto, foram adicionados 11,5 mL de ácido acético glacial, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH=8,0 e o volume foi completado para 1000 mL. Para cada corrida, 100 mL da solução estoque foram medidos em provetas de 1000 mL e este volume foi completado com água destilada (Figura 22a). Para o preparo de cada gel de agarose foi utilizada 0,8 g de agarose diluída em 100 mL de tampão, aquecida até completa diluição. Após resfriado, foram pipetados em cada poço: 2 µg de RNA total, 2 µL de GelRed Nucleic Acid Gel Stain Biotium® diluição 1:500, 2 µL Orange Loading Dye Promega® e o volume foi ajustado para 10 µL com água anteriormente tratada com dietílico dicarbonato (DEPC), previamente autoclavada e resfriada (Figura 22b).

Figura 22- a) Preparo do tampão de corrida para eletroforese- TAE; b) Gel de agarose 0,8% em corrida (GREGHI, 2012)

Após cerca de 3 h de corrida para cada gel, foi realizada a leitura em câmera de luz ultra-violeta (UV) para análise da integridade pela visualização das bandas ribossomais 28S e 18S, duas subunidades do RNA ribossomal. Então, o gel foi fotodocumentado (Figura 23).

Figura 23- Amostras de RNA total extraído do músculo *L. dorsi* após eletroforese em gel de agarose a 0,8% com visualização das bandas 28S e 18S (GREGHI, 2012)

5.5.3 Protocolos adotados para as etapas de DNase e conversão do RNA para cDNA

Para a purificação do RNA total foram utilizados kits DNase I (RNase Free) Applied Biosystems®. Para cada amostra foram purificados 1000 ng de RNA, os quais foram pipetados em *eppendorfs* junto a 1 µL do tampão 10X DNase I Buffer e 1 µL da enzima DNase I (2U), o volume foi completado para 10 µL com água DEPC. O *eppendorf* foi incubado em termociclador Multigene Gradiente da Labnet® a 37 °C durante 30 minutos. Ao ser retirado do termociclador, foi pipetado 1 µL da solução de parada 50 mM EDTA e colocado novamente no termociclador por mais 10 minutos a 75 °C.

Realizada a purificação, procedeu-se a conversão do RNA mensageiro em cDNA. Para tal etapa foram utilizados kits High Capacity RNA-to-cDNA Applied Biosystems®. Para cada amostra de RNA, foram utilizados 9 µL acrescidos de 10 µL do tampão 2XRT Buffer, 1 µL da enzima 20X Enzyme Mix. O *eppendorf* foi centrifugado e então incubado a 37 °C durante 60 minutos em termociclador. Para interromper a reação, foi realizada inativação por calor a 95 °C durante 5 minutos e, posteriormente, resfriamento a 4 °C. Após esta etapa, as amostras de cDNA encontravam-se prontas para serem utilizadas no protocolo de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT) ou para serem estocadas em freezer (-15 °C a -25 °C).

5.5.4 Análise da expressão gênica relativa pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT)

A partir das amostras de cDNA, foram realizadas as análises de expressão gênica relativa pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (PCR-RT) em termociclador para PCR-RT (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System).

Para a análise da expressão gênica relativa (PCR-RT) foram utilizados *primers* Taqman® Gene Expression Assays (Applied Life Technologies, EUA) para o estudo dos genes-alvo (*NFE2L2*, *GPX1* e *GPX4*, *GSR*, *GCLC*, *GSS*, *SREBF1*, *PPARA*, *SCD*, *HMGCR*, *ACAT1*, *ACAT2*, *LCAT*) e o controle endógeno utilizado foi o RNA ribossomal 18S (Applied Biosystems® Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control VIC®/MGB Probe, Primer Limited) (Tabela 4).

Tabela 4- *Primers* Taqman® Gene Expression Assays usados para a realização da técnica de PCR em tempo real

Gene	Número de acesso	Referência	TaqMan®
<i>NFE2L2; nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>	NM_001011678.2	NCBI	Bt03251880_m1
<i>GPX1; glutathione peroxidase 1</i>	NM_174076.3	NCBI	Bt03259217_g1
<i>GPX4; glutathione peroxidase 4</i>	NM_174770.3	NCBI	Bt03259616_g1
<i>GSR; glutathione reductase</i>	NM_001114190.2	NCBI	Bt03269182_g1
<i>GCLC; glutamate-cysteine ligase, catalytic subunitase</i>	NM_001083674.1	NCBI	Bt03230880_m1
<i>GSS; glutathione synthetase</i>	NM_001015630.1	NCBI	Bt03210688_m1
<i>SREBF1; sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	NM_001113302.1	NCBI	Bt03276369_m1
<i>PPARA; peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>	NM_001034036.1	NCBI	Bt03220822_m1
<i>SCD; stearoyl-CoA desaturase</i>	NM_173959.4	NCBI	Bt04307476_m1
<i>HMGCR; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>	NM_001105613.1	NCBI	Bt03258811_g1
<i>ACAT1; acetyl-CoA acetyltransferase 1</i>	NM_001046075.1	NCBI	Bt03238646_m1
<i>ACAT2; acetyl-CoA acetyltransferase 2</i>	NM_001075549.1	NCBI	Bt03241474_m1
<i>LCAT; lecithin-cholesterol acyltransferase</i>	NM_001046069.2	NCBI	Bt03238606_m1

Para a reação de PCR-RT junto às amostras de cDNA e às sondas, foi utilizado o TaqMan® Fast Advanced Master Mix.

Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas de 1:4 com cinco pontos para determinar a melhor diluição para cada gene e tecido estudado, assim como, para avaliar a eficiência dos *primers*. A curva padrão gerada para cada um dos genes foi representada pelo o valor Ct correspondente *versus* o log da quantidade de cDNA utilizada na reação. A partir do *slope* desta curva foi possível calcular a eficiência de amplificação (E) dos *primers*, por meio da fórmula: $E = [10(-1/Slope)-1] \times 100$. Para quantificação confiável em PCR em tempo real, o valor do *slope* deve estar num intervalo entre -3,3 a -3,8, o que corresponde a eficiência de amplificação de 83 a 100% (Tabela 5).

Tabela 5- Equação de regressão (y) e R² das reações de amplificação para cada gene-tecido e suas respectivas eficiências (%)

Gene	Tecido	Gene referência (18S)		
		Y	R ²	E (%)
<i>NFE2L2</i>	hepático	-3,3935x + 23,78	0,9999	97,10
	muscular	-3,5241x + 22,863	0,9998	92,20
<i>GPX1</i>	hepático	-3,4327x + 19,802	0,999	95,58
	muscular	-3,535x + 17,575	0,9997	91,85
<i>GPX4</i>	hepático	-3,2056x + 22,843	0,9988	105,09
	muscular	-3,1807x + 20,651	0,9987	106,25
<i>GSR</i>	hepático	-3,5213x + 24,845	0,9999	92,31
<i>GCLC</i>	hepático	-3,4658x + 25,36	0,9977	94,38
<i>GSS</i>	hepático	-3,4428x + 26,444	0,9948	95,19
<i>SREBF1</i>	hepático	-3,1175x + 23,673	0,9984	104,10
	muscular	-3,1665x + 22,117	0,9996	106,92
	adiposo	-3,3222x + 26,758	0,9999	99,57
<i>PPARA</i>	hepático	-3,4118x + 25,534	0,9998	96,14
<i>SCD</i>	hepático	-3,3137x + 23,175	0,9968	100,34
	adiposo	-3,5217x + 16,089	0,9999	92,29
<i>HMGCR</i>	hepático	-3,1462x + 24,228	0,9985	107,89
	adiposo	-3,1931x + 26,243	0,9984	105,67
<i>ACAT1</i>	hepático	-3,2305x + 23,54	0,9975	103,93
<i>ACAT2</i>	hepático	-3,2451x + 22,822	0,9985	103,31
<i>LCAT</i>	adiposo	-3,535x + 17,575	0,9997	99,29

Ainda, para a validação do experimento, foi verificado o valor absoluto do *slope* de delta Ct em comparação ao log de entrada, o qual foi < 0,1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2013). A exemplo, o gráfico de validação do gene *NFE2L2* hepático (Figura 24).

a) Curva Padrão *18S* (controle endógeno)

b) Curva Padrão *Nrf2* fígado (alvo)

c) Eficiência Relativa *18S*- *Nrf2*
Validação do Experimento

Figura 24- a e b) Cálculo da eficiência dos genes *18S* e *NFE2L2* baseado no *slope*. c) Diferença de Ct dos dois genes em estudo para a validação da comparação relativa entre ambos

Avaliada a eficiência de cada *primer* e validado o experimento, foi escolhido o melhor ponto de diluição a partir dos valores de ciclo *threshold* (Ct) e, então, iniciou-se uma série de PCR-RT. Em strips Microampoptical B-Tube Strip, o ensaio foi realizado em multiplex e duplicata para cada amostra. O volume total da reação foi de 20 µL: 10 µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 1 µL de TaqMan® Gene Expression Assays, 1 µL do controle endógeno *18S*, 1 µL da amostra de cDNA e 7 µL de água DEPC.

As placas foram cuidadosamente fechadas com tampas óticas Microampoptical B-Cap Strip, centrifugadas por 1 minuto a 1200 x g a 4°C e colocadas no sistema Step One 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, EUA), seguindo-se as indicações do fabricante (Tabela 6).

Tabela 6- Condições da termociclagem utilizada para a técnica de PCR-RT

	Incubação	Ativação da Polimerase	PCR (45 ciclos)	
			Desnaturação	Anelamento/extensão
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Tempo (min:s)	2:00	0:20	0:01	0:20

Após a execução dos 45 ciclos de PCR-RT, as curvas geradas foram avaliadas e os valores de ciclo *threshold* (Ct) e *baseline* definidos. Os valores foram exportados para o programa Excel para o cálculo da expressão gênica relativa.

5.5.5 Quantificação relativa da expressão gênica

A razão da expressão gênica relativa foi calculada de acordo com a equação proposta por Pfaffl (2001). Ou seja, os resultados foram expressos em unidades arbitrárias em relação ao gene referência escolhido e um grupo calibrador. Como grupo calibrador foi adotado os animais não suplementados (grupo C), sendo considerados como uma unidade arbitrária. A equação (1) demonstra o método de quantificação escolhido:

$$\text{Razão} = \frac{E(\text{gene alvo})^{\Delta CT(\text{Ct médio do grupo controle-C} - \text{médio do grupo tratamento})}}{E(\text{gene referência})^{\Delta CT(\text{Ct médio do grupo controle-C} - \text{médio do grupo tratamento})}}$$

Em que:

E= eficiência de amplificação;

Ct= *threshold cycle*.

5.6 Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas das diferentes expressões gênicas avaliadas considerou-se apenas taxas de expressão compreendidas entre média ± 2 desvios-padrão.

O delineamento estatístico utilizado foi do tipo inteiramente casualizado com doze repetições por tratamento e foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Em que,

- Y_{ij} é o valor observado para a taxa de expressão do gene em estudo na j-ésima repetição do i-ésimo tratamento;

- μ é a média de todas as taxas de expressão do gene em estudo;

- t_i é o efeito particular do tratamento i, sendo i=1 (dieta controle), 2 (dieta controle+antioxidantes), 3 (dieta controle+antioxidantes+óleo de canola), 4 (dieta controle+óleo de canola);

- e_{ij} é o erro aleatório associado à taxa de expressão do gene em estudo na j-ésima repetição do i-ésimo tratamento, suposto NIID ($0, \sigma_e^2$).

Em caso de resultados significativos, o teste t de *Student* foi utilizado para testar os seguintes contrastes:

C_1 = dieta controle vs. demais;

C_2 = dieta controle+Se+Vit E e dieta controle+óleo de Canola vs. dieta controle+Se+Vit E+ óleo de Canola;

C_3 = dieta controle+Se +Vit E vs. Dieta controle+óleo de Canola.

Em seguida foi estimada a correlação entre as expressões gênicas hepáticas por meio do coeficiente de correlação de *Pearson*.

Os critérios adotados para a interpretação dos valores dos coeficientes de correlação de *Pearson* foram:

- valores entre 0 e 0,5 (positivos ou negativos) = correlação baixa;

- valores entre 0,5 e 0,7 (positivos ou negativos) = correlação média;

- valores maiores que 0,7 (positivos ou negativos) = correlação alta.

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico Statistical Analysis System-SAS® (SAS Institute Inc., 2005) por meio do procedimento para modelos lineares mistos, o PROC MIXED (*procedure for mixed linear models*).

6 RESULTADOS

6.1 Amplificações do gene referência e genes-alvo

A análise dos resultados das amplificações (Ct) do gene referência e genes-alvo são apresentados na Tabela 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7- Análise dos resultados das amplificações (Ct) do gene referência *18S* pelo programa Bestkeeper

Gene <i>18S</i>	Tecido	N	Média G	Média A	Min	Máx	DP	CV [%]
<i>NFE2L2</i>	hepático	39	13,7	13,7	12,0	15,4	0,8	6,2
	muscular	45	11,9	11,9	10,8	14,7	0,6	5,2
<i>GPX1</i>	hepático	45	13,1	13,1	10,8	15,8	1,0	7,4
	muscular	46	14,4	14,5	13,1	17,8	0,8	5,6
<i>GPX4</i>	hepático	45	12,6	12,7	10,4	15,3	1,0	7,8
	muscular	36	14,9	15,0	12,3	18,8	1,8	11,7
<i>GSR</i>	hepático	44	13,6	13,7	11,1	17,2	1,0	7,3
<i>GCLC</i>	hepático	43	13,7	13,8	11,5	16,6	1,1	7,8
<i>GSS</i>	hepático	43	14,7	14,7	12,4	17,3	1,0	7,0
<i>SREBF1</i>	hepático	43	16,5	16,6	12,9	20,6	1,7	10,1
	muscular	43	15,6	15,6	14,1	18,3	0,8	4,9
	adiposo	30	15,4	15,5	13,4	20,0	0,9	5,8
<i>PPARA</i>	hepático	40	13,7	13,8	11,4	16,2	1,1	8,0
<i>SCD</i>	hepático	38	12,5	12,6	10,5	15,5	1,0	7,6
	adiposo	37	14,5	14,6	12,2	18,2	1,2	8,4
<i>HMG-CoA</i>	hepático	41	13,6	13,6	11,2	16,0	1,0	7,1
	adiposo	32	13,8	13,9	11,6	17,7	1,1	7,9
<i>ACAT1</i>	hepático	37	16,8	16,9	14,0	19,5	1,0	5,7
<i>ACAT2</i>	hepático	40	19,5	19,6	16,5	22,6	1,2	6,1
<i>LCAT</i>	adiposo	34	15,5	15,5	13,3	19,0	1,0	6,4

Ct médio: ciclo *threshold*; Média G: média geométrica; Média A: média aritmética; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Tabela 8- Análise dos resultados das amplificações (Ct) dos genes-alvo pelo programa Bestkeeper

	Alvo	Tecido	N	Média G	Média A	Min	Máx	DP	CV [%]
<i>NFE2L2</i>		hepático	39	29,57	29,57	28,69	31,56	0,44	1,49
		muscular	45	29,16	29,17	27,87	30,86	0,57	1,96
<i>GPX1</i>		hepático	45	25,12	25,13	24,31	26,44	0,41	1,64
		muscular	46	26,82	26,83	25,21	30,76	0,73	2,71
<i>GPX4</i>		hepático	45	27,67	27,68	26,29	29,49	0,64	2,32
		muscular	36	30,27	30,32	27,59	34,20	1,61	5,32
<i>GSR</i>		hepático	44	29,24	29,25	27,81	31,26	0,63	2,15
<i>GCLC</i>		hepático	43	29,67	29,69	27,88	31,85	0,85	2,87
<i>GSS</i>		hepático	43	30,31	30,32	28,89	32,01	0,59	1,95
<i>SREBF1</i>		hepático	43	31,76	31,80	28,27	35,56	1,41	4,43
		muscular	43	31,39	31,41	29,38	33,73	0,75	2,39
		adiposo	30	30,15	30,18	27,81	33,94	1,21	3,99
<i>PPARA</i>		hepático	40	27,88	27,90	26,52	29,89	0,74	2,65
<i>SCD</i>		hepático	38	28,89	28,95	25,10	34,32	1,45	5,01
		adiposo	37	22,26	22,30	20,50	25,68	0,91	4,08
<i>HMGCR</i>		hepático	41	30,05	30,06	28,30	32,58	0,82	2,74
		adiposo	32	32,87	32,89	31,46	36,54	0,90	2,74
<i>ACAT1</i>		hepático	37	29,25	29,26	28,02	31,38	0,55	1,88
<i>ACAT2</i>		hepático	40	33,96	33,98	32,13	36,17	0,75	2,20
<i>LCAT</i>		adiposo	34	31,62	31,63	29,80	33,53	0,73	2,30

Ct médio: ciclo *threshold*; Média G: média geométrica; Média A: média aritmética; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

6.2 Quantificação relativa da expressão gênica

Os resultados da expressão gênica relativa mostraram que não houve diferença na expressão dos genes avaliados entre o grupo Controle e os grupos tratados (contraste C1), exceto para um único gene em apenas um único tecido: o *GPX4* em tecido muscular, para o qual foi encontrado maior valor para o grupo controle ($P \leq 0,06$) (Tabela 9).

Porém, quando analisados os contrastes C2 (Se + Vit E e Canola *vs.* Se + Vit E + Canola) e C3 (Se + Vit E *vs.* Canola), foram encontradas diferenças na expressão de alguns genes evidenciando:

- primeiro, a suplementação isolada com antioxidantes ou óleo de canola produz efeito distinto da suplementação destes em conjunto (antioxidantes e óleo de canola);
- segundo, a suplementação com Se e vitamina E possui efeito oposto ao da suplementação com óleo de canola.

Os valores para expressão gênica relativa dos genes são apresentados na Tabela 9.

Para a representação gráfica dos valores de expressão gênica foi adotada a escala logarítmica, para tal foram calculados os logaritmos na base 2 destas grandezas em vez das grandezas propriamente ditas (Figuras 25 a 28).

Tabela 9- Quantificação relativa da expressão gênica

GENE	TECIDO	EXPRESSÃO GÊNICA				Pr > F	CONTRASTES		
		C	Se+Vit E	Canola	Se+Vit E+Canola		C1	C2	C3
<i>NFE2L2</i>	hepático	1,17	1,83	0,80	1,12	0,05	0,79	0,58	0,01
	muscular	1,13	0,93	1,04	0,93	0,62	0,27	0,72	0,54
<i>GPX1</i>	hepático	1,12	1,61	0,81	1,16	0,08	0,78	0,85	0,01
	muscular	1,07	0,92	0,90	0,87	0,69	0,25	0,78	0,89
<i>GPX4</i>	hepático	1,32	2,66	1,17	1,01	0,03	0,55	0,10	0,01
	muscular	1,01	0,74	0,85	0,64	0,06	0,02	0,19	0,42
<i>GSR</i>	hepático	1,23	1,12	0,92	1,81	0,11	0,87	0,02	0,63
<i>GCLC</i>	hepático	1,49	2,33	1,04	2,05	0,19	0,54	0,51	0,05
<i>GSS</i>	hepático	1,20	2,15	0,87	1,87	0,06	0,32	0,41	0,01
<i>SREBF1</i>	hepático	1,27	2,14	1,19	3,64	0,03	0,15	0,01	0,31
	muscular	1,18	0,71	1,24	0,91	0,10	0,21	0,75	0,03
	adiposo	1,15	1,69	1,51	1,78	0,76	0,34	0,74	0,78
<i>PPARA</i>	hepático	1,60	1,52	0,63	1,67	0,12	0,41	0,14	0,07
<i>SCD</i>	hepático	1,47	2,32	1,08	2,67	0,06	0,29	0,08	0,06
	adiposo	1,89	1,55	0,98	1,18	0,34	0,13	0,86	0,30
<i>HMGCR</i>	hepático	1,19	1,49	0,55	0,95	0,06	0,49	0,81	0,01
	adiposo	1,70	0,61	1,96	0,71	0,12	0,30	0,34	0,05
<i>ACAT 1</i>	hepático	1,32	1,53	1,11	2,57	0,08	0,39	0,02	0,50
<i>ACAT 2</i>	hepático	1,51	1,77	0,68	1,72	0,15	0,79	0,27	0,04
<i>LCAT</i>	adiposo	0,66	0,63	2,01	0,72	0,05	0,38	0,23	0,02

C1: controle *vs.* demais;

C2: Se+ Vit E e Canola *vs.* Se+Vit E+ Canola;

C3: Se+Vit E *vs.* Canola.

Figura 25- Quantificação relativa da expressão gênica para o *NFE2L2* em a) Tecido hepático ([#] $P \leq 0,05$) e b) Tecido muscular; barras representam o EPM

Figura 26- Quantificação relativa da expressão dos genes antioxidantes. a) *GPX1* em tecido hepático ($^{##}P \leq 0,08$); b) *GPX1* em tecido muscular; c) *GPX4* em tecido hepático ($^{*}P \leq 0,03$); d) *GPX4* em tecido muscular ($^{**}P \leq 0,06$); e) *GSR* em tecido hepático; f) *GCLC* em tecido hepático e g) *GSS* em tecido hepático ($^{**}P \leq 0,06$); barras representam o EPM

Figura 27- Quantificação relativa da expressão dos genes lipogênicos. a) *SREBF1* em tecido hepático ($*P \leq 0,03$); b) *SREBF1* em tecido muscular; c) *SREBF1* em tecido adiposo; d) *PPARA* em tecido hepático; e) *SCD* em tecido hepático ($**P \leq 0,06$) e f) *SCD* em tecido adiposo; barras representam o EPM

Figura 28- Quantificação relativa da expressão dos genes colesterolêmicos. a) *HMGCR* em tecido hepático ($^{**}P \leq 0,06$); b) *HMGCR* em tecido adiposo; c) *ACAT1* em tecido hepático ($^{##}P \leq 0,08$); d) *ACAT2* em tecido hepático e e) *LCAT* em tecido adiposo ($^{#}P \leq 0,05$); barras representam o EPM

6.3 Coeficientes de correlação entre expressões gênicas

Os valores dos coeficientes de correlação entre *NFE2L2* e demais genes estudados são apresentados na Tabela 10 e Figura 29; entre *SREBF1* e genes lipogênicos e colesterolêmicos na Tabela 11 e Figura 30; entre *PPARA* e genes lipogênicos e colesterolêmicos na Tabela 12 e Figura 31. Tais valores referem-se às expressões hepáticas, com exceção do gene *LCAT*, pois este foi avaliado no tecido adiposo.

Tabela 10- Valores dos coeficientes de correlação entre *NFE2L2* e demais genes

EG <i>NFE2L2</i> vs. EG	Coeficiente de correlação	P	n. de Observações
<i>GPX1</i>	0,9258	<,0001	38
<i>GPX4</i>	0,9347	<,0001	36
<i>GSR</i>	0,8405	<,0001	35
<i>GCLC</i>	0,8168	<,0001	38
<i>GSS</i>	0,9205	<,0001	38
<i>SREBF1</i>	0,2067	0,2263	36
<i>PPARA</i>	0,8643	<,0001	38
<i>SCD</i>	0,4777	0,0037	35
<i>HMGCR</i>	0,9020	<,0001	38
<i>ACAT1</i>	0,9111	<,0001	31
<i>ACAT2</i>	0,8645	<,0001	38
<i>LCAT</i>	-0,1891	0,3477	38

Expressão gênica (EG) hepática, exceto para *LCAT* (EG em tecido adiposo)

Figura 29- Correlação entre EG *NFE2L2* vs.: a) *GPX1*, b) *GPX4*, c) *GSR*, d) *GCLC*, e) *GSS*, f) *SREBF1*, g) *PPARA*, h) *SCD*, i) *HMGCR*, j) *ACAT1*, l) *ACAT2*, m) *LCAT*

Tabela 11- Valores dos coeficientes de correlação entre *SREBF1* e genes lipogênicos e colesterolêmicos

EG <i>SREBF1</i> vs. EG	Coeficiente de correlação	P	n. de Observações
<i>SCD</i>	0,6813	<,0001	39
<i>HMGCR</i>	0,2234	0,1716	39
<i>ACAT1</i>	0,6280	<,0001	31
<i>ACAT2</i>	0,5626	0,0002	38
<i>LCAT</i>	-0,1980	0,2856	38

Expressão gênica (EG) hepática, exceto para *LCAT* (EG em tecido adiposo)

Figura 30- Correlação entre EG *SREBF1* vs.: a) *SCD*, b) *HMGCR*, c) *ACAT1*, d) *ACAT2*, e) *LCAT*

Tabela 12- Valores dos coeficientes de correlação entre *PPARA* e genes lipogênicos e colesterolêmicos

EG <i>PPARA</i> vs. EG	Coeficiente de correlação	P	n. de Observações
<i>SCD</i>	0,4415	0,0062	37
<i>HMGCR</i>	0,6214	<,0001	37
<i>ACAT1</i>	0,8007	<,0001	31
<i>ACAT2</i>	0,9130	<,0001	38
<i>LCAT</i>	-0,1832	0,3240	38

Expressão gênica (EG) hepática, exceto para *LCAT* (EG em tecido adiposo)

Figura 31- Correlação entre EG *PPARA* vs.: a) *SCD*, b) *HMGCR*, c) *ACAT1*, d) *ACAT2*, e) *LCAT*.

7 DISCUSSÃO

7.1 Amplificações do gene referência e genes-alvo

Os genes referência ou controles endógenos atuam como controles internos em reações de PCR-RT com a finalidade de remover ou reduzir as diferenças da amostragem que muitas vezes estão relacionadas à quantidade e qualidade do RNA extraído. O gene endógeno ideal demonstra expressão constante e abundante em diferentes tecidos e tipos de células (OLSVIK et al., 2005).

Os genes de referência mais utilizados incluem a *beta-actina*, *gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase* (*GAPDH*), *hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase* (*HPRT*) e o *18S RNA ribossomal*, pois estes RNAs são expressos em níveis relativamente elevados em todas as células.

Com base nos dados gerados a partir de uma vasta variedade de tecidos e linhagens celulares, a Applied Application Note TaqMan (2011) recomenda o controle endógeno TaqMan Assay *18S rRNAs*. Nesta nota técnica, ela apresenta o *18S* como um gene de referência de confiança para quantificar a massa de RNA total, pois ele representa mais 80 % do total de RNA celular e por ser um RNA ribossomal, ele é transcrito por RNA polimerase diferente e sua síntese é independente de mRNA.

Dunn et al. (2003), Winterholler et al. (2006), Pavan e Duckett (2007), Fenwick et al. (2008), Rathmann et al. (2010) e Key et al. (2013) utilizaram o *housekeeping 18S rRNA* ao avaliar a expressão gênica em tecidos hepático, muscular esquelético e adiposo de bovinos.

Para analisar o comportamento de um gene como gene de referência para um determinado estudo, há uma série de programas baseados na plataforma Excel, entre eles, o Bestkeeper. Este *software* calcula a média geométrica usando os dados brutos (disponível para download no <http://www.gene-quantification.de/BestKeeper-1.zip>). Segundo este método de avaliação, quanto menor o desvio-padrão das médias de Ct, maior será a estabilidade do gene referência, sendo desejável que este não ultrapasse o valor de 1, como ocorreu para a maioria das situações analisadas (Tabela 7).

Vandesompele et al. (2002) defendem o uso de múltiplos genes de referência. No entanto, nem sempre é possível medir múltiplos genes de referência devido à limitada disponibilidade e custo da amostra. Além disso, ainda que vários genes sejam avaliados, a resolução do ensaio permanece particularmente dependente da variabilidade dos genes de referência escolhidos para teste.

7.2 Quantificação relativa da expressão gênica

7.2.1 Quantificação relativa da expressão gênica de *NFE2L2*

O gene *NFE2L2* codifica o fator nuclear eritróide derivado 2 tipo 2 (NCBI, 2014), o qual é fator de transcrição-chave na defesa celular contra o estresse oxidativo (KIM et al., 2010) e começa a ter sua importância reconhecida também no metabolismo lipídico (VOMHOF-DeKREY; PICKLO, 2012).

No presente estudo, a expressão de *NFE2L2* hepático foi 2,28 vezes maior para o grupo Se + Vit E em relação ao grupo Canola (respectivamente 1,83 vs. 0,80; C3; $P \leq 0,05$ -Tabela 9, Figura 25a). Os resultados sugerem um efeito antagônico entre as suplementações com estes antioxidantes e a suplementação óleo de canola. Porém, a expressão deste mesmo gene não foi alterada no tecido muscular ($P = 0,62$; Tabela 9, Figura 25b).

O fator de transcrição *NFE2L2* é expresso em muitos tecidos (MOI et al., 1994), particularmente no fígado (MOTOHASHI et al., 2002), um órgão detoxificador, o que justifica a diferença de expressão neste tecido.

Há um consenso sobre o papel regulador do Keap1 sobre *NFE2L2*, porém os eventos de sinalização que estão na base da capacidade de alguns estresses químicos e ambientais interromperem a interação entre essas duas proteínas e ativar *NFE2L2* não estão totalmente elucidados.

Para Niture et al. (2013), antioxidantes são potentes ativadores de *NFE2L2*, pois eles produzem um pequeno estresse oxidativo ao serem metabolizados, o qual sinaliza a ativação deste. Eles descreveram quatro fases deste complexo mecanismo de transdução de sinal deste o antioxidante até o *NFE2L2*. A exposição celular aos antioxidantes leva a uma resposta de pré-indução (primeira fase) em que os inibidores de *NFE2L2* são exportados do núcleo e tirosinas quinases fosforilam estes inibidores. Dentro de 30 min- 1h de exposição aos antioxidantes ocorre exportação nuclear, ubiquitinação e, por fim, degradação destes inibidores. A exportação e degradação dos inibidores de *NFE2L2* permitem a importação nuclear de *NFE2L2* e a indução eficiente da expressão de genes citoprotetores.

Brigelius-Flohé e Banning (2006), após uma revisão sobre os efeitos do selênio e o papel do *NFE2L2*, concluíram que o selênio pode ativar a via Keap1/*NFE2L2* e afirmaram a existência de sinergismo entre ambos. Seis anos depois, Brigelius-Flohé e colaboradores apresentaram que o selênio exerce seus efeitos antioxidantes principalmente como parte de selenoproteínas com função redox e regula genes/enzimas de resposta adaptativa

(BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2012). Segundo Marchan e Bolt (2013), o potencial do uso terapêutico do selênio ainda não foi suficientemente explorado.

Muller et al. (2010) descreveram que o selênio em altas concentrações ativou o NFE2L2 por meio da modificação de tióis críticos em Keap1.

Para Copple et al. (2008), a regulação de NFE2L2 depende tanto da modificação de resíduos de cisteína dentro de Keap1 quanto da fosforilação de NFE2L2 sendo que ambos podem ser ativados pela vitamina E. No primeiro, o α -tocoferol atua como antioxidante sendo oxidado a α -tocoferol quinona e então oxida o grupo tiol da proteína Keap1. No segundo, o α -tocoferol induz a ativação das vias PI3-quinase (PI3K) e MAP-quinase (MAPK). Tal mecanismo foi comprovado por Numakawa et al. (2006), eles observaram que a suplementação com α -tocoferol impediu a morte celular de neurônios corticais em cultura sob estresse oxidativo estimulado por H₂O₂, mas quando usaram U0126 (inibidor da via de MAPK) e LY294002 (inibidor de PI3K), ocorreu morte celular, pois bloquearam as vias ativadas por este análogo da vitamina E.

Feng et al. (2010) demonstraram que o tratamento de cultura de células humanas do epitélio pigmentar da retina com α -tocoferol ativou a via Keap1/NFE2L2 e aumentou a expressão de NFE2L2 ($\approx 40\%$; $P < 0,01$).

Dworski et al. (2011) investigaram o efeito da inflamação alérgica na expressão de NFE2L2 em macrófagos alveolares e a modulação do efeito do tratamento prolongado com doses elevadas de vitamina E em humanos asmáticos atópicos. O estudo mostrou que a suplementação de 1500 UI de vitamina E durante 16 semanas contribuiu para regulação da via NFE2L2. Este foi o primeiro estudo a demonstrar que a expressão comprometida de NFE2L2 em humanos asmáticos foi restaurada pela vitamina E.

Porém, a vitamina E tem papel controverso na ativação de NFE2L2, pois outros estudos como o realizado por Li et al. (2012) em ratos, demonstraram que as ações antioxidantes e anti-inflamatórias da vitamina E foram independentes de NFE2L2.

Em 2008, Burk e colaboradores defenderam que os mecanismos de defesa antioxidante do selênio e da vitamina E eram independentes, pois em seu estudo com ratos observaram que a deficiência de selênio induziu estresse oxidativo e modificou o metabolismo xenobiótico, mas a deficiência de vitamina E não acarretou em tais prejuízos. Para eles a explicação para a independência entre os mecanismos destes antioxidantes pode estar no fato da vitamina E estar restrita a membranas e domínios lipídicos, enquanto o selênio está presente no citosol.

No presente estudo, a suplementação com antioxidantes foi realizada de forma conjunta, assim como em outros estudos, o que impossibilita separar o efeito de cada um deles sobre a indução da expressão de *NFE2L2*. Baseados nisso, Mark et al., (2000); Wei et al., (2004) e Steevens et al., (2010) realizaram estudos de coorte e destacaram a eficiência do selênio em detrimento a outros antioxidantes utilizados em associação, inclusive a vitamina E.

A literatura disponível quanto aos efeitos da suplementação com gorduras sobre a expressão de *NFE2L2* também apresenta discrepâncias.

Toye et al. (2007) notaram que camundongos recebendo dietas ricas em gorduras (32% em peso de banha; 8% em peso de óleo de milho), reduziram os níveis de mRNA de *NFE2L2*.

Tanaka et al. (2008) obtiveram resultados similares trabalhando com camundongos e dietas ricas em gorduras (35% banha). Yu et al. (2011) demonstraram redução da quantidade de *NFE2L2* nuclear e aumento da expressão de Keap1 (dietas com 45% em peso de gordura de fonte não descrita). No mesmo ano, Kay e sua equipe demonstram redução na expressão de *NFE2L2* em camundongos alimentados com dietas enriquecidas com óleo de soja (2,5% em peso) e gordura suína (25% em peso).

Segundo Vomhof-Dekrey e Matthew (2012) é concebível que uma dieta de elevado teor de gordura e resistência à insulina possa reduzir a atividade da via *NFE2L2*/ARE.

Contudo, Kim et al. (2004) trabalhando com dietas ricas em gordura provenientes do óleo de soja (36% das calorias) e Huang et al. (2010) provenientes do leite (42% das calorias) observaram aumento de mRNA de *NFE2L2*.

Diferente da gordura de suínos, o óleo de soja contém apreciáveis quantidades de ácidos graxos n-3, o qual pode atenuar a resistência à insulina e cujos produtos de oxidação podem ativar a via *NFE2L2* (TANAKA et al., 2008).

A oxidação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados resulta na formação de intermediários bioativos como o 4-hidroxinonenal. A partir de peroxidação e degradação de n-6, tais como o ácido linoleico, é formado o 4-hidroxinonenal (HNE), um aldeído de nove carbonos. O HNE exerce bidirecionalidade no seu efeito sobre as células e tecidos; em níveis baixos, sub-tóxicos, o HNE é cardioprotetor e induz supra-regulação de muitas enzimas responsáveis pela sobrevivência das células, mas é citotóxico em níveis elevados. Já a peroxidação não enzimática de n-3, tais como o ácido alfa-linolênico, DHA, EPA acarreta na formação de 4-hidroxihexenal (HHE), um aldeído de seis carbonos com muitas similaridades com o HNE, mas ligeiramente menos eletrofílico. Tanto o HNE quanto o HHE demonstraram

ativar *NFE2L2* (Gao et al., Levonen et al., Mann et al., 2007; Zhang et al., 2010 e Ishikado et al., 2010 *apud* Anderson et al., 2012).

Segundo Anderson et al. (2012), os produtos de oxidação lipídica podem ativar o *NFE2L2* por meio do esgotamento de GSH e/ou modificação direta de Keap1. Ou seja, a fonte de energia dos macronutrientes pode regular as respostas de defesa antioxidantes celulares e influenciar na capacidade do organismo para resistir a estados de doença associados ao estresse oxidativo elevado.

No presente estudo, a suplementação com óleo de canola não induziu a expressão de *NFE2L2*, sendo inferior quando comparada ao grupo suplementado com antioxidantes e numericamente inferior aos grupos controle e suplementado com antioxidantes associados ao óleo de canola. Como apresentado anteriormente por outros pesquisadores, podem ser propostas duas alternativas para esta resposta: ou o aumento no teor de gordura inibiu a expressão de *NFE2L2*; ou não ocorreu a formação de produtos de oxidação de n-3 e n-6 em quantidade suficiente para alterar o equilíbrio da glutatona e/ou modificar Keap1 e ativar a expressão de *NFE2L2*.

Até o momento, não existem registros na literatura a respeito dos efeitos da suplementação de selênio e vitamina E e/ou óleo de canola sobre a expressão de *NFE2L2* em bovinos. Considerando os resultados de expressão deste gene frente às suplementações, sugere-se que os antioxidantes Se e vitamina E ativaram sua expressão enquanto o óleo de canola a inibiu, o que, por sua vez, pode ter sido consequência do teor de gordura ou de quantidade insuficiente de n-3/n-6 e seus respectivos produtos de oxidação. Ainda, quando associados, o valor da expressão gênica aproximou-se do valor do grupo controle, como se juntos seus efeitos se anulassem por serem opostos; ou porque o óleo de canola favoreceu o efeito da vitamina E em induzir a expressão de *NFE2L2*, uma vez que se trata de uma vitamina lipossolúvel.

7.2.2 Quantificação relativa dos genes antioxidantes

7.2.2.1 Quantificação relativa da expressão gênica de *GPX1* e *GPX4*

Os genes *GPXs* codificam as enzimas glutatonas peroxidases (NCBI, 2014), as quais são responsáveis por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da conversão de GSH a GSSG (SURAI, 2006).

No presente estudo a expressão gênica hepática de *GPX1* foi aproximadamente 2 vezes maior para o grupo suplementado com selênio e vitamina E em relação ao grupo que recebeu óleo de canola ($P \leq 0,08$; respectivamente 1,61 vs. 0,81- Tabela 9, Figura 26a). Neste mesmo tecido, a expressão do gene *GPX4* aumentou cerca de 2,3 vezes no grupo suplementado com Se e vitamina E em relação ao grupo suplementado com canola ($P \leq 0,03$; 2,66 vs. 1,17- Tabela 9, Figura 26 c).

Correa et al. (2014) avaliaram a atividade de glutathione peroxidase a partir de amostras coletadas do fígado dos mesmos animais utilizados pelo presente experimento. Tal análise encontrou maior atividade hepática para esta enzima nos animais que receberam suplementações com Se + Vit E e Se + Vit E + Canola (CORREA et al., 2014). Ou seja, os animais que receberam em sua dieta suplementação de Se e vitamina E responderam com maior número de transcritos de mRNA para *GPX1* e *GPX4* e, conseqüentemente, apresentaram maior atividade da enzima GPX total.

A expressão de *GPX1* no tecido muscular foi semelhante entre todos os grupos ($P=0,69$ - Tabela 9, Figura 26b). Já o gene *GPX4* apresentou maior expressão no grupo controle ($P=0,06$, Tabela 9, Figura 26 d).

Correa e colaboradores (2013) analisaram a extensão da estabilidade lipídica da carne obtida a partir no abate dos mesmos animais utilizados por este experimento para a avaliação da expressão gênica. Tal análise foi realizada por meio do teste de TBARs (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico) e revelou que a suplementação com selênio e vitamina E reduziu a oxidação lipídica no músculo *L. dorsi*, uma vez que a oxidação lipídica muscular foi menor, não houve esgotamento de GSH e, conseqüentemente não houve esgotamento de GPX4, o que corrobora com menores valores de expressão de *GPX4* no tecido muscular para os grupos suplementados frente ao grupo controle.

A revisão realizada por Brigelius-Flohé e Banning (2006) mostrou o consumo de selênio como otimizador da expressão de selenoproteínas, entre elas, as GPXs. Segundo estes autores, a ingestão de selênio é requerida para a expressão de GPX no plasma.

Corroborando com estes autores, Muller et al. (2010) descreveram a expressão de selenoproteínas como dependente do *status* celular de Se após realizarem um trabalho, no qual compararam ratos machos que receberam dietas deficientes em selênio (0,086 mg de Se/Kg) e dietas adequadas de Se (0,15 mg de Se/ kg) e observaram 48 genes relacionados a expressão de enzimas de fase II. Neste mesmo estudo, reportaram que tais enzimas foram altamente expressas no fígado.

Berno et al. (2010), também observaram o efeito das variações da concentração de selênio sobre a atividade de GPX e o aumento da biodisponibilidade deste mineral quando associado à vitamina E. Tal benefício também foi citado por Coutinho (2003) ao avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) como fonte de selênio para o homem.

Porém, Li et al. (1996) relataram que não houve alteração da expressão de *GPX1* em cardiomiócitos ventriculares humanos incubados com 200 µM de α-tocoferol.

Segundo Burk et al. (2008), a GPX1 tem papel antioxidante reservado para casos de estresse oxidativo severo.

O presente estudo revelou que o aumento de expressão gênica hepática foi mais proeminente para *GPX4* do que para *GPX1*.

Outra explicação para a diferença entre as expressões destes genes está no direcionamento de Se para a síntese das proteínas por eles traduzidas. Acredita-se que a ordem de direcionamento de selênio para as GPXs seja: $GPX2 > GPX4 > GPX3 = GPX1$. A GPX1 apresenta resposta mais rápida à depleção de selênio e após a repleção, demora mais tempo para se tornar detectável e atingir novamente os níveis máximos de expressão (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

Romanowska et al. (2007), em trabalho com diferentes linhagens de células cancerosas humanas, encontraram que a expressão de *GPX1* e *GPX4* nestas células dependia de uma dose mínima de selênio (100 nM). Mas, em uma das linhagens, eles observaram que *GPX1* apresentou expressão mínima independente da concentração de selênio, enquanto *GPX4* foi altamente responsiva à suplementação.

Ou seja, a síntese de selenoproteínas é totalmente dependente da disponibilidade de selênio, mas o direcionamento do mineral para as selenoproteínas não é o mesmo (COMINETTI et al., 2011).

Outra característica interessante da expressão gênica de *GPX1* e *GPX4* no tecido hepático foi a semelhança entre seus perfis de expressão e o perfil de expressão do fator *NFE2L2* comprovada pela alta correlação positiva entre estes genes, respectivamente 0,9258 e 0,9347 ($P < 0,0001$ -Tabela 10, Figura 29a e 29b).

Tal resposta pode ser explicada, pois o *NFE2L2* é fator de transcrição para *GPXs* (KIM et al., 2010).

Segundo Lee e Johnson (2004), o gene *NFE2L2* controla a expressão de enzimas de detoxificação e proteínas antioxidantes, entre elas a GPX.

Cho et al. (2005) mostraram que a expressão de GPX1 foi 7,24 vezes maior em ratos NFE2L2^{+/+} em relação a ratos NFE2L2^{-/-}.

Purdom-Dickison et al. (2007), verificaram que a sobre-expressão de *NFE2L2* causou aumento da atividade transcricional de ARE (elementos responsivos a antioxidantes) e, consequentemente, aumentou a expressão de GPX.

Kaspar et al. (2009) estudaram a via de sinalização NFE2L2:INFE2L2 no estresse oxidativo e apontaram o *GPX* entre os genes regulados por NFE2L2.

Wu et al. (2011) ativaram a expressão de *NFE2L2* em células tronco embrionárias de ratos com o uso de arsênico inorgânico e, como consequência, também observaram a maior expressão de *GPX4*.

Quanto ao efeito da suplementação de óleos como o de canola, Wang et al. (2009) relataram a ativação de genes citoprotetores regulados por AREs a partir do produto de oxidação do ácido linoleico, assim como foi descrito anteriormente para o gene *NFE2L2*. É possível que a ativação de *GPX*, assim como de outros genes regulados por AREs, seja decorrente da ativação primária de *NFE2L2*. Porém, se o efeito dos lipídios sobre o *NFE2L2* for de inibição, a expressão de *GPX* também será inibida, como sugere os resultados deste experimento.

7.2.2.2 Quantificação relativa da expressão gênica de *GSR*

O gene *GSR* codifica a enzima glutathione redutase (NCBI, 2014), a qual é responsável pela regeneração da glutathione no meio celular (SURAI, 2006).

No presente estudo não houve diferença entre os grupos para os valores de expressão do gene *GSR* (P=0,11- Tabela 9; Figura 26e).

Muller et al. (2010) analisaram a resposta do gene *GSR* a dietas selênio-adequadas e selênio-deficientes e encontraram maior expressão na deficiência deste mineral. Todas as dietas fornecidas aos animais do presente experimento foram selênio-adequadas, o que justifica a expressão estável de *GSR* entre os grupos.

Anderson et al. (2012) observaram maior atividade da glutathione redutase (*GSR*) em camundongos alimentados com n-3 e com níveis elevados de HHE. Ou seja, assim como foi anteriormente descrito para o gene *NFE2L2*.

O presente trabalho encontrou correlação positiva e alta entre estes genes *NFE2L2* e *GSR* (0,8461; P<0,0001- Tabela 10, Figura 29 c).

Thimmulappa et al. (2006) realizaram uma análise comparativa da expressão de genes entre grupos de camundongos tipo selvagem (*NFE2L2*^{+/+}) e *knockout* (*NFE2L2*^{-/-}) tratados com sulforafano (9 µmol / dia durante 1 semana, PO) para a identificação de genes regulados por *NFE2L2*, entre eles, encontraram o *GSR*.

Kumar et al. (2014) em revisão sobre moduladores de *NFE2L2* derivados de produtos naturais também afirmou a regulação da expressão de *GSR* por *NFE2L2*.

7.2.2.3 Quantificação relativa da expressão gênica de *GCLC* e *GSS*

Os genes *GCLC* e *GSS* codificam enzimas necessárias para a síntese de glutathiona-glutamato cisteína ligase catalítica e glutathiona sintetase, respectivamente (NCBI, 2014). Tais enzimas participam da síntese da glutathiona, a qual é responsável pela detoxificação de xenobióticos e seus metabólicos (LU, 2009).

No presente trabalho a expressão gênica de *GCLC* não apresentou diferença entre os grupos (P=0,19; Tabela 9, Figura 26f), mas a de *GSS*, sim. O número de transcritos de mRNA *GSS* foi 2,5 vezes maior para o grupo suplementado com antioxidantes em relação ao suplementado com óleo de canola (P≤0,06- Tabela 9, Figura 26g).

Também foi encontrada correlação alta e positiva entre os genes *NFE2L2* e *GCLC/GSS* (0,81676/0,92055, respectivamente; P<0,0001- Tabela 10; Figura 29 e/d, respectivamente).

Segundo Lu (2009), o *NFE2L2* é um importante regulador transcricional para *GCLC* e *GSS*.

Yang et al. (2002) descreveram a via *NFE2L2* para a modulação da expressão para *GSS*. Três anos depois, estes mesmos autores descreveram esta mesma via para *GCLC* (Yang et al., 2005). No entanto, Benassi et al. (2006) propuseram outra via para *GCLC*, a c-Myc. A ativação de vias distintas poderia explicar a ausência de efeito sobre a expressão de *GCLC* e, ao mesmo tempo, o aumento de expressão para *GSS* para o grupo Se + Vit E em relação ao grupo Canola.

Luo et al. (1998) observaram em estudos a partir de traumas cirúrgicos a diminuição dos níveis de GSH e *GSS* no músculo esquelético humano, enquanto *GCLC* manteve-se inalterada. Ou seja, a expressão destes genes pode sim apresentar comportamento distinto como o encontrado neste trabalho.

Kim et al. (2004) trabalhando com dietas ricas em gordura provenientes do óleo de soja (36% das calorias) e Huang et al. (2010) provenientes do leite (42% das calorias)

observaram aumento de mRNA de *NFE2L2* e da enzima glutamato cisteína ligase subunidade catalítica (GCLC).

Purdom-Dickison et al. (2007) verificaram que a sobre-expressão de *NFE2L2* aumentou a atividade transcricional de ARE (elementos responsivos a antioxidantes) e a expressão de várias enzimas antioxidantes ARE-dependentes e citoprotetoras, entre elas, a GCLC.

Portanto, o presente estudo sugere que a expressão do gene *GSS* pode ser ativada a partir da indução de *NFE2L2* pela suplementação com Se e vitamina E (via *NFE2L2*/ARE) enquanto a de *GCLC* se mantém constante, a qual, por sua vez, pode depender da ativação de outra via. De forma oposta, o óleo de canola parece impedir a expressão de *GSS*, tal efeito pode ser consequência da ação deste óleo em inibir *NFE2L2*.

7.2.3 Quantificação relativa da expressão dos genes lipogênicos

7.2.3.1 Quantificação relativa da expressão gênica de *SREBF1*

O gene *SREBF1* regula a expressão de genes responsáveis pela síntese de lipídios, entre eles, o *SCD* (SIMOMUTRA et al., 1998).

O presente estudo mostrou que houve diferença para a expressão gênica de *SREBF1* no tecido hepático. Os grupos Se + Vit E e Canola vs. Se + Vit E + Canola (C2) diferiram entre si ($P \leq 0,03$; Tabela 9, Figura 27a). A expressão do mesmo gene nos tecidos muscular e adiposo foi similar entre os grupos (respectivamente $P = 0,10$ e $0,76$; Tabela 9, Figura 27b e Figura 27c). Ou seja, as suplementações destes antioxidantes associado ao óleo de canola induziu a maior expressão hepática de *SREBF1* em relação ao fornecimento de forma isolada.

Ntambi (1999) descreveu um modelo em que os PUFA's inibem a maturação proteolítica de SREBP. Ele baseou-se nos trabalhos de Worgall et al. e Thewke et al. (1998), nos quais PUFA's e ácido oleico reduziram a expressão de promotores com elemento responsivo ao esterol (SER) por inibir a maturação proteolítica de SREBP.

Xu et al. (1999) observaram diminuição de precursores de SREBP (65%) e de nSREBP (85%) em células HepG2 decorrente da suplementação com óleo de cártamo e óleo de peixe, ambos ricos em PUFA's da série n-3 e n-6. Para estes autores o *SREBF1* é o principal fator de transcrição responsável pela supressão de genes lipogênicos na presença de PUFA's. Outro estudo publicado naquele mesmo ano relatou a redução na quantidade de

nSREBP em consequência da sub regulação de mRNA *SREBF1* em fígado de ratos (KIM et al., 1999).

Em 2002, Xu e colaboradores suplementaram ratos com estes mesmo óleos- cártamo e peixe (10 g de óleo/100 g da dieta) e observaram redução de 46% de SREBP-1 e 37% de *SREBF1* para o óleo de cártamo e 20% tanto da proteína quanto de mRNA deste gene para o óleo de peixe. Eles observaram que o efeito de PUFA's sobre a redução de nSREBP-1 ocorreu porque os ácidos graxos inibiram o processo proteolítico de maturação e a segregação dos precursores ancorados na membrana do retículo endoplasmático, porém a forma como PUFA's regularam o processo de maturação de SREBP-1 permaneceu desconhecido.

Waters et al. (2008) foram os primeiros a avaliarem a expressão de *SREBF1* em bovinos. Após suplementarem os animais com 2% de óleo de peixe + 6% de óleo de soja durante 100 dias, eles observaram redução da expressão muscular de *SREBF1*, a qual foi 2 vezes menor para os animais que receberam óleo de peixe associado ao óleo de soja em relação aos animais que receberam apenas óleo de soja (8%) ($P < 0,05$).

O presente experimento não registrou tal supressão sob *SREBF1*, mas observou efeito oposto a este na associação do óleo de canola com Se e vitamina E. Tal efeito ainda não tinha sido descrito até o momento, mas pode ser uma evidência de que a ativação/inibição por PUFA's dependa da estrutura destes ácidos graxos, por possuírem insaturações eles são mais suscetíveis a espécies que reagem com suas moléculas e acarretam em mudanças na sua estrutura e formação de intermediários bioativos (ANDERSON et al., 2012). Quando PUFA's são fornecidos juntos a antioxidantes tais reações podem ser impedidas, assim como alterações conformacionais e, por fim, a inibição da transcrição de *SREBF1* não ocorrer. A maior transcrição do gene *SREBF1* também pode ter sido favorecida pela associação entre vitamina E e óleo de canola.

Outro aspecto relevante sobre a expressão do gene *SREBF1* é sua relação com o fator NFE2L2. Este estudo encontrou baixa correlação da expressão do gene *SREBF1* com a do gene *NFE2L2*, mas positiva (0,20675; $P = 0,2263$ - Tabela 10, Figura 29 f).

Segundo Vomhof-Dekrey et al. (2012) as informações sobre o efeito de *NFE2L2* sobre o metabolismo lipídico são conflitantes. Seo e Lee (2013), em revisão sobre o papel de *NFE2L2*, também ressaltaram o papel controverso deste gene em relação ao *SREBF1* e ao metabolismo lipídico.

Huang et al. (2010) propuseram o mecanismo molecular pelo qual o fator de transcrição NFE2L2 funciona como regulador de genes lipídicos hepáticos. Eles identificaram, entre uma série de genes lipídicos, o gene *SREBF1* como alvo direto da

ativação de *NFE2L2* e encontraram a expressão deste gene crítico para o metabolismo lipídico aumentada em camundongos *NFE2L2*^{+/+} em que o fator NFE2L2 estava sobre expresso, mas diminuído em camundongos *NFE2L2*^{-/-}.

Em estudo recente, Wang et al. (2013) relataram os efeitos da exposição crônica ao álcool no fígado de ratos com atenção especial ao aumento da expressão de *NFE2L2* e *SREBF1*.

De forma oposta, Tanaka et al. (2008) reportaram a redução da expressão de *SREBF1* por ação de *NFE2L2* ao comparar ratos *NFE2L2*^{+/+} e *NFE2L2 knockout*.

Wu et al. (2011) apresentaram o *NFE2L2* como inibidor da expressão de *SREBPs*. Para eles a relação entre estes genes envolve o cofator NADPH, primordial tanto para as vias lipídicas quanto antioxidantes; pois tanto fornece equivalentes redutores para reações biossintéticas (síntese de lipídios e desaturação de ácidos graxos) quanto participa das reações de redução do estresse oxidativo. No modelo proposto por estes pesquisadores, o *NFE2L2* regula o fornecimento de NADPH: ele favorece o uso deste cofator pelas vias antioxidantes ao invés de permitir seu uso para a síntese de lipídios.

Vomhof-Dekrey et al. (2012) apontaram o *NFE2L2* como supressor da expressão de vários genes e proteínas necessárias para síntese de lipídios.

Ludtman et al. (2013) também consideraram o *NFE2L2* como repressor da síntese de lipídios e apresentaram o envolvimento deste na geração de NADPH a partir da regulação que este exerce sobre os genes da enzima málica-1 (ME-1), isocitrato desidrogenase (IDH-1), glucose-6-fosfato (G6PD), translocase e transcetolase.

Para Seo e Lee (2013), a diferença encontrada entre todos estes estudos ao avaliar o papel de *NFE2L2* sobre *SREBF1* pode estar em ora usarem modelos *knockout*, ora usarem drogas-chave ora para indução, ora para inibição destes genes.

7.2.3.2 Quantificação relativa da expressão gênica de *PPARA*

A ativação do gene *PPARA* resulta em maior queima de energia e redução de ácidos graxos estocados, a qual ocorre principalmente no fígado e evita acúmulo de gordura e esteatose (RAO; REDDEY, 2004).

No presente trabalho o gene *PPARA* respondeu de maneira semelhante para todos os grupos avaliados (P= 0,12; Tabela 9, Figura 27d). Este resultado corroborara com o estudo conduzido por Water et al. (2008), pois os bovinos suplementados com óleo neste estudo também não alteraram a expressão de *PPARA*.

Para Bing et al. e Clark et al. (1997), os PUFA's participam da modulação de genes do metabolismo lipídico sem envolver a participação de PPARs (BING et al., 1997; CLARK et al., 1997).

Ao contrário, Whali et al. (1995) observaram a ativação de PPARA a partir de ácidos graxos n-3 e n-6.

Segundo a hipótese redigida por Clarke e Jump (1996), PPARs são ativados por PUFA's e, uma vez ativados, estes fatores de transcrição nucleares induzem a expressão de outros genes que codificam enzimas de oxidação lipídica, portanto, agem como ativadores endógenos.

Volker et al. (2000) suspeitam que a ativação de PPARA seja responsiva aos produtos de oxidação de ácidos graxos da série n-3. Para eles, a oxidação lipídica pode ser o primeiro passo para a geração de agonistas de *PPAR*.

Para Harbor (2010), os próprios ácidos graxos são capazes de se ligarem ao PPARA e ativarem a expressão deste. Segundo esta pesquisadora, o ácido linoleico e o leucotrieno B4 são ligantes naturais e agonistas de PPARA.

Grygiel-Górniak (2014) identificou uma cavidade de ligação 3-4 vezes maior no receptor nuclear de PPARA do que em aos outros receptores nucleares. Segundo este autor, tal cavidade tem capacidade para acomodar ampla variedade de ácidos graxos naturais ou sintéticos, entre eles, ácidos graxos essenciais, os quais agem como agonistas de PPARs, assim como, os leucotrienos B4.

O presente trabalho também observou correlação alta e positiva entre a expressão de *PPARA* e a de *NFE2L2* (0,8643; $P < 0,0001$ - Tabela 10, Figura 29 g).

Brigelius e Banning (2006) relataram vários alvos de *NFE2L2* e, entre eles, a enzima leucotrieno B4 desidrogenase responsável pela síntese de leucotrieno B4. Sendo assim, maior expressão de *NFE2L2* poderia gerar maior quantidade de leucotrieno B4 e, conseqüentemente, a indução de PPARA.

Hybertson et al. (2011) usaram o ativador sintético de *NFE2L2*- o Protandim- em cultura de células extraídas da veia umbilical humana e observaram aumento de 2,21 vezes na expressão de *PPARA*. Ao contrário, Huang et al. (2010) observaram sobre regulação de *PPARA* em ratos *NFE2L2*^{-/-} em relação a *NFE2L2*^{+/+} e sugeriram o *NFE2L2* como um inibidor de *PPARA*.

Sendo assim, o presente trabalho sugere que o gene *PPARA* seja ativado pela maior expressão de *NFE2L2* e, uma vez que a quantidade de transcritos de mRNA *PPARA* foi numericamente inferior para o grupo Canola, a suplementação com óleo de canola parece

inibir a expressão deste gene, talvez até mesmo como consequência da menor expressão de *NFE2L2* neste grupo.

7.2.3.3 Quantificação relativa da expressão gênica de *SCD*

O gene *SCD* codifica a enzima estearoil - CoA dessaturase ou delta-9-desaturase (NCBI, 2014). A estearoil - CoA dessaturase (*SCD*) catalisa a biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) a partir de ácidos graxos saturados e é responsável pela produção endógena de CLAs (BAUMGARD, 2000).

No presente trabalho a expressão gênica de *SCD* foi aproximadamente 2 vezes maior para o grupo Se + Vit E em relação ao grupo Canola no tecido hepático (respectivamente 2,32 vs. 1,08; $P \leq 0,06$ - Tabela 9, Figura 27a).

Waters et al. (2008) relataram inibição da transcrição de *SCD* no músculo bovino relacionada a ingestão de n-3 com período mínimo de suplementação de 50 dias e máximo de 100 dias.

No tecido adiposo não houve diferença entre os grupos ($P = 0,34$; Tabela 10, Figura 27b).

Sessler et al. (1996) relataram que PUFAs regulam a expressão gênica de *SCD* nos hepatócitos e adipócitos por diferentes mecanismos. Segundo o estudo destes autores, ao contrário do que ocorre nos hepatócitos, nos tecidos adiposos o maior determinante para a abundância de mRNA *SCD* em resposta a PUFAs são as mudanças encontradas na estabilidade do mRNA.

Assim como no presente estudo, Pavan e Duckett (2007) também não encontraram diferença na expressão de *SCD* no tecido adiposo de novilhos suplementados com óleo de milho (0,75 g/ Kg de PV e 1,5 g/ kg de PV).

O óleo de canola é composto basicamente por 10% de ácido linolênico (C 18:3 n-3), 22% de ácido linoleico (C 18:2 n-6) e 58% ácido oleico (C 18:1 n-9) (FURUYA et al., 1997).

Ao longo das últimas quatro décadas, uma série de estudos demonstraram os efeitos destes ácidos graxos sobre a atividade de *SCD* e expressão de *SCD*.

Em 1978, Jeffcoat e James reportaram queda de 60% na atividade de *SCD* hepática em camundongos alimentados com dieta contendo 60% de ácido linoleico.

Landau et al. (1978), Garg et al. (1986) e Grag et al. (1988) registraram que dietas ricas em ácidos graxos saturados e colesterol induziram a atividade hepática de *SCD* em camundongos, enquanto dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados e CLA diminuíram a

atividade de *SCD*. Sendo a mudança na atividade enzimática consequência da expressão gênica alterada, acredita-se que PUFAs desempenhem papel transcricional (NTAMBI, 1999).

Clarke e Jump (1993) relatam uma série de estudos com ácidos graxos de cadeia longa (por exemplo, 18:2 n-6; 18:3 n-6; 20:4 n-3, 20:5 n-3, 22:6 n-3) evidenciando que tais reprimem a expressão de genes que codificam enzimas lipogênicas, entre eles, o *SCD*. Estes mesmos autores em 1996, propuseram como requisito básico para um ácido graxo inibir a expressão de genes lipogênicos, conter 18 carbonos e pelo menos duas ligações duplas conjugadas nas posições 9 e 12.

Sessler et al. (1996) mostraram que a expressão de *SCD* foi reduzida de maneira dose-dependente pela adição de PUFA n-6, ácido linoleico e ácido araquidônico em linhagem de células murinas.

Lee et al. (1998) verificam que o isômero trans 10-cis 12 também reprimiu a expressão de mRNA de *SCD* hepático em camundongos.

Keating et al. (2006) relataram a sub regulação de *SCD* pelo ácido oleico (n-9).

Ntambi (1999) descreveu em sua revisão de literatura: “Os efeitos inibitórios que o ácido linoleico e outros ácidos graxos poli-insaturados possuem sobre a expressão de mRNA de *SCD* pode ser relacionado com a posição e a orientação de apenas uma das duplas ligações presentes em todos estes ácidos graxos.” Estas informações tornam fundamental a determinação da estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados que inibem a expressão do gene.

Os mecanismos pelos quais os PUFAs regulam a expressão do gene *SCD* em diferentes tecidos ainda são pouco compreendidos. Estudos tem predicado a hipótese da existência da ação de um elemento de resposta PUFA (PUFA-RE, elemento responsivo a PUFA) existir nos promotores do gene *SCD*.

Em 1997, Waters e colaboradores localizaram a região responsiva a PUFAs no gene *SCD*.

Dois anos depois, Ntambi (1999) propôs o modelo de regulação de *SCD* por PUFAs. Segundo este modelo, PUFAs se ligam a uma proteína de ligação-putativa (PUFA-BP) e reprimem a transcrição do gene *SCD* ao mesmo tempo em que bloqueiam a maturação proteolítica de SREBPs (descrita anteriormente).

O estudo de Waters et al. (2008) utilizou este modelo para explicar a interação negativa entre PUFAs da série n-3 e o gene *SCD* em seu experimento com bovinos.

Neste mesmo ano, outro trabalho interessante foi publicado por Valastyan et al. (2008). Eles suplementaram cultura de células hepáticas (HepG2C3A) com α -tocoferol durante 48h. Ao final deste período, observaram redução na expressão de genes da

homeostase lipídica e a redução de 1,28 vezes da expressão de *SCD* ($P<0,05$). Como o presente estudo avaliou a suplementação de α -tocoferol apenas em associação com Se, tal efeito não pode ser avaliado.

Ainda, o gene *SCD* hepático apresentou correlações positivas com os genes *NFE2L2* (mas baixa: 0,47777; $P=0,0037$ - Tabela 10, Figura 29 h), *SREBF1* (e média: 0,68141; $P<0,0001$ -Tabela 11, Figura 30 a) e *PPARA* (também baixa: 0,44150; $P= 0,0062$ - Tabela 12, Figura 31a). Anterior a este estudo, outros trabalhos já apresentaram o gene *SCD* como alvo dos genes *NFE2L2*, *SREBF1* e *PPARA*.

Huang et al. (2010) propuseram que o fator de transcrição *NFE2L2* funciona como um regulador de genes lipídicos hepáticos, entre eles, o *SCD*. Eles observaram que em ratos *NFE2L2*^{+/+} com *NFE2L2* sobre expresso a expressão de *SCD* também estava aumentada; enquanto que em ratos *NFE2L2*^{-/-} o gene *SCD* foi sub expresso.

Porém, em outros trabalhos, ao contrário do encontrado por este e por Huang et al. (2010), o gene *NFE2L2* é apresentado como um repressor da expressão de *SCD*.

Flowers e Ntambi (2008) observaram a redução de MUFAs e da expressão de *SCD* pela ativação de *NFE2L2*. Yates et al. (2009) registraram a sub regulação de *SCD* a partir do uso de indutores genético (*Keap1 knockout*) e farmacológico de *NFE2L2*. Hybertson et al. (2011) relataram a redução da expressão de *SCD* em 1,96 vezes após o uso de Protandim, ativador sintético de *NFE2L2*. Wu et al. (2001) observaram supressão dose-dependente de *SCD* por *NFE2L2*.

Shimano et al. (1997) observaram maior síntese de TAGs quando o *SREBF1* foi super expresso no fígado de roedores. Um ano depois, Tabor et al. (1998) identificaram a proteína *SREBP* como ligante da região PUFA-RE do gene *SCD*.

Keating et al. (2005) isolaram e caracterizaram a região promotora do gene bovino *SCD* e encontraram um local de ligação para o fator *SREBP*.

Waters et al. (2008) também observaram a regulação transcricional de *SCD* por *SREBF1*. Segundo estes mesmos autores, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) têm sido associados com redução da formação da proteína *SREBP-1*. Eles demonstraram, pela primeira vez, em um estudo com bovinos suplementados com óleos de peixe e soja, que a ingestão de PUFA n-3 reduziu a expressão do gene *SREBF1* e *SCD* sem alterar o gene *PPARA*.

A expressão de *SCD* também foi independente da expressão de *PPARA* nos estudos de Sampath e Ntambi (2006) com roedores. Mas, segundo Nakamura e Nara (2002), o *PPARA* pode ter um papel indireto na regulação de *SCD*, pois em outros estudos com roedores, suínos e cultura de células ele também agiu como indutor de *SCD*.

O presente estudo sugere que a suplementação com óleo de canola possa inibir a expressão de *SCD* e que os genes *NFE2L2*, *SREBF1* e o *PPARA* sejam indutores de *SCD*. Uma vez que o gene *NFE2L2* possa ativar a expressão de *SREBF1*, a suplementação com antioxidantes como Se e vitamina E pode acarretar em maior expressão deste gene lipogênico.

7.2.4 Quantificação relativa da expressão dos genes colesterolêmicos

7.2.4.1 Quantificação relativa da expressão gênica de *HMGCR*

O gene *HMGCR* codifica a enzima limitante para a síntese do colesterol, a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (NCBI, 2014).

O presente estudo mostrou que houve diferença no nível de transcrição do gene *HMGCR* no fígado entre o grupo Se+Vit E vs. Canola. A quantidade de transcritos de mRNA *HMGCR* foi 2,7 vezes maior para o grupo suplementado com antioxidantes em relação ao suplementado com óleo de canola (respectivamente 1,49 vs. 0,55 sendo $P \leq 0,06$; Tabela 9, Figura 28a). No tecido adiposo, as expressões de *HMGCR* foram semelhantes entre os grupos ($P = 0,12$ -Tabela 9, Figura 28b).

Jossa et al. (1991), Suadicaní et al. (1992), Gamez et al. (1997) e Hercberg et al. (2005) trabalhando com humanos, encontraram associações positivas entre a concentração de selênio e colesterol total no soro. Bleys et al. (2008) realizaram um estudo com 5.452 homens e mulheres com idade ≥ 20 anos e associaram elevadas concentrações de selênio sérico ao aumento de colesterol total, da fração LDL, de TAGs e de APO B. Outros relataram não haver relação entre concentração sérica de Se e colesterol total (KOSKINEN et al., 1987; BUKKENS et al., 1990; VIEGAS-CRESPO et al., 1994). Ou, relataram relação negativa entre Se e colesterol sérico como Dhingra e Bansal (2006) que observaram ratos machos (100 g de PV) com dietas com 2% de colesterol e 1 ppm de Se ou 0,2 ppm de Se e encontraram menor expressão do gene *HMGCR* para o grupo com maior adição deste micromineral. Porém, estes autores alertaram que a colesterolemia destes animais poderia não ser um resultado direto do Se, mas sim devido ao comportamento Se-dependente de outra enzima, a 5'-iodo-dedidrogenase (5'DI), a qual regula o nível de hormônio tireoidiano pela conversão de T4 em T3 que, por sua vez, modula a via SREBP-2, a qual é reconhecida como moduladora da captação de colesterol.

Portanto, o efeito da suplementação com Se sobre o metabolismo de lipídios e de colesterol é ainda inconsistente, limitado a poucas espécies, ao uso de selênio combinado a

vitaminas, a grupos com concentrações séricas de selênio baixas, restrito a amostragens pequenas ou a apenas um sexo.

Quanto ao efeito da vitamina E, um dos primeiros estudos avaliar o papel desta sobre a produção de colesterol foi o de Chen et al. (1973). Em 10 grupos com ratos recém-desmamados e dietas com 0, 25, 30, 40 ou 50 UI de α -tocoferol/Kg da dieta eles observaram que quanto maior a quantidade de vitamina E adicionada, menores foram os níveis de colesterol séricos.

Valastyan et al. (2008) identificaram que dos 28 genes *down*-regulados pelo α -tocoferol em células HepG2, 10 estavam envolvidos na homeostase de colesterol e todos apresentavam características regulatórias comuns em suas regiões promotoras, a sequência elemento responsiva a esterol (SRE), mais especificamente *SREBF2*. O tratamento com vitamina E teve efeito dose-resposta e reduziu a quantidade de SREBP-2 nuclear ativado. Entre os 10 genes *down*-regulados, o gene *HMGCR* apresentou *fold change* de -1,41 ($P < 0,05$).

Em 1996, Vallet e colaboradores já haviam proposto que a regulação da transcrição de *HMGCR* era mediada por proteínas- elementos de ligação responsivos a esterol (SREs) localizadas na região flanqueadora 5' do gene *HMGCR*.

Segundo Das (2008) e Notarnicola et al. (2011), os PUFAs são potentes inibidores da enzima HMG-CoA, eles sugerem que PUFAs agem de maneira semelhante aos esteróis, que se ligam a domínios PUFA-RE e SREs.

Quanto à relação da expressão do gene *HMGCR* e a expressão dos fatores *NFE2L2*, *SREBF1* e *PPARA*, todas foram positivas e respectivamente alta, baixa e média (nesta ordem: 0,9020; 0,2234; 0,6215- Tabela 10, 11, 12 e Figura 29i, 30b, 31b).

A alta correlação no tecido hepático entre *NFE2L2* e *HMGCR* corrobora para a semelhança do perfil de expressão entre estes dois genes (Figuras 25a e 28a, respectivamente).

Um estudo realizado em 2011 revelou que ao mesmo tempo em que a proteína *NFE2L2* impulsionou propriedades antioxidantes em um modelo animal, ela também promoveu o desenvolvimento de aterosclerose através do aumento dos níveis de colesterol no plasma e teor de colesterol no fígado. Os investigadores deste estudo descobriram que ratos machos *NFE2L2 knockout* diminuíram seus níveis de antioxidantes como seria de esperar, mas também exibiram redução de 53% de placas ateroscleróticas na aorta em comparação com animais normais. Ratos com apenas metade da expressão do gene *NFE2L2* exibiram o mesmo grau de formação de placas que os animais normais (BARAJAS et al., 2011). Tal

experimento, assim como a correlação encontrada no presente estudo, exige atenção para a indução da expressão do gene *HMGCR* a partir da ativação de *NFE2L2*.

Quanto a correlação entre as expressões de *HMGCR* e *SREBF1*, ainda que baixa foi positiva (Tabela 11, Figura 30b), portanto o presente estudo reafirma os resultados apresentados por Vallet et al. (1996), Brown e Golstein (1997), Chambers e Ness (1998), nos quais o SREBPs foram descritos como fatores de transcrição para *HMGCR* a partir da ligação destes aos SREs localizados na região flangeadora 5' de *HMGCR*.

A correlação positiva e média entre *HMGCR* e *PPARA* representa a relação de indução de um gene-alvo por um fator de transcrição, relação esta descrita desde a sua descoberta por Issemann e Green em 1990.

O presente trabalho sugere a indução da expressão de *HMGCR* pelo uso de antioxidantes, a qual pode ser consequência da ativação deste gene pelo fator de transcrição codificado por *NFE2L2*. De forma contrária, a suplementação com óleo de canola acarretaria na redução da expressão deste gene, o que poderia reduzir a síntese de colesterol.

7.2.4.2 Quantificação relativa da expressão gênica de *ACAT1* e *ACAT2*

Os genes *ACATs* codificam enzimas responsáveis pela transformação de colesterol e ácidos graxos de cadeia longa em ésteres de colesterol sob a forma de LDL (CHANG et al., 1997).

No presente estudo, a expressão do gene *ACAT1* diferiu entre Se+Vit E e Canola vs. Canola ($P \leq 0,08$ - Tabela 9, Figura 28c) enquanto o gene *ACAT2* apresentou expressão semelhante entre todos os grupos ($P = 0,15$; Tabela 9, Figura 28d). Segundo Smith et al. (2004) a expressão de *ACAT1* predomina sobre a de *ACAT2*, porém este estudo foi realizado em hepatócitos humanos.

Segundo Chang et al. (1997), ácidos graxos saturados aumentam os níveis de LDL sérico, enquanto os MUFAs reduzem. O modelo proposto para explicar tal fato foi delineado por Daumerie et al. (1992) e envolve a regulação de *ACATs*. Tal modelo propõe que o consumo de ácidos graxos saturados acarreta em maior quantidade de colesterol e no incremento do *pool* de colesterol e, consequentemente, é requerido aumento da atividade de *ACATs* para esterificar e remover este colesterol em excesso. Segundo Uelmen et al. (1995), o aumento de colesterol pode elevar de 2-3 vezes a expressão de *ACAT*.

O presente trabalho sugere que a expressão de *ACATs* seja inibida por MUFAs, pois os valores para as expressões destes genes foram numericamente menores para o grupo canola, o

qual é rico em ácido oleico. Contudo, quando associado ao Se e a vitamina E, essa resposta foi oposta e ainda maior do que para a suplementação apenas com antioxidantes, talvez o óleo de canola possa ter favorecido o efeito da vitamina E por se tratar de uma vitamina lipossolúvel. Ainda, a correlação alta e positiva entre *ACATs* e *NFE2L2* (Tabela 10, Figura 29j e 29l), sugere que os antioxidantes Se e vitamina E possam ter contribuído para expressão do gene *ACAT1* via ativação de *NFE2L2*.

7.2.4.3 Quantificação relativa da expressão gênica de *LCAT*

O gene *LCAT* codifica a enzima-chave para o transporte reverso do colesterol, ou seja, a enzima responsável pela síntese de HDL (GLOMSET, 1966).

O presente estudo apresentou expressão diferente entre os grupos Se + Vit E e Canola. O grupo suplementado com óleo de canola apresentou valor de expressão 3,2 vezes maior em relação ao suplementado com antioxidantes (2,01 vs. 0,63 sendo $P \leq 0,05$; Tabela 9, Figura 28e).

Fungwe et al. (1998) avaliaram a regulação da expressão de *LCAT* em hepatócitos de ratos diante da suplementação com ácidos graxos e observaram que o tratamento com ácido oleico resultou num aumento de 1,5 vezes na acumulação de mRNA de *LCAT*.

Ainda no presente estudo, a correlação da expressão deste gene em relação à expressão de *NFE2L2* foi negativa, ainda que baixa. O mesmo ocorreu para as correlações com as expressões de *SREBF1* e *PPARA* (Tabelas 10, 11 e 12; Figuras 29m, 30e, 31e).

Huang et al. (2010) trabalhando com camundongos *NFE2L2*^{+/+} e *NFE2L2*^{-/-} alimentados com dietas ricas em gordura, notaram uma diferença na distribuição das frações LDL e HDL. Animais nulos para o gene *NFE2L2* apresentaram LDL muito baixa, quase ausente, ao mesmo tempo em que exibiam aumento de aproximadamente 1,5 vezes na fração HDL. Para identificarem se as enzimas ACAT e LCAT estavam envolvidas com tal alteração, eles mediram a expressão de mRNA por PCR-RT e verificaram que a expressão de *ACAT1* e *2* não estavam alteradas, mas a expressão de *LCAT* estava aumentada em *NFE2L2*^{-/-}. Portanto, demonstraram uma relação negativa entre *NFE2L2* e *LCAT*.

No presente experimento também foi encontrada tal relação e sugere que enquanto a suplementação com óleo de canola favorece a expressão de *LCAT*, a suplementação com Se e vitamina E pode reduzi-la, o que pode ocorrer como consequência da ativação de *NFE2L2*, o qual, por sua vez, pode inibir a expressão de *LCAT*, o que pode prejudicar o transporte reverso do colesterol e o *clearance* deste no sangue.

[illegible]

123

8 CONCLUSÃO

A expressão de genes das vias antioxidante, lipogênica e colesterolêmica de bovinos Nelores é alterada pela suplementação da dieta com selênio associado à vitamina E e/ou ao óleo de canola.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com selênio e a vitamina E, em relação a suplementação com óleo de canola, pode induzir a transcrição dos genes hepáticos *NFE2L2*, *GPX1*, *GPX4*, *GSS*, *HMGCR* e inibir a expressão do gene *LCAT* no tecido adiposo. Portanto, os antioxidantes selênio e vitamina E podem ser responsáveis pela ativação de genes citoprotetores (*NFE2L2*, *GPX1*, *GPX4*, *GSS*), o que estimula estudos para aumentar a qualidade da carne, prolongar a estabilidade oxidativa do produto e preservar suas características, assim como para avaliar o uso destes como terapêuticos na saúde animal/humana. Também revela a capacidade destes antioxidantes em alterar a composição lipídica, pois a indução da expressão do gene lipogênico *SCD* pode aumentar a síntese de CLAs.

Mas, o uso destes antioxidantes dever ser realizado com prudência, pois podem agir de forma indesejada aumentando a expressão de *HMGCR*, o qual codifica a síntese da enzima limitante para síntese de colesterol (antioxidantes>*NFE2L2*>*HMGCR*); e reduzindo a expressão de *LCAT* (antioxidantes>*NFE2L2*> *LCAT*).

Por outro lado, o óleo de canola pode reduzir a expressão do gene *HMGCR* e aumentar o número de transcritos de mRNA do gene *LCAT*, o que pode ser uma maneira de modular o teor de colesterol da carne, assim como servir de modelo animal para o uso de PUFA's no controle e prevenção de doenças relacionadas ao excesso de colesterol aliado aos baixos níveis de HDL, o que vem sendo observado em outras espécies, inclusive na humana. Porém o uso do óleo de canola, assim como outras fontes de PUFA's, parece prejudicar a síntese endógena de CLAs, pois inibem a expressão de *SCD*.

A suplementação de forma isolada dos antioxidantes e óleo de canola age de forma distinta da suplementação destes mesmos nutrientes em conjunto. O selênio e a vitamina E associados ao óleo de canola podem aumentar a expressão de *SREBF1* e *ACAT1*, genes relacionados à síntese de lipídios e de LDL, respectivamente. Tal resposta pode ser consequência da ação dos antioxidantes sobre a estrutura dos lipídios ou da associação da vitamina E (lipofílica) ao óleo de canola.

As vias antioxidante, lipídica e colesterolêmica possuem um elo representado pelo *NFE2L2*. Ao mesmo tempo em que a ativação deste gene pode beneficiar a expressão de genes citoprotetores e genes ligados à síntese de ácidos graxos desejáveis via *SCD*, ela pode

também ativar o gene regulador para síntese de lipídios (*SREBF1*), o gene limitante para a síntese de colesterol (*HMGCR*) e inibir o responsável pela síntese de HDL (*LCAT*). Este elo parece responder à presença de antioxidantes como o selênio e a vitamina E e induzir genes-alvo ainda que haja o efeito oposto induzido por uma fonte lipídica como o óleo de canola, este, por sua vez, parece agir como inibidor de genes responsáveis pela a síntese de lipídios e colesterol total e, do próprio *NFE2L2*.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. *Rebanho Bovino Brasileiro*. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso em: 02.07.2014.

ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B.; IBRAHIM, S. Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *J Dairy Sci*, December 1; 92(12), p.6156-6159, 2002.

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chemistry*, v.24, n.10/11, p.1021-1030, 1986.

ADOLF, R.O.; DUVAL, S.; EMKEN, E.A. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids*, v.35, p.131-135, 2000.

AFMAN, L.; MULLER, M. Nutrigenomics from molecular nutrition to prevention of disease. *Journal of the American Diet Association*, v.106, p.596-576, 2006.

AHA- American Heart Association. Disponível em <http://www.heart.org/HEARTORG/>. Acesso em 15/10/10/2011.

ALLEN, C. E.; FOEGEDING, E. A. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods-review. *Food Technol.*, v.35, n.5, p.253, 1981.

ANDERSON, E. J.; THAYNE, K.; HARRIS, M.; CARRAWAY, K.; SHAIKH, S. R. Aldehyde stress and up-regulation of NFE2L2-mediated antioxidant systems accompany functional adaptations in cardiac mitochondria from mice fed n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochem J.*, v.441, n.1, p.1-17, 2012.

APPLIED APPLICATION NOTE TAQMAN. *Using Taqman® endogenous Control Assays to select an endogenous control for experimental studies 2011*. Acesso em 30 de Agosto de 2012. Disponível em: <https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/protein-expression/pdfs.par.69653.file.dat/cms-042279.pdf>

APPLIED BIOSYSTEMS. *Treinamento: PCR em Tempo Real- Apostila Texto*. Centro de treinamento Applied Biosystems. Material impresso. 2013.

ARAÚJO, J. M. A. *Química dos Alimentos- teoria e prática*. 4 ed. Visçosa, MG: Ed UFV, p.596, 2008.

AREBALO, R. E.; TORMANEN, C. D.; HARDGRAVE, J. E.; NOLAND, B. J.; CALLEN, T. J. In vivo regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase: Immunotitration of the enzyme after short-term mevalonate or cholesterol feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.79, n.1, p.51-55, 1982.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16. ed. Arlington: AOAC, 1298 p., 1996.

BADWEY, J.A A.; KARNOVSKY, M. L. Active oxygen species and functions of phagocytic leukocytes. *The Annual Review of Biochemistry*, n. 49, p.695, 1980.

BARAJAS, B.; CHE, N.; YIN, F.; ROWSHANRAD, A.; OROZCO, L. D.; GONG, K. W.; WANG, X.; CASTELLANI, L. W.; KREUE, K.; LUSIS, A. J.; ARAUJO, J. A. NF-E2-Related Factor 2 Promotes Atherosclerosis by Effects on Plasma Lipoproteins and Cholesterol Transport That Overshadow Antioxidant Protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.31, n.1, p.55-60, 2010.

BARROS, L. *Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite*. In: Ed. González, F.H.D. et al., Porto Alegre, 2001. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001, p. 44-57.

BARBIER, O.; VILLENEUVE, L.; BOCHER, V.; FONTAINE, C.; PINEDA TORRA, I.; DUHEM, C.; KOSYKH, V.; FRUCHART, J.C.; GUILLEMETTE, C.; STAEL, B. The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor and target gene. *J Biol Chem.*, in press, 2003.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, v.70, p.15-29, 2001.

BAUMAN, D.E., LOCK, L.A. *Milk fatty acids and human health: potential role of conjugated linoleic acid and trans fatty acids*. In: K. Sejrsen, T. Hvelplund, and M.O. Nielsen (Eds.) *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*. pp. 523-555. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2006.

BAUMGARD, L.H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *The American Journal of Physiology*, v. 278, p. 179-184, 2000.

BECK, M. A. Vitamin deficiency intensifies the myocardial injury of coxsackievirus B3 infection in mice. *Journal of Nutritional*, v. 124, 1994.

BELLIZZI, M.C.; FRANKLIN, M.F.; DUTHIE, G.G.; JAMES, W.P.T. Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 48: 822-831, 1994.

BENASSI, B.; FANCIULLI, M.; FIORENTINO, F.; PORRELLO, A.; CHIORINO, G.; LODA, M.; ZUPI, G.; BIROCCIO, A. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell.*, v.21, p.509–519, 2006.

BERGMANN, M.M.; BODZIOCH, M.; BONET, M.L., DEFOORT, C., LIETZ, G. MATHEUS, J.C. Bioethics in human nutrigenomics research: European Nutrigenomics Organization work-shop report. *British Journal of Nutrition*, 95, 1024-1027, 2006.

BERNO, L. I.; POETA, P. T.; MARÓSTICA, M. R. Jr. Efeitos do selênio oriundo da torta de castanha-do-brasil sobre a concentração de GSH em ratos Wistar. *Alim. Nutr.*, v.21, n.2, p.231-239, 2010.

BERTOLAMI, M.C. *O impacto da carne e do leite de bovinos na saúde humana-ABCZ*. Disponível: www.abcz.org.br/Content/arquivos/expozebu/palestras/2012/4.pdf. Acesso em 13/11/2012.

BESTKEEPER. Disponível para download no <http://www.gene-quantification.de/BestKeeper-1.zip>). Acesso em 12/01/2013.

BING, R.; THELEN, A.; PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J.; JUMP, D. B. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J. Biol. Chem.*, v.272, p.26827–26832, 1997.

BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; STRANGES, S.; MENKE, A.; MILLER, E.R.; GUALLAR, E. Serum selenium and serum lipids in US adults. *Am J Clin Nutr.*, v.88, n.2, p.416-23, 2008.

BOU, R.; CODONY, R.; TRES, A.; DECKER, E. A.; GUARDIOLOA, F. Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.49, n.9, p. 800-822, 2009.

BRADLEY RL, FISHER FM, MARATOS-FLIER E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. *Obesity Silver Spring*, v.16, p.938–944, 2008.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med.*, v. 27, n. 9/10, p. 951-965, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; BANNING, A. Part of the Series: From dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene regulation sulforaphane and selenium, partners in adaptive response and prevention of cancer. *Free Radical Research*, v. 40, n.8, p.775-787, 2006.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MULLER, M.; LIPPMANN, D.; KIPP, A. P. The yin and yang of NFE2L2-regulated selenoproteins in carcinogenesis. *International Journal of Cell Biology*, 8p., 2012.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*, v.89, n.3, p.331–340, 1997.

BROWN, K. M.; ARTHUR, J. R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.*, v. 4, n. 2B, p. 593-599, 2001.

BROWN, K.M.; MORRICE, P.C.; DUTHIE, G.G. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and non-smokers: dose response of vitamin E supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 496-502, 1997.

BROZMANÓVA, J.; MÁNIKOVÁ, D.; VICKOVÁ, V., CHOVANEC, M. Selenium: a double-edged sword for defense and offense in cancer. *Arch Toxicol.*, v.84, p.919-938, 2010.

BRYZGALOVA, G.; LUNDHOLM, L.; PORTWOOD, N.; GUSTAFSSON, J.A.; KHAN, A.; EFENDIC, S.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.295, p.E904–E912, 2008.

BUCKLEY, D.J.; MORRISEY, P.A.; GRAY, J.I. Influence of dietary vitamin E on oxidative stability and quality of pig meat. *Journal Animal Science*, v. 73, p. 3122-3130, 1995.

BUKKENS, S. G.; de VOS, N.; KOK, F. J.; SCHOUTEN, E. G; de BRUIJN, A.M.; HOFMAN, A. Selenium status and cardiovascular risk factors in healthy Dutch subjects. *J Am Coll Nutr.*,v.9, p.128–35, 1990.

BURK, R. F.; HILL, K. E.; NAKAYAMA, A.; MOSTERT, V.; LEVANDER, X. A.; MOTLEY, A. AK.; JOHNSON, D.A.; JOHNSON, A. J.; FREEMAN, M. L.; AUSTIN, L. M. Selenium deficiency activates mouse liver NFE2L2-ARE but vitamin E deficiency does not. *Free Radical Biology and Medicine*, v.44, p.1617-1623, 2008.

CHAMBERS, C. M.; NESS, G. C. Dietary cholesterol regulates hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in rats primarily at the level of translation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.354, n.2, p.317-322, 1998.

CHANG, C. C. Y.; SAKASHITA,N.; ORNVOLD, K.; LEE, O.; CHANG, E. T.; DONG, R.; LIN, S.; LEE, C. Y.; STROM, S. C.; KASHYAP, R.; FUNG, J. J.;FARESE, R. V. ; PATOISEAU, J. F.; DELHON, A.; CHANG, T. Y. Immunological quantitation and localization of ACAT1 and ACAT2 in human liver and small intestine.*J. Biol. Chem.*, v.275, p.28083–28092, 2000.

CHANG, T. Y.; CHANG, C. C. Y.; CHENG, D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.*, v.66, p.613–638, 1997.

CHAN, J. Y.; KWONG, M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with target deletion of NFE2L2 basic leucine zipper protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1517, p.19-26, 2000.

CHAN, W.; BROWN, J.; LEE, S. M.; BUSS, D. H.*Meat Poultry and Game.* , 5th supplement ed, Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1995.

CHEN, L.H.; LIAO, S.; PACKETT, L.V. Interaction of dietary vitamin E and protein level of lipid source with serum cholesterol level in rats. *J Nutr.*, v.102, p.729–732, 1972.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J. et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1751-1770, 2003.

CHO, H. Y.; REDDY, S. P.; DEBIASE, A.; YAMAMOTO, M.; KLEEBERGER, S. R. Gene expression profiling of NRF@-mediated protection against oxidatine injury. *Free Radical Biology and Medicine*, v.38, p.325-343, 2005.

CHURCH, D.C. *El ruminante: fisiología digestiva y nutrición*. Ed. Acribia Zaragoza, 630 p., 1998.

CHU, K.; MIYAZAKI, M.; MAN, W.C.; NTAMBI, J.M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol.*, v.26, p.6786–6798, 2006.

CLARKE, S. D.; JUMP, D. B. Regulation of gene transcription by Polyunsaturated fats. *Prog. Lipid Res.*, v.32, p139-149, 1993.

CLARKE, S. D.; JUMP, D. B. Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids*, v.31, p.S7-S11, 1996.

CLARKE, S. D.; TURINI, M.; JUMP, D.B. Polyunsaturated fatty acids regulate lipogenic and peroxisomal gene expression by independent mechanisms. *Prostaglandins, Leuko. Essent. Fatty Acids*, v.57, p.65–69, 1997.

COHN, J. S. Oxidized fat in the diet, postprandial lipemia and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, v.13, p.19–24, 2002.

COMBS Jr, G.F. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85, 517-547, 2001.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; ABDALLA, D.S.P., COZZOLINO, S.M.F. Estresse oxidativo, selênio e nutrigênica. Nutrire:ver. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v.36, n.3, p.131-151, dez.2011.

COPPLE, I. M.; GOLGRING, C.E.; KITTINGHAM, N. R.; PARK, B. K. the NFE2L2- Keap 1 defense pathways: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*, v.236, p.24-33, 2008.

CORREA, L. B.; ZANETTI, M. A.; GARRINE, C. L. P. ; YOSHIKAWA, C. Y. C.; GREGHI, G. F.; SARAN NETO, A. *Influência da inclusão de óleo de canola, selênio e vitamina E na estabilidade oxidativa da carne de bovinos em confinamento*. In: Reunião Anual da Associação Latinoamericana de Produção Animal, Havana, 2013.

CORREA, L. B.; ZANETTI, M.A.; SARAN NETTO, A.; CUNHA, J.A; SANTANA, R.S. ; GREGHI, G.F.; BARCELOS, B.B. *Influence of canola oil, vitamin E and*

selenium on selenium status in muscle and glutathione peroxidase activity in cattle. In: XXVIII World Buiatrics Congress, Austrália, 2014.

COUTINHO, V. F. *Efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa, H. B. K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio*. 2003. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C. K., PROCÓPIO, J. *Entendendo a Gordura - Os Ácidos Graxos*. 1.ed, Ed. Manole, Barueri, 2002.

DAS, U. N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective and cardioprotective molecules. *Lipids in Health and Disease*, v.7, n.37, p.2-18, 2008.

DAUMERIE, C. M.; WOOLLETT L. A.; DIETSCHY, J. M. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.89, p.10797–10801, 1992.

DAUN, C.; AKESSON, B. Glutathione peroxidase activity and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. *Meat Science*, v.66, p. 801-807-, 2004.

DECKER, E. A.; LIVISAY, S. A.; ZHOU, S. “Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: chemical and physical aspects”. In *Antioxidants in Muscle Foods*, Edited by: Decker, E. A., Faustman, C. and Lopez-Bote, C. J. 25–60. New York, NY: Wiley Interscience, 2000.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.*, v.257, p.L163-L173, 1989.

DESERGNE, B.; JEPENBERG, A.; DEVCHAND, P. R.; WAHLI, W. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v.65, p.65-74, 1998.

DHINGRA, S.; BANSAL, M. P. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem Biol Interact.*, v.16, p.49–56, 2006.

DUNN, J. D.; JOHNSON, B. J.; KAYSER, J. P.; WAYLAN, A. T.; SISSOM, E. K.; DROUILLARD, J. S. Effects of flax supplementation and a combined trenbolone

acetate and estradiol implant on circulating insulin-like growth factor-I and muscle insulin-like growth factor-I messenger RNA levels in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 81, p.3028–3034, 2003.

DWORSKI, R.; HAN, W.; BLACKWELL, T. S.; HOSKINS, A.; FREEMAN, M.L. Vitamin E prevents NFE2L2 suppression by allergens in asthmatic alveolar macrophages in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, v.51, n.2, p.516-21, 2011.

ELANGBAM, C.S.; TYLER, R. D.; LIGHTFOOT, R.M. Peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis and inflammation-an update. *Toxicol Pathol.*, v.29,p. 224–231, 2001.

ENOCH, H. G.; CATALA, A.; STRITTMATTER, P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. *J Biol Chem.*, v. 251, p.5095–5103, 1976.

ENSER, M. Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycemic mice (ob/ob). *Biochem. J.*, v.148, p.551–555, 1975.

EVANS, M. E., BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 13, p. 508-516, 2002.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United States. *Livestock and the environment*. Disponível em: <http://www.fao.org/livestock-environment/en/>. Acesso em 02/07/2014.

FAGUNDES, L.A. *Ômega-3 & Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças*. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, 111p., 2002.

FALLON, S.; ENIG, M.G. *The great canola: health topics*. Disponível em: <http://www.watsonaprice.org/The-great-Can-ola.html>. Acesso em 13/11/2012.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United States. *FAO Statistical Yearbook 2012*. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/yearbook2012/en/>. Acesso em 13/11/2012.

FUNGWE, T. V.; KUDCHODKAR, B. J.; LACKO, A. G.; DORY, L. Fatty acids modulate lecithin:cholesterol acyltransferase secretion independently of effects on

triglyceride secretion in primary rat hepatocytes. *J Nutr.*, v.128, n.8, p.127-1275, 1998.

FENG, Z.; LIU, Z.; LI, X.; JIA, H.; SUN, L.; TIAN, C.; JIA, L.; LI, J. Alfa-tocopherol is an effective phase II enzyme inducer: protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.21, p. 1222-1231, 2010.

FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; KENNY, D. A.; DISKIN, M. G.; PATTON, J.; MURPHY, J. J.; WATHES, D. C. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v.34, n.1, p.31-44, 2008.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics- Integrating genomics approaches into nutrition research. *Molecular Diagnosis Therapy*, v.10, p.1001-108, 2006.

FERNANDEZ, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, v.59, n.3, p.345-353, 1997.

FIB- Foods Ingredients Brasil. *Alimentos vs. Doenças*. n.12. 2010. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/132.pdf>. Acesso em 13/11/2012.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. *FEBS Lett.*, v. 32, p.132, 1973.

FLOWERS, M. T.; NTAMBI, J. M. Role of stearoyl- CoA desaturase in regulating metabolism lipid. *Curr Opin Lipidol.*, v.19, p.248-256, 2008.

FUKUMASU, H. *Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná, Paulinia cupana Mart var. sorbilis, em modelos experimentais “in vivo” e “in vitro”*. Departamento de Patologia- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 300p., 2008.

FURUYA, V.R.B.; HAIASHI, C.; FURUYA, W.M. Farelo de canola na alimentação de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante o período de reversão do sexo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.26, n.6, p.1067-1073, 1997.

GAMA, M.A.S. 2004. *Desempenho, composição do leite e mecanismos envolvidos na depressão da gordura do leite (DGL) de vacas recebendo ácidos linolêicos*

conjugados (CLA) e óleo de peixe na dieta. Tese(doutorado). ESALQ, Piracicaba, SP,120 p., 2004.

GAMEZ, C.; RUIZ-LOPEZ, D.; ARTACHO, R.; NAVARRO, M.; PUERTA, A.; LOPEZ, C. Serum selenium in institutionalized elderly subjects and relation to other nutritional markers. *Clin Chem.*, v.43, p.693–694, 1997.

GARG, M. L.; SNOSWELL, A. M.; SABINE, J. R. Influences of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes. *Prog. Lipid Res.*, v.25, p.639–644, 1986.

GARG, M. L.; WIERZBICKI, A. A.; THOMSON, A. B. R.; CLANDININ, M. T. Dietary cholesterol and/or n–3 fatty acid modulate D-9 desaturase activity in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.962, p.330–336, 1988.

GEBAUER, S.K.; PSOTO,T.L.; KRIS, P.M. The diversity of healthy effects of individual trans fatty acid isomers. *Lipids*, v.42, p.787-799, 2007.

GHORMADE, V.; KHARE, A.; BAGHEL, R. P. S. Nutrigenomics and its Applications in Animal Science. Nutrigenomics and its Applications in Animal Science. *Veterinary Research Forum*, v.2, n.3,p.144-157, 2011.

GLOMSET, J.A.; JANSSEN, E.T.; KENNEDY R.; DOBBINS, J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density Lipoproteins. *J. Lipid Res.*, v.7, p.638-648, 1966.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, v.343, n.6257, p.425–430, 1990.

GONÇALVES, F.M.; CORREA, M.N.; ANCIUTI, M.A.; GENTILINI, F.P., ZANUSSO, J.T.; RUTZ, F. Nutrigenomica: situação e perspectivas na alimentação animal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*,104 (569-572) 5-11, 2009.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. *Introdução a bioquímica clínica veterinária*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.66, 2003.

GOULD, R.G.; TAYLOR, C.B.; HAGERMAN, J.S.; WARNER, I.; CAMPBELL, D.J. *J. Biol. Chem.*, v.201, p.519–523, 1953.

GRAY, H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/.

GRIINARI, J.M. & D.E. BAUMAN. *Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants*. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, v.1, p.180-200, 1999.

GRUMMER, R. R. *Feeding strategies for supplemental fat*. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. *Large Dairy Herd Management*, Champaign: American Dairy Science Association, 826 p., 1992.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutrition Journal*, p.13:17, 2014.

GUINAZ, M.; MILAGRES, R.C.R.M, PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; CHAVES, J.B.P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovo. *Quim Nova*, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, v.41, p.1819–1828, 1995.

GUTIERREZ, L.L.P. *Papel das prostaglandinas A2 e do estado redox como moduladores do metabolismo do colesterol em diferentes tipos de macrófagos*. Tese (doutorado). UFRGS, 2007, 158p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 6.ed. New York: Oxford University, 851p, 2007.

HATFIELD et al. Role of supplemental vitamin E in lamb survival and production: A review. *Proceedings of American Society of Animal Science*, 1999.

HARBOR, A. Peroxisome proliferator active receptors. *Farmacía*, v.58, n.1, p.13-20, 2010.

HARDY, S.; LANGELIER, Y.; PRENTKI, M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.*, v.60, p.6353–6358, 2000.

HARFOOT, C. G.; NOBLE, R. C.; MOORE, J. H. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.24, p.961-970, 1973.

HERCBERG, S.; BERTRAIS, S.; CZERNICHOW, S. et al. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU. VI.MAX Study. *Lipids* ;v.40, p.335–42, 2005.

HOEKSTRA, M., D. YE, HILDEBRAND, R.B.; ZHAO, Y.; LAMMERS, B.; STITZINGER, M.; KUIPER, J.; VAN BERKEL, T.J.C.; VAN ECK, M. Scavenger receptor class B type I-mediated uptake of serum cholesterol is essential for optimal adrenal glucocorticoid production. *J.Lipid Res.*, v.50, p.1039-1046, 2009.

HOLBEN, D. H. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. *J. Am. Diet Assoc.*, v.99, p.836-843, 1999.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.*, v.109, n.9, p.1125-1131, 2002.

HUANG, C.; CHANG, L.; ANDERSON, M. E. MEISTER, A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem.*, v.268, p.19675-19680, 1993.

HUANG, J.; TABBI-ANNENI, I.; GUNDA, V., WAND, L. Transcription factor NFE2L2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, v.299, n.6, p.1211–1221, 2010.

HUANG Y; KHOR, T.O.; SHU, L.; SAW L.L.C.; WU, T.W. SUH, N; YANG, C. KONG, A.T. A g-Tocopherol-Rich Mixture of Tocopherols Maintains NFE2L2 Expression in Prostate Tumors of TRAMP Mice via Epigenetic Inhibition of CpG Methylation. *The Journal of Nutrition*, v.28, p. 1-6, 2012.

HUANG, J.; TABBI-ANNENI, I.; GUNDA, V.; WANG, L. Transcription factor NFE2L2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.299, n.6, p.211-221, 2010.

HUANG, Z. Z., YANG, H. P.,; CHEN, C. J.; ZENG, Z. H.; LU, S.C. Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression. *Biochim Biophys Acta*, v.1493,p.48-55, 2000.

HU, F. B.; the balance between n-6 and n-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Nutrition*, v.17, p. 741-742, 2001.

HUI, Y.H. *Bailey's industrial oil and fat products*. 5 ed., New York: Wiley-Interscience, 1996, v.2, p. 603-654; v.3, p. 1-114.

HYBERTSON, B.M.; GAOA, B.; BOSEA, S.K.; McCORDA, J.M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of NFE2L2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, v.32, p.234-246, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. *Estatística da Produção Pecuária Dezembro de 2013*. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf. Acesso em 02.07.2014.

IGARASHI, M.; MIYASAWA, T. The growth inhibitory effect of conjugated Linoleic acid on a human hepatoma cell line, HepG2, is induced by a change in fatty acid metabolism, but not the facilitation of lipid peroxidation in the cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1530, 162—171, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academies Press. *Dietary reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington: National Academy Press, 2000.

IP, C.; BANNI, S.; ANGIONE, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H.J.; BARBANO, D.; BAUMAN, D. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, v. 129, p. 2135-2142, 1999.

ISSMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor super family by peroxisome proliferators. *Nature*, v.347, p.645-650, 1990.

JAKOBSEN, M.V.; OVERRAD, K.; DYERBERG, J.; HEITMAN, B.L. Intake of ruminant trans fatty acids and risk coronary disease. *International Journal of Epidemiology*, v.37, p. 173-182, 2008.

JEFFCOAT, R.; JAMES, A. T. The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett.*, v.85, p.114—118, 1978.

JENKINS, T.C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism- Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.3851-3863, 1993.

JONES, B.; MAHER, M.A.; BANZ, W.J.; ZEMEL, M. B.; WHWLAN, J.; SMITH, P.; MOUSTAID, M. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol.* 34: E44–E49, 1996.

JOSSA, F.; TREVISAN, M.; KROGH, V. et al. Serum selenium and coronary heart disease risk factors in southern Italian men. *Atherosclerosis*, v.87, p.129–34, 1991.

JOZEF CZUK, J.; ADJAYE, J. Chapter Six – Quantitative Real-Time PCR-Based Analysis of Gene Expression. *Methods in Enzymology*, v, p.99–109, 2011.

JUÁREZ, M.; DUGAN, M.E.R.; ALDAI, N.; BASARAB, J.A.; BARON, V.S.; McALLISTER, T.A.; AALHUS, J. L. Beef quality attributes as affected by increasing the intramuscular levels of vitamin E and omega-3 fatty acids. *Meat Science*, v.90, n.3, p.764-769, 2012.

JUNIPER, D. T.; PHIPPS, R.H.; RAMOS-MORALES, E.; BERTIN, G, Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J Anim Sci.*, v. 86, n.11, p.3100-3109, 2008.

KAGAN, V.E. *Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants*. Ann. NY Acad. Sci., 854: 425-434, 1998.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWA, A. K. NFE2L2:INFE2L2(Keap1) Signaling in Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med*, v.47, n.9, p.1304-1309, 2009.

KATZ-JAFFE, M. G.; McREYNOLDS, S.; GARDNER, D. K.; SCHOOLCRAFT, W. B. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol. Hum. Reprod.*, v.15, n.5, p.271-277, 2009.

KAY, H. Y.; KIM, W. D.; HWANG, S. J.; CHOI, H. S.; GILROY, R. K., WAN, Y. J. et al. NFE2L2 inhibits LXR alpha dependent hepatic lipogenesis by competing with FXR for acetylase binding. *Antioxid. Redox Signal.*, v.15, n.8, p.2135-2146, 2011.

KAZALA, E.C.LOZEMAN, F.J.; MIR, P.S.; AALHUS, J.L. SCHUMUTZ, S.M.; WESELAKE, R.J. Fatty acid composition of muscle fat and enzymes of storage lipids synthesis in whole muscle from beef cattle. *Lipids*, v.41, p.1049-1057, 2006.

KEATING, A. F., KENNELLY, J.J.; ZHAO, F.Q. 2006. Characterisation and regulation of the bovine steroyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, p.344:233–240, 2005.

KELLY, M.L. et al. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Scienc.* v.81, p.1630-1636, 1998.

KEY, C. N.; PERKINS, S.D.; BRATCHER, C. L.; KRIESE-ANDERSON, L. A.; BRANDE BOURG, T.D. Grain feeding coordinately alters expression patterns of transcription factor and metabolic genes in subcutaneous adipose tissue of crossbred heifers. *Anim Sci.*, v.91, p.2616-2627, 2013.

KIM, H. J.; TAKAHASHI, M.; EZAKI, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBF1 of mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme m RNAs. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.25892-25898, 1999.

KIM, J.; CHA, Y.; SURCH, Y. A protective role of nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (NFE2L2) in inflammatory disorders. *Mutation Research*, v. 690, p.12-23, 2010.

KIM, S.; SOHN, I.; AHN, J. I.; LEE, K.H.; LEE, Y. S. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet induced obesity mouse model. *Gene*, v.340, n.1, p.99-109, 2004.

KITESSA, S.M.; GULATI, S.K.; ASHES, J.R. et al. Utilization of oil in ruminants. II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Animal Feed Science and Technology*, v.89, p.201-208, 2001.

KOLOZKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. 2ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 219p., 2009.

KORN, B. S.; SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HAMMER, R.E.; HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Blunted feedback suppression of SREBP processing by dietary cholesterol in transgenic mice expressing sterol-resistant SCAP (D443N). *J. Clin. Invest.*, v.102, p.2050–2060, 1998.

KOSKINEN, T.; PYYKKO, K.; KUDO, R.; JOKELA, H.; PUNNONEN, R. Serum selenium, vitamin A, vitamin E and cholesterol concentrations in Finnish and Japanese postmenopausal women. *Int J Vitam Nutr Res*, v.57, p.111–4, 1987.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, v.51, n.2, p.85-94, 2005.

KRAUSE, B. R.; Bocan, T. M. A. ACAT Inhibitors: *Physiologic Mechanisms for Hypolipidemic and Anti-atherosclerotic Activities in Experimental Animals* (Ruffolo, R. R., Jr., and Holliinger, M. A., eds) CRC Press, Inc., Boca Raton: FL, p.173–198, 1995.

KRUEGER, L. A.; BEITZ, D. C.; ONDA, K.; OSMAN, M.; O'NEIL, M.R.; LEI, S. WATTOO, F.H.; STUART, R. L.; TYLER, H. D.; NONNECKE, B. Effects of D- α -tocopherol and dietary energy on growth and health of preruminant dairy calves. *Meat Science*, v. 97, n.6, p.3715-3727, 2014.

KUMAR, H.; KIM, I.; VASANT, S.; KIM, B.; CHOI, D. Natural product-derived pharmacological modulators of NFE2L2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat. Prod. Rep.*, v.13, p.109-139, 2014.

KUNNEN, S.; VAN ECK, M. Lecithin-cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res.*, v. 53, n9, p.1783–1799, 2012.

KUSHWAHA, R. S.; ROSILLO, A.; RODRIGUEZ, R.; MCGILL, H.C. Expression levels of ACAT1 and ACAT2 genes in the liver and intestine of baboons with high and low lipemic responses to dietary lipids. *J Nutr Biochem.*, v.16, n.12, p.714-721, 2005.

LANDAU, J. M.; SKOWSKI, A.; HAMM, M. W. Dietary cholesterol and activity of stearoyl-CoA desaturase in rats: evidence for an indirect regulatory effect. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1345, p.349–357, 1997.

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. *J Lipid Res*, v.41, p.1991–2001, 2000.

LEE, T. D.; YANG, H.; WHANG, J.; LU, S. C. Cloning and characterization of the human glutathione synthetase 5'-flanking region. *Biochem. J.*, v.390, p.521–528, 2005.

LEE, J.; JOHNSON, J. A. An important role of NFE2L2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.37, n.2, p.139-143, 2004.

LEE, O.; CHANG, C. C.; LEE, W.; CHANG, T. Y. Immunodepletion experiments suggest that acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT1) protein plays a major catalytic role in adult human liver, adrenal gland, macrophages, and kidney, but not in intestines. *J. Lipid Res.*, v.39, p.1722–1727, 1998.

LEITE, L.C.; LANNA, D.P.D. *Avanços no estudo do metabolismo de lipídios: perfil da gordura depositada na carne ou secretada no leite de ruminantes. In: II Simpósio Internacional de avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes.* Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2009.

LIANG, G., et al. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem.*, v.277, p.9520–9528, 2002.

LI, G.; LEE, M. J.; LIU, A. B.; YANG, Z.; LIN, Y.; SHIS, W. J.; YANG, C. S. The antioxidant and anti-inflammatory activities of tocopherols are independent of NFE2L2 in mice. *Free Radic. Biol. Med.*, v.52, p.1151-1158, 2012.

LI, J.; DING, S.F.; HABBIB, N.A.; FERMOR, B.F.; WOOD, C. B.; GLIMOUR, R.S. Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int. J. Cancer*, v.57, p.348–352, 1994.

LI, L.; NAPLES, M.; SONG, H.; YUAN, R. ; YE, F.; SHAFI, S.; ADELI, K. ; NG, D.S. LCAT null mice develop improved hepatic insulin sensitivity through altered regulation of transcription factors and suppressors of cytokine signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.293, p.E587–E594, 2007.

LI, R.; COWAN, D. B.; MICKLE, D. A. G.; WEISEL, R. D.; BURTON, G. W. Effect of vitamin E on human glutathione peroxidase (GSH-PX1) expression in cardiomyocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, v.21, n.4, p.419-426, 1996.

LICHTENSTEIN, A.H. et al. Influence of hydrogenated fat and butter CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis Care*, v.171, n.1, p. 97-107, 2003.

LISCUM, L.; LUSKEY, K. L.; CHEN, D. J.; HO, Y. K.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its mRNA in rat liver as studied with a monoclonal antibody and a cDNA probe. *J. Biol. Chem.*, v.258, n.13, p.8450–8455, 1983.

LIU, Q.; LANARI, C.; SCHAEFER, D.M. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal Animal Science*, v. 73, p. 3131-3140, 1995.

LOPEZ, D.; CHAMBERS, C.M.; NESS, G. C. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Unmask Cryptic Regulatory Mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.343, n.1, p.118-122, 1997.

LOYOLA, G. Perspectivas para o Mercado da proteína animal. In: Congresso Internacional de carnes, Goiânia, GO, 2013. Disponível em: <http://www.congressodacarne2013.com.br/palestras/Gustavo%20Loyola.pdf>. Acesso em 20.11.2013.

LUDTMANN, M.H.R.; ANGELOVA, P.R.; ZHANG, Y.; ABRAMOV, A.Y.; KOSTOVA, A.T.D-. NFE2L2 impacts the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochemical Journal*, v.457, n.3, p.415-24, 2014.

LYNCH, M.P. et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. *Meat Science*, v. 52, p. 95-99, 1999.

LUO, J. L.; HAMMARQVIST, F., ANDERSSON, K.; WENERMAN, J. Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in uman skeletal muscle tissue. *Am J Physiol*, v.275, p.E359-365, 1998.

LU, S. C. Regulation of Glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, v.30,n.1-2, p.42-59, 2009.

MAC-RAE, J.; O'REILLY, L.; MORGAN, P. Desirable characteristics of animal products from a human health perspective. *Livest. Prod. Sci.*, v.94, p.95-103, 2004.

MAIHARA, V.A.; GONZAGA, I.B.; SILVA, V.L. Dily dietary selenium intake of selected populations group. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, v. 259, p. 465-468, 2004.

MANDARD, S.; MULLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.*, v. 61, n.4, p.393-416, 2004.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. *Plano Agrícola e Pecuário 2012/2013*. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Politica_Agricola/Plano%20Agr%C3

ADcola%202012_2013/PAP2012-2013_livroWEB%20-%20Atualizado.pdf. Acesso em 13/11/2012.

MARCHAN, R.; BOLT, H. M. The cytoprotective and the dark side of NFE2L2. *Arch Toxicol.*, v.83, p.2047, 2013.

MARK, S. D.; QIAO, Y. L.; DAWSEY, M. et al. Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, v.92, n.21, p. 1753–1763, 2000.

McDOWELL, R. L. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. New York: Academic Press, 1992.

McDOWELL, R. L. *Vitamins in Animal and Nutrition*. New York: Academic Press, 1989.

McLAREN, D.S.; LOVERIDGE, N.; DUTHIE, G.G.; BOLTON-SMITH, C. 1993. *Fat Soluble Vitamins In: Human nutrition and dietetics*, Garrow, J.S., James, W.P.T., p.208-238. London, Churchill Livingstone Press.

McGUIRE, M. K.; PARK, Y.S.; BEHRE, R.A.; HARISON, L.Y.; SCHULTZ, L.D.; McGUIRE, M.A. Conjugated linoleic acid concentrations of human milk and infant formula. *Nutr. Res.*, v.17, p.1277-1283, 1997.

MEDEIROS, S.R. *Ácido linoleico conjugado: Teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado*. Tese para obtenção do grau de Doutor. Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, São Paulo, 2002.

MEINER, V. L., CASES, S. ; MYERS, H. M. ; SANDE, E. R.; BELLOSTA, S.; SCHAMBELAN, M.; PITAS, R. E. , McGUIRE, J.; HERZ, J.; FARESE, R. V. Jr. Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.93, p.14041–14046, 1996.

MEINER, V.; TAM, C.; GUNN, M.D.; DONG, L.M.; WEISGRABER, K.H.; NOVAK, S. *et al.* Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene (*Acact*): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzymes in mice. *Lipid Res.*, v.38, p. 1928–1933, 1997.

MEISTER A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*, v.251, p. 3-7, 1995.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Am Rev Biochem*, v.52, p.711-760, 1983.

MIKE, O.; SCHOMBUG, L.; BUENTZEL, J.; KISTERS, K.; MUECKE, R. Selenium in oncology: from chemistry to clinics. *Molecules*, v. 14, p.3975-3988, 2009.

MILLS, G. C. Oxidative breakdown protects hemoglobin from erythrocyte enzyme which glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*, v.229, p.189-197, 1957.

MIYAZAKI, A.; SAKASHITA, N.; LEE, O.; TAKAHASHI, K.; HORIUCHI, S.; HAKAMATA, H.; MORGANELLI, P. M.; CHANG, C. C. Y.; CHANG, T. Y. S. Expression of ACAT1 Protein in Human Atherosclerotic Lesions and Cultured Human Monocytes-Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.18, p.1568–1574, 1998.

MOI, P.; CHAN, K.; ASUNIS, I.; CAO, A.; KAN, Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (NFE2L2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.91, p.9926–9930, 1994.

MONAHAN, F. J.; GRAY, J. I.; ASGHAR, A.; HAUG, A.; SHI, B.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A. Effect of dietary lipid and vitamin E supplementation on free radical production and lipid oxidation in porcine muscle microsomal fractions. *Food Chem.*, v.46, p.1, 1993.

MOSLEY, E. E.; POWELL, G. L.; RILEY, M. B. JEKINS, T. C. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *Journal of Lipid Research*, v.43, p.290-296, 2002.

MOSLEY, E. E.; SHAFFI, B.; MOATE, P. J.; MCGUIRRE, M. A. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition*, v.136, p.570-575, 2006.

MOTOHASHI, H.; SHAVIT, J. A.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, M.; ENGEL, J. D. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res.*, v.25, p.2953–2959, 1997.

MULLER, M.; BANNING, A.; BRIGELIUS-FLOH, R.; KIPP, A. NFE2L2 target genes are induced under marginal selenium-deficiency. *Genes and Nutrition*, v.5, n.4, p. 297–307, 2010.

MULLER, M.; KERSTEN, S. Opinion: Nutrigenomics: goals and strategies. *Nature Reviews Genetics*, v.4, p.315-322, 2003.

MURRAY, R.K. et al. *Harper: Bioquímica*. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem. Soc. Trans.*, v.30, p.1076-1079, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, *Nutrient requirements of beef cattle*. National Academy Press, 7^a ed., Washington, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Mineral tolerance of animals*. 2 ed, Washington: National Academy Press, 2000.

NCBI. *RefSeq: NCBI Reference Sequence Database*. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>. Acessos em 23.06.2012 e 03.06.2014.

NETTER, F.H. *Atlas de Anatomia Humana*. 40 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 640p.

NEVE, B.P.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. Role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol*, v.60, p. 1245–1250, 2000.

NEWRICK, R. *Canola meal feed industry guide*. 2009. Disponível em: http://www.canolacouncil.org/canola_meal.aspx. Acesso em 13/11/2012.

NICHOLSON, J.W.G.; LAURENT, A.M.; MC QUEEN, R.E. The effect of feeding organically bound selenium and alfa-tocoferol to dairy cows on the susceptibility of milk to oxidation. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 71, p. 135-143, 1991.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A.K. Regulation of NFE2L2-an update. *Free Radical Biology and Medicine*, v.66, p.36-44, 2013.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C.B. The NFE2L2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and its Activation by Oxidative Stress. *The journal of biological chemistry*, v.284, n.20, p.13291–13295, 2009.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol*, v. 85, p. 1313-1359, 2011.

NOLLI, C.P. *Produção, composição do leite e desempenho reprodutivo de ovelhas Santa Inês alimentadas com rações contendo óleo de canola ou linhaça*. Mestrado em Ciências. ESALQ, Piracicaba, 2012.

NOTARNICOLA, M.; MESSA, C.; REFOLO, M. G.; TUTINO, V.; MICCOLIS, A.; CARUSO, M. G. Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxyl-methyl-glutaryl CoA-Reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line. *Lipids in Health and Disease*, v.10, n.10, p.1-7, 2011.

NTAMBI, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.*, v.40, p.1549-1558, 1999.

NUMAKAWA, Y.; NUMAKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; YAGASAKI, Y.; KUNUGO, H. ET AL. Vitamin E protected cultures cortical neurons from oxidative stress-induced cell death through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem*, v. 97, n.4, p. 1191-202, 2006.

NUTRITION WORKING GROUP OF THE INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE EUROPE. Recommended daily amounts of vitamins and minerals in Europe. *Nutr. Abstracts Revs.*, (Series A). 60: 827-842, 1990.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The NFE2L2- Antioxidant Response Element Signaling Pathway and its action by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, v.84, n.20, p.1391-1395, 2009.

OLSON, O.E. PALMER, L.S.; CARY, E.L. Modification of the official Fluorimetric method for selenium in plants. *Journal AOAC*, v.58, p.117-121, 1975.

OLSVIK, P.A.; LIE, K.K.; JORDAL, A.E.O.; NILSEN, R.O.; HORDVIK, I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.*, v.6, p. 21, 2005.

OMAYE, S.T.; TAPPEL, C. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. *Journal of Nutrition*, v.104, p.747, 1974.

OMS- Organização Mundial de Saúde. *Global Atlas on cardiovascular disease and prevention*. Disponível em:
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/. Acesso em 13/11/2012.

OSTROWSKA, E.; Muralitharan, Morley.; Cross, R.F.; Bauman, D.E.; Dunshea, F.R. Dietary Conjugated Linoleic Acids Increase Lean Tissue and Decrease Fat Deposition in Growing Pigs. *J. Nutr.*, v.129, p.2037-2042, 1999.

PACKER, L. *Vitamin E: Biological activity and Health Benefits: Overview*. In: Vitamin E in health and disease. p. 977-982. New York, Packer, L, Fuchs, J., eds. Marcel Dekker, Inc., 1993.

PALMQUIST, D.L. Ruminal and endogenous synthesis of CLA in cows. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.56, p.134-137, 2001.

PAN, D.A.; HULBERT, A.J.; STORLIEN, L.H.. Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J. Nutr.*, v.124, p.1555-1565, 1994.

PAPP, L.V.; LU J.; HOLMGREN A.; KHANNA, K.K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*, v.9, p.775-806, 2007.

PARIZA, M. W.; HA, Y. L. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Medical Oncology Tumor Pharmacology*, v. 7, p. 169-171, 1990.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K.Y.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; COOK, M.E.; PARIZA, M.Z. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, v.32, p.853-858, 1997.

PASCHOAL, J.; ZANETTI, M.A.; DELCLARO, G.R.; MELO, P. de; PUGINE, S.P.; CUNHA, J.A. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.42, n.12, p.1793-1799, dez. 2007.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v.297, n.1, p.E28–E37, 2009.

PAVAN, E.; DUCKETT, S.K. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. II. Effects on *longissimus* muscle and subcutaneous adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase activity and expression. *J Anim Sci.*, 85:1731-1740, 2007.

PEARSON, A.M; GRAY.I.J.; WOLZAR. A.M.; et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technolog*, v.37, n.121-130, 1983.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, v.29, n.9, p.2004-2007.

PHILIPPI, S. T. *Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição*. Barueri, SP: Manole, 2008. Disponível em:<http://www.portaleducacao.com.br/nutricao/artigos/17396/oleos-vegetais#ixzz2C9DFbcf6>. Acesso em 13/11/2012.

PEREZ, J.R.O.; BRESSAN, M.C.; BRAGAGNOLO, N. et al. Efeito do peso ao abate de cordeiros Santa Inês e bergamácia sobre o perfil de ácidos graxos, colesterol e propriedades químicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.22, n.1, p.11-18, 2002.

PUDDU, P.; PUDDU, G. M.; MUSCARI, A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression? *Internacional Journal of Cardiology*, v.90, n.2-3, p.133-140, 2003.

PURDOM-DICKINSON, S. E.; SHEVELEVA, E. V.; SUN, H.; CHEN, Q. M. Translational control of NFE2L2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. *Mol Pharmacol.*, v.72, p.1074–1081, 2007.

RAO, M.S.; REDDY, J.K. PPAR alpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology*, v.40, n.4, p.783-786, 2004.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr.*, v.100, p. 254-268, 2008.

RENAVILLE, B.; MULLEN, A.; MOLONEY, Y.; LARONDELLE, Y. J., SCHNEIDER, Y. L.; ROCHE, H. Eicosapentanoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans-vaccenic acid into cis 9-trans 11 conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells. *Br. J. Nutr.*, v.95, p.688-695.

RIMM, E.B.; STAMFER, M.J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *The New England Journal of Medicine*, v.320, n.20, p.1450-1456, 1993.

RODRIGO, R.; PRIETO, J. C., CASTILLO, R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins E and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potencial clinical applications. *Clinical Science*, v.124, p.1-15, 2013.

ROMANOWSKA, M.; KIKAWA, K.D.; FIELDS, J.R.; MACIAG, A.; NORTH, S.L.; SHIOA, Y.H. et al. Effects of selenium supplementation on expression of glutathione peroxidase isoforms in cultured human lung adenocarcinoma cell lines. *Lung Cancer*, v.55, p.35-42, 2007.

RNeasy Tissue Mini Kit QIAGEN®. *RNeasy Mini Handbook*. 4 ed., 80p., 2010. Disponível em: http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf. Acesso em 01.07.2012.

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit QIAGEN®. *RNeasy Mini Handbook*, 2009. Disponível em: <file:///C:/Users/Zanoni/Downloads/EN-RNeasy-Lipid-Tissue-Handbook.pdf>. Acesso em 01.07.2012.

ROSMINI, M. R; PERLO, F.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. et al. TBA test by extractive method applied to “Paté”. *Meat Science*, v.42 n.1, p.103-110, 1996.

ROWE, L. J.; MADDOCK, K. R; LONERGAN, S. M., HUFF-LONERGAN, E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *J Anim Sci.*, v.82, p.785-793, 2004.

ROWGHANI, E.; ARAB, M.; NAZIF, S. et al. Effect of canola oil on cholesterol and fatty acid composition of egg-yolk of laying hens. *International Poultry Science*, v.6, n.2, p.11-114, 2007.

SABINE, J. R.; JAMES, M. J. The intracellular mechanism responsible for dietary feedback control of cholesterol synthesis. *Life Sciences*, v.18, n.11, p.1185-1192, 1976.

SALDANHA, T.; MAZALI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, p.109-113, 2004.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha: Independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v.9, p. 84-88, 2006.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. *Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri, SP: Manole; Pirassununga, SP: Ed. Dos Autores, 2007.

SAS. Institute SAS/STAT. *Guide for personal computers*. Cary: SAS Institute Inc, 2005.

SEO, H-A.; LEE, I-K. The role of NFE2L2: Adipocyte differentiation, obesity, and Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2013 (2013), ID 184598, 7p.,<http://dx.doi.org/10.1155/2013/184598>.

SESSLER, A. M.; KAUR, N.; PAULTA, J. P.; NTAMBI, J. M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.29854–29858, 1996.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 79, n.12, p.3292–3293, 1957.

SCOTT, G. *Antioxidants in science, technology, medicine and Nutrition*. Chichester: Albion Publishing, 1999.

SEELIG, G. F.; SIMONSEN, R. P.; MEISTER, A. Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem*, v.259, p.9345-9347, 1984.

SESSLER, A.M.; KAUR, A.M.; PAULTA, J.P.; NTAMBI, J.M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v.271, p. 29854-29858, 1996.

SESSLER, A.M.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.*, v.128, p.923-926, 1998.

SETHI, A.A., SAMPSON, M. ; WARNICK, R. ; MUNIZ, N.; VAISMAN, B.; NORDESTGAARD, B.G.; TYBJAERG-HANSEN, A.;REMALEY, A.T. High pre-beta1 HDL concentrations and low lecithin: cholesterol acyltransferase activities are strong positive risk markers for ischemic heart disease and independent of HDL-cholesterol. *Clin. Chem.*, v.56 p.1128–1137, 2010.

SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; HAMMER, R. E.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. .L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.*, v.99, n.5, p.846–854, 1997.

SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H.; HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.*, v.99, p.838–845, 1997.

SHIMOMURA, I.; SHIMANO, H.; KORN, B.S.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J.D. Nuclear sterol regulatory element binding proteins activate genes responsible for entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.*, v.273, p.35299–35306, 1998.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition.*, v.54, p.438-463, 1991.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos – Métodos químicos e biológicos*. 2 ed. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SILVA, J.G. da. *Novos desafios do mundo exigem novas respostas*. Informe Consea. Disponível em: <http://segalinut.com/tag/onu/>. Acesso em 27/05/2012.

SMITH, J. L.; RANGARI, K.; SIMPSON, R.; MACLEAN, D. J.; NATHANSON, L. K.; STUART, K. A.; SCOTT, S. P.; RAMM, G. A.; JERSEY, J. Quantitative analyses of gene expression of ACAT in human tissues by real-time PCR. *Lipid Res.*, v.45, n.4, p.686-696, 2004.

SMITH, K.L.; CONRAD, H. R. *Vitamin E and selenium supplementation for dairy cows*. Roche Technical Symposium. The role of Vitamins on Animal Performance and Immune Response. Daytona Beach, p.47, 1987.

SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; WEISS, W.P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science*, v.75, n.6, p.1659-1665, 1997.

SONI, M. G.; THURMOND, T.S.; MILLER, E.R.; SPRIGGS, T.; BENDICH, A.; OMAYE, S.T. Safety of vitamins and minerals: controversies and perspective. *Toxicol Sci.*, v.118, p.348-355, 2010.

SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; PELICANO, E.R.L., GARDINI, C.H.C.; OVA, A.; LIMA, T.M.A. Efeito da suplementação de vitamina E no desempenho e na qualidade da carne de frangos de corte. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.1001, p.87-94, 2006.

SREEKUMAR, R.; UNNIKRISHNAN, J.; FU, A.; NYGREN, J.; SHORT, K.R.; SCHIMKE, J., BARAZZONI, R., NAIR, K.S. Impact of high fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism*, v.282, p.1055-1061, 2002.

STAMPLER, M.J. HENNEKENS, M.D.; MARSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; ROSNER, B.; WILLETT, W.C. Vitamin E consumption and risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.*, v.328, p.1444-1449, 1993.

STEEVENS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A.; GOLDBOHN, R. A.; SCHOUTEN, L. J. Selenium status and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes: the Netherlands cohort study. *Gastroenterology*, v.138, n.5, p. 1704–1713, 2010.

STEINBERG, D.; PARTHASARTHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320: 915-924, 1989.

STENDER, S.; ASTRUP, A.; DYERBERG, J. Ruminants and industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food and Nutrition Research*, 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2596737&pdf>. Acessado em 13 jan. 2010.

SUBBIAN, M.T.R. Understanding the Nutrigenomic Definitions and Conceptions at the Food- Genome Junctions. *J. Integr Biol.*, 12(2): 2-7, 2008

SURAI, P.F. *Selenium in nutrition and health*. 1st ed. United Kingdom: Nottingham University Press, 2006.

TACO. *Tabela Brasileira De Composição De Alimentos*. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Campinas: UNICAMP, 2011.

TANAKA, Y.; ALEKSUNES, L. M.; YEAGER, R. L.; GYAMFI, M. A.; ESTERLY, N.; GUO, G. L., ET AL. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 325, n.2, p.655-664, 2008.

TANAKA, K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *J Animal Science*, v.76, p.291-303, 2005.

TANAKA, Y.; ALEKSUNES, L. M.; YEAGER, R. L.; GYAMFI, M.A.; ESTERLY, N.; GUO, G. L. et al. NF-E2 related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high fat diet. *J Pharmacol Exp Ther.*, v.325, n.2, p.655-664, 2008.

TEBBEY, P. W.; BUTTKE, P.M. Stearoyl-CoA desaturase gene expression in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.186, p.531-536, 1992.

THEWKE, D. P.; PANINI, S.R.; SINENSKY, M. Oleate potentiates oxysterol inhibition of transcription from sterol regulatory element-1-regulated promoters and maturation of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.21402-21407, 1998.

THIMMULAPPA, R. K.; LEE, H.; RANGASAMY, T.; REDDY, S. P.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W.; BISWAL, S. NFE2L2 is a critical regulator of innate immune response and survival during experimental sepsis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.116, n.4, p.984-995, 2006.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram 552 amounts of total and oxidized glutathione applications to mammalian on blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, v.27, p.502- 522, 1969.

TOYE, A. A.; DUMES, M.E.; BLANCHER, C.; ROTHWELL, A. R.; FEARNSIDE, J. F.; WILDER, S. P. et al. Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice. *Diabetologia*, v.50, n.9, p.1867-1879, 2007.

UELMEN, P. J.; OKA, S.; SULLIVAN, M.; CHANG, C. C. Y.; CHANG, T. Y.; CHAN, L. Tissue-specific Expression and Cholesterol Regulation of Acylcoenzyme A:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) in Mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.26192-26201, 1995.

USDA. United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. April 2014. Disponível em:
http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 02/07/2014.

VALASTYAN, S.; THAKUR, V.; JOHNSON, A.; KUMAR, K.; MANOR, D.; Novel transcriptional activities of vitamin E: Inhibition of Cholesterol Biosynthesis. *Biochemistry*, v.47, n.2, p.744-752, 2008.

VALBERG, S.J.; HODGSON D.R. *Enfermidades musculares*. In: Smith B.P. (Ed.), *Medicina Interna de Grandes Animais*. 3ª ed. Manole, São Paulo, p.1269-1271, 2006.

VALLETT, S. M.; SANCHEZ, H. B.; ROSENFELD, J. M.; OSBORNE, T. F. J. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *Biol. Chem.*, v.271, p.12247–12253, 1996.

VALK, E. E.; HORNSTRA, G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, v.70, p. 30-41, 2000.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, v.3, n.7, research0034.1-0034.11, 2002.

VERGEER, M., KORPORAAL, S.J.; FRANSSEN, R.; MEURS, I.; OUT, R.; HOVINGH, G.K.; HOEKSTRA, M.; SIERTS, J.A.; DALLINGA-THIE, G.M.; MOTAZACKER, M.M.; HOLLEBOOM, A.G.; VAN BERKEL, T.J.C.; KASTELEIN, J.J.; VAN ECK, M.; KUIVENHOVEN, J.A. Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.*, v.364, p.136-145, 2011.

VERHULST, A.; JANSEN, G.; PARMENTIER, G.; EYSEN, H. *System Appl microbial*, v.9, p.12-15, 1987.

VIEGAS-CRESPO, A. M.; NEVE, J.; MONTEIRO, M. L.; AMORIM, M. F.; PAULO, O. S.; HALPERN, M. J. Selenium and lipid parameters in plasma of Portuguese subjects. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*, v.8, p.119–22, 1994.

VOLKER, D.; FITZGERALD, P.; MAJOR, G.; GRAG, M. Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, v.27, n.10, p.2343-2346, 2000.

VOMHOF-DeKREY, E. E.; MATTHEW, J. P. Sr. The NFE2L2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.23, p.1201-1206, 2012.

YANG, H.P.; MAGILNICK, N.; LEE, C.; KALMAZ, D.; OU, X. P.; CHAN, J. Y.; LU, S. C. Nrf1 and NFE2L2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via AP-1 and NFκB. *Mol Cell Biol.*, v.25, p.5933–5946, 2005.

YANG, H. P.; ZENG, Y.; LEE, T. D.; YANG, T.; OU, X.P.; CHEN, L.X.; HAQUE, M.; RIPPE, R.; LU, S. C. Role of AP-1 in the co-ordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by *tert*-butylhydroquinone. *J Biol Chem.*, v.277, p.35232–35239, 2002.

YATES, M.S.; TRAN, Q.T.; DOLAN, P.M.; OSBURN, W.O.; SHIN, S.; MCCULLOCH, C.C.; SILKWORTH, J.B.; TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, M.; WILLIAMS, C.R.; LIBY, K.T.; SPORN, M.B.; SUTTER, T.R.; KENSLER, T.W. Genetic versus chemoprotective activation of NFE2L2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid treated mice. *Carcinogenesis*, v.30, p.1024-1031, 2009.

YU, Z.; SHAO, W.; CHIANG, Y.; FOLTZ, W.; ZHANG, Z.; LING, W. et al. Oltipraz upregulates the nuclear factor NFE2L2 antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetologia*, v.54, n.4, p.922-934, 2011.

XU, J.; CHO, H.; O'MALLEY, S.; PARK, J. H. Y.; CLARKE, S. D. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and 2 in three distinct stages and by different mechanisms. *The Journal of Nutrition*, v.132, n.11, p.3333-3339, 2002.

XU, J.; NAKAMURA, N. T.; CHO, H. P.; CLARKE, S. D. Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 Expression Is Suppressed by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.23577-23583, 1999.

WANG, R.; KERN, J. T.; GOOFRIEND, T. L.; BALL, D. L.; LUESCH, H. Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, v. 81, n.1, p. 53–59, 2009.

WANG, Z.; DOU, X.; LI, S.; ZHANG, X.; SUN, X.; ZHOU, Z.; SONG, Z. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation-induced hepatic very-low-density lipoprotein receptor overexpression in response to oxidative stress contributes to alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, v.59, n.4, p.1-37, 2014.

WANG, X.R.; SATO, M.S.; BROWN, M.S.; HUA, X.; GOLDSTEIN, J.L. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterolregulated proteolysis. *Cell*, v.77, p. 53-62, 1994.

WATERS, K. M.; MILLER, C. W.; NTAMBI, J. M. Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA deaturase gene 1. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.1349, p.33-42, 1997.

WATERS, S.M.; KELLY, J.P.; BOYLE, P.O.; MOLONEY, A.P., KENNY, D.A. Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of Δ^9 -desaturase in muscle of beef cattle. *J Anim Sci*, v.87, p.244-252, 2008.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; PIERRE, N.R. St. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology*, v.39, p.95-110, 1992.

WEI, W. Q.; ABNET, C. C.; QIAO, Y. L. et al. Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, n.1, p. 80–85, 2004.

WHALE, K. HEYS, S.D.; RONTONDO, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 43, 553–587, 2004.

WHALI, W.; BRAISSANT, O.; DESVERGNE, B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chemistry and Biology*, v.2, n.5, p.261-266, 1995.

WHANGER, P. D. Selenium and heavy metal toxicity. *In* Selenium in Biology and Medicine (J. E. Spallholtz, J. L. Martin and H. E. Ganther, eds.). Avi Press, Westport, CT, p.230-255, 1981.

WILD, A.C.; MOINOVA, H. R., MULCAHY, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor NFE2L2. *J Biol Chem*, v.274, p.33627-33636, 1999.

WILSON, M. D.; RUDEL, L. L. J. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *Lipid Res.*, v.35, p.943–955, 1994.

WINTERHOLLER, S. J.; PARSONS, G; G. L.C. D. REINHARDT, C, D.; J. P. HUTCHESON, J. P.; W. T. NICHOLS, W. T.; D. A. YATES, D.A.; R. S. SWINGLE, R. S.; B. J. JOHNSON, B.J. Response to ractopamine-hydrogen chloride is similar in yearling steers across days on feed. *J Anim Sci.*, v. 85, n. 2, p. 413-419, 2006.

WORGALL, T. S.; STURLEY, S.L.; SOE, T.; OSBORNE, T.F.; DECKELBAUM, R.J. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol

regulatory elements by decreasing levels of sterol regulatory element-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 273:25537–25540, 1998.

WU, K. C.; CUI, J. Y.; KLAASEN, C. D. Beneficial role of NFE2L2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci.*, v.123, n.2, p.590-600, 2011.

Anexo 1- Certificado de análise do produto Lutavit E50®, BASF.

BASF
The Chemical Company

Certificate of Analysis
BASF SE

Please note that the certificates of analysis are also conveniently available online and around the clock at www.worldaccount.basf.com

BASF S.A.
R EDGAR MARCHIORI 255, ST BASF
13280-000 VINHEDO
DISTRITO INDUSTRIAL
Brasil

Fax No 00551130432434
2014-04-03
Hr.Alfred ten Haaf
alfred.ten-haaf@basf.com
+49 621 60-47220
Certificate No 7776

Inspection Certificate 3.1 according to EN 10204

Lutavit E50
25KG Saco de PE
Purchase Order/Customer Product#
4913298293
000000000050075923

Material 50075923
Order 3009723557 000010
Delivery 3093145766 000010
Lot 51652456P0
Lot/Qty 24000.000 KG
Total 24000.000 KG
Transport SUDU5404863

Test Parameter	Requirements	UoM	Results
Appearance	fine, white to almost-white, free flowing powder		conforms
Assay alpha-tocopherylacetate (GC)	Min.: 50	%	51

QC-Reference-No. 14082797

Production date 03.03.2014

Release date 05.03.2014

Best before 02.03.2016

BASF SE
Competence Center Analytic
Quality Control
sig. Hr. Frühbeis
QC-Representative

The aforementioned data shall constitute the agreed contractual quality of the product at the time of passing of risk. The data are controlled at regular intervals as part of our quality assurance program. Neither these data nor the properties of product specimens shall imply any legally binding guarantee of certain properties or of fitness for a specific purpose. No liability of ours can be derived therefrom.

This is a computer-generated document. No signature is required.

Anexo 2- Perfil de ácidos graxos do óleo de canola fornecido aos animais suplementados

Ácido graxo	Percentual (%)
C4:0	
C6:0	
C8:0	
C10:0	0,009
C10:1	
C11:0	
C12:0	0,018
C13:0 ISSO	
C13:0 ANTEISO	
C12:1	
C13:00	
C14:0 ISSO	
C14:0	0,079
C15:0 ISSO	0,003
C15:0 ANTEISO	
C14:1 C9	
C15:0	0,016
C16:0 ISSO	
C15:1	
C16:0	4,789
C17:0 isso	
C16:1 C9	0,218
C17:0	0,019
C17:1	0,028
C18:0	2,342
C18:1 T6-T7-T8-T9	
C18:1 T10 - T11-T12	
C18:1 C9	57,918
C18:1 C11	4,180
C18:1 C12	1,735
C18:1 C13	1,014
C18:1 T16	
C18:1 C15	
C18:2 C9 C12	17,222
C20:0	0,010
C18:3 n6	0,530
C18:3 n3	7,491
C20:1	1,314
C18:2 C9 T 11	
C18:2 T10 C12	
C21:0	0,009
C20:2	
C20:3n6	
C22:0	0,293
C20:3n3	
C20:4	
C22:1	0,038
C23:00	0,020
C22:2	
C20:5	
C24:0	0,196
C24:1	0,096
C22:5	
C22:6	
Total	99,586