

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HELENA VIEL ALVES BEZERRA

**Efeito do cromo sobre o desempenho, qualidade de carne e perfil
transcricional de genes expressos no fígado e no músculo de cordeiros
alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado**

Pirassununga

2023

HELENA VIEL ALVES BEZERRA

Efeito do cromo sobre o desempenho, qualidade de carne e perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências do programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme
Coorientadora: Dra. Alessandra Fernandes Rosa

Pirassununga

2023

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do cromo sobre o desempenho, qualidade de carne e análise do perfil transcricional de genes musculares e hepáticos de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado", protocolada sob o CEUA nº 9035160620 (ID 001525), sob a responsabilidade de **Paulo Roberto Leme** e equipe; *Helena Viel Alves Bezerra; Sarita Bonagurio Gallo; Alessandra Fernandes Rosa; Vicente Luiz Macêdo Buarque* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 05/08/2020.

We certify that the proposal "Effect of chromium on performance, meat quality and transcriptional profile analysis of muscle and liver genes of lambs fed high concentrate diets", utilizing 32 Ovines (32 males), protocol number CEUA 9035160620 (ID 001525), under the responsibility of **Paulo Roberto Leme and team; Helena Viel Alves Bezerra; Sarita Bonagurio Gallo; Alessandra Fernandes Rosa; Vicente Luiz Macêdo Buarque** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 08/05/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2020** a **11/2020** Área: **Zootecnia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 120 dias**

Quantidade: **32**

Linhagem: **Dorper x Santa Inês**

Peso: **18 a 45 kg**

Pirassununga, 03 de maio de 2023



Profa. Dra. Luciane Silva Martello
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B474e Bezerra, Helena Viel Alves
Efeito do cromo sobre o desempenho, qualidade de carne e perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo de cordeiros alimentados com / Helena Viel Alves Bezerra ; orientador Paulo Roberto Leme ; coorientador Alessandra Fernandes Rosa. -- Pirassununga, 2023.
88 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Ruminantes. 2. Desempenho. 3. Qualidade de Carne. 4. Sequenciamento de RNA. 5. Genes diferencialmente expressos. I. Leme, Paulo Roberto, orient. II. Rosa, Alessandra Fernandes, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

*Meus bons feitos serão sempre dedicados primeiramente a Deus,
pois “Toda a boa dádiva e todo o dom perfeito vem do alto,
descendo do Pai das luzes, em quem não há mudança nem sombra
de variação”. (Tiago 1:17).*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre conduziu minha jornada. Colocou as pessoas certas em meu caminho, as pessoas-chave no momento certo, e ajudou aos Homens de boa vontade. Suas misericórdias não têm fim!

*“Bendize, ó minha alma, ao SENHOR, e tudo o que há em mim
bendiga o seu santo nome.*

*Bendize, ó minha alma, ao Senhor, e não te esqueças de nenhum
de seus benefícios”. (Sl. 103:1-2)*

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, amada *Alma mater*, onde tive a honra de passar os últimos dez anos de minha vida me aperfeiçoando profissionalmente, Quantas e tantas histórias, lembranças, experiências e oportunidades. Deixo registrada minha gratidão por ter sido nutrida desta madre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto, concessão número 2019/25265-3 (“Efeito do cromo no desempenho, qualidade da carne e análise do perfil transcricional de genes musculares e hepáticos de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado”).

Ao meu orientador, professor emérito, Dr. Paulo Roberto Leme, pela grande confiança e apoio dispensado a mim nos últimos seis anos da minha vida. Quão enriquecedor e tal qual privilégio trabalhar ao lado de alguém que carrega consigo tanta experiência e profissionalismo. Em nossa trajetória encontramos tantas pessoas, mas algumas carregamos para sempre, e não tenho dúvidas de que devo muito da minha vida profissional à este homem.

À Prefeitura do Campus Fernando Costa na pessoa do Prof. Dr. Arlindo Saran Netto, igualmente ao Departamento de Zootecnia na pessoa do Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno e, ao Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade de Carne (LAAQC – FZEA/USP) na pessoa do Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva pela concessão de infraestrutura para que este experimento fosse executado, bem como pelo apoio científico.

À Dra. Mirele Daiana Poleti por todo o apoio prestado na elaboração deste projeto, com todo seu conhecimento em ciências ômicas, que foi imprescindível para que no dia de hoje eu estivesse aqui.

À Profª Dra. Sarita Bonagurio Gallo por todo o apoio prestado com profissionalismo e solicitude durante a elaboração deste projeto.

À Dra. Alessandra Fernandes Rosa pela coorientação.

Aos meus amados pais, Brauner e Dijane, por estarem ao meu lado sempre.

“Voe o mais alto que puder, mas nunca se esqueça de suas raízes”.
(autor desconhecido).

Aos meus inesquecíveis bisavós Orlando e Cida (*in memoriam*), por terem semeado em meu coração o grande amor pela vida no campo e pela pecuária, inclusive as primeiras experiências com ela, ainda na tenra idade.

Ao meu noivo Samuel Alves de Oliveira. Como é bom ter seu apoio e sua calma. Sei que Deus me abençoou com a sua presença em minha vida, para dividi-la com você. Não tenho dúvidas de que você chegou no momento certo. Te amo e devo parte disso à você!

Aos companheiros de pós-graduação Vicente, Mariane, Douglas e Messy, pela ajuda nas horas de trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos meus estimados estagiários André, Regner, Guilherme, Leonardo, Natália, Leo Morallis e Lucas Bermudes, por tanto terem me ajudado com o experimento. Vocês foram meus braços direito e esquerdo, cuidaram dos animais com carinho e responsabilidade, nas horas mais cansativas de trabalho árduo estavam presentes, sem falar nos momentos de descontração. Eu não teria conseguido sem vocês. Espero ter agregado tanto em suas vidas quanto agregaram na minha!

À minha amiga-irmã Julia David Lourenzon. Poderia escrever um texto enorme, mas vou resumir com um provérbio:

“... mas há um amigo que é mais chegado do que um irmão”. (Pv. 18:24).

Aos meus queridos amigos Rafael, Gleice e Bruno. Vocês nem imaginam o quanto me ajudaram. Parte disso eu devo a vocês!

Ao querido German Ramirez pelo apoio e ajuda nesta fase final do doutorado. Como já mencionei, não tenho dúvidas de que Deus coloca as pessoas certas no momento certo em nossas vidas. Semelhantemente agradeço ao Thiago Silva e ao Guilherme Polizel pela ajuda com este projeto.

Minha eterna gratidão a todos vocês.

“Gratidão é saber que a nossa vida está rodeada de pequenos milagres”. (Autor desconhecido)

EPÍGRAFE

“Animal experimental: sob o nosso controle ele cresce, depende e confia. Respeito haja, enquanto vivo, pois não será em vão seu sacrifício.”

Ivan Sampaio.

RESUMO

BEZERRA, H. V. A. **Efeito do cromo sobre o desempenho, qualidade de carne e perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.** 2023. 88 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

O cromo é um elemento traço essencial para o metabolismo da glicose e há indicações de que aumenta a deposição muscular e altera o metabolismo de lipídeos e proteínas. Todavia, pouco se sabe sobre sua ação molecular, bem como a melhor dose para ruminantes. Assim sendo, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de três doses de cromo em comparação ao controle, sem cromo adicional, sobre o desempenho, qualidade da carne e o perfil transcricional de genes expressos no músculo e no fígado de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado. Foram utilizados 32 animais cruzados da raça Dorper X Santa Inês, recém-desmamados (peso vivo inicial médio de 18 kg) distribuídos em quatro tratamentos: controle (CTL), sem suplementação com cromo glicina (Orgolabs®), e suplementação com quelato de cromo a 1,0, 1,5 e 3,0 mg Cr/kg MS (Cr1,0, Cr1,5 e Cr3,0, respectivamente). Os animais foram mantidos em baias individuais e submetidos a uma dieta composta por 6% de volumoso (feno de capim *Cynodon* sp.) e 94% de concentrado e tiveram o peso mensurado a cada 14 dias para avaliação do desempenho. Após 60 dias de confinamento, os animais foram abatidos e amostras de músculo e fígado foram coletadas para análise do perfil transcricional de genes. Na carne foram avaliadas características como pH, cor, maciez, tempo de prateleira, peroxidação lipídica e perfil de ácidos graxos. Os resultados de desempenho, carcaça e qualidade de carne foram analisados através do programa SAS versão 9.0 por análise de regressão. Os genes expressos diferencialmente foram identificados usando o pacote estatístico DESeq2 disponível como parte do software de código aberto *Bioconductor* para bioinformática. Não foram observados efeitos de tratamento para nenhuma das características de desempenho avaliadas. Os tratamentos apresentaram efeito quadrático sobre peso e sobre o rendimento de costelas e vazio ($P = 0,069$ e $0,023$). Efeito de tratamento foi observado para o rendimento

de paleta, assim como um efeito quadrático ($P = 0,001$ e $P = 0,083$, respectivamente), onde os animais suplementados com Cr1,5 apresentaram os maiores valores, o que tendeu a reduzir conforme o aumento da dose de Cr. Um aumento linear ($P = 0,026$) foi observado nos valores de força de cisalhamento conforme a dose de Cr. Nas condições deste estudo, o cromo não apresentou efeito sobre o desempenho, no entanto aumentou o peso e rendimento de alguns cortes cárneos e afetou negativamente a palatabilidade da carne através do aumento da força de cisalhamento de acordo com a dose de Cr administrada. Foram encontrados 21 genes diferencialmente expressos no fígado, e 21 genes diferencialmente expressos no músculo, que estão relacionados ao metabolismo de lipídeos e prevenção da esteatose hepática, bem como de desordens metabólicas como a resistência insulínica. A suplementação dietética com cromo trabalhou efetivamente em nível molecular na síntese de RNA, deposição de proteínas, hipertrofia muscular e síntese de colágeno. Fatores de transcrição moduladores de funções como balanço energético também foram positivamente regulados nos animais suplementados, indicando menor deposição de tecido adiposo intramuscular. O cromo afetou positivamente o metabolismo do RNA, função mitocondrial, e o metabolismo de lipídeos e glicose.

Palavras-chave: Ruminantes; sequenciamento de RNA; genes diferencialmente expressos.

ABSTRACT

BEZERRA, H. V. A. **Effect of chromium on performance, meat quality and transcriptional profile of genes expressed in liver and muscle of lambs fed a high concentrate diet.** 2023. 88 f. Thesis (PhD) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2023.

Chromium is an essential trace element for glucose metabolism and there are indications that it increases muscle deposition and alters lipid and protein metabolism. However, little is known about its molecular action, as well as the best dose for ruminants. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of three doses of chromium glycine (Orgolabs®) compared to the control, without additional chromium, on performance, meat quality and the transcriptional profile of genes expressed in the muscle and liver of lambs fed diets with high proportion of concentrate. Thirty-two recently weaned Dorper X Santa Inês crossbred animals (average initial live weight of 18 kg) were divided into four treatments: control (CTL), without supplementation with chromium chelate, and supplementation with 1.0, 1.5 and 3.0 mg Cr/kg DM of chromium chelate (Cr1.0, Cr1.5 and Cr3.0, respectively). The animals were kept in individual stalls and submitted to a diet consisting of 6% roughage (*Cynodon* sp. grass hay) and 94% concentrate and had their weight measured every 14 days for performance evaluation. After 60 days of feedlot feeding, the animals were slaughtered and muscle and liver samples were collected for analysis of the transcriptional profile of genes. Meat characteristics such as pH, color, tenderness, shelf life, lipid peroxidation and fatty acid profile were evaluated. Performance, carcass and meat quality results were analyzed using the SAS version 9.0 program by regression analysis. Differentially expressed genes were identified using the DESeq2 statistical package available as part of the Bioconductor open source software for bioinformatics. No treatment effects were observed for any of the evaluated performance characteristics. Treatments had a quadratic effect on weight and yield of ribs and void ($P = 0.069$ and 0.023). Treatment effect was observed for the shoulder yield, as well as a quadratic effect ($P = 0.001$ and $P = 0.083$, respectively), where the animals supplemented with Cr1.5 showed the highest values, which tended to reduce as the dose of Cr. A linear increase ($P = 0.026$) was observed in the shear force values according to the dose of Cr. Under the conditions of this study, chromium had no effect on performance, however it increased the weight and yield of some meat cuts and negatively affected the palatability of the meat by increasing the shear force according to the dose of Cr administered. Twenty one genes differentially expressed in the liver, and 21 genes differentially expressed in the muscle were identified, which are related to lipid metabolism and prevention of hepatic steatosis, as well as metabolic disorders such as insulin resistance. Dietary chromium supplementation worked effectively at the molecular level on RNA synthesis, protein deposition, muscle

hypertrophy and collagen synthesis. Transcription factors that modulate functions such as energy balance were also positively regulated in supplemented animals, indicating less deposition of intramuscular adipose tissue. Chromium positively affected RNA metabolism, mitochondrial function, and lipid and glucose metabolism.

Keywords: Ruminant; RNA sequencing; differentially expressed genes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Cromo: formas químicas, mecanismo de absorção e fontes	7
2.2. Efeito do cromo no desempenho animal	11
2.3. Parâmetros de carcaça e qualidade de carne	15
2.4. Cromo e expressão gênica	22
2.5. Dose de cromo para ruminantes	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Local	31
4.2. Instalações	32
4.3. Animais e dieta	32
4.4. Tratamentos	34
4.5. Abate, mensurações na carcaça e coleta de amostras	34
4.6. Maturação, cor, perdas por cocção, força de cisalhamento e tempo de prateleira	35
4.7. Rendimento da porção comestível	37
4.8. Perfil de Ácidos Graxos da carne	37
4.9. Análises de rúmen	38
4.10. Análise dos resultados de desempenho, das características de carcaça e qualidade da carne, e rúmen	39
4.11. Perfil de expressão gênica no músculo e fígado	40
4.11.1. Extração de RNA, análise de qualidade, preparo de biblioteca e sequenciamento	40
4.11.2. Controle de qualidade, alinhamento das <i>reads</i> e contagem	40
4.11.3. Identificação de genes diferencialmente expressos e análise de vias	41
5. RESULTADOS	42
5.1 Desempenho e características de carcaça	42
5.2 Perfil de ácidos graxos e qualidade de carne	44
5.3 Parâmetros de morfologia ruminal	46
5.4 Perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo e análise de expressão diferencial	46

5.5 Análise de enriquecimento funcional dos DEGs em tecido hepático e muscular esquelético	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e a conseqüente intensificação da demanda por alimentos implicam em aumento da produção de proteína de origem animal, preferencialmente com baixo impacto sobre o meio-ambiente (GODFRAY et al., 2010). Para assegurar uma maior produtividade frente aos desafios na produção pecuária, têm-se empregado na nutrição animal diversos modificadores metabólicos, como por exemplo, a somatotropina, uso de castração imunológica, aditivos alimentares, ractopamina, zilpaterol, cisteamina, betaína e o cromo (DUNSHEA et al., 2016).

O cromo (Cr) é um elemento traço que foi primeiramente descrito como essencial para o metabolismo normal da glicose no organismo por Schwarz & Walter (1959). Dietas convencionais aparentemente atendem a exigência de Cr para o funcionamento normal da glicose, no entanto, sua suplementação dietética tem demonstrado estar envolvida em diversas funções metabólicas, com expressivo aumento de resultados positivos no tocante a benefícios supra-fisiológicos (GENTRY et al., 1999). Investigações nos últimos 30 anos têm comprovado a influência do Cr no metabolismo de glicose e/ou lipídios em suínos (MATTHEWS et al., 2001), humanos (DEBRAS et al., 1989; PRESS et al., 1990) e ruminantes (GENTRY et al., 1999; SUMNER et al., 2007), promoção de maior síntese de RNA e regulação do processo de tradução de proteínas nas células musculares (MOONEY & CROMWELL 1997; ZHANG et al. 2011) e mostrado impacto na produção animal (LINDEMANN et al., 1995; KEGLEY et al., 1997; HAYIRLI et al., 2001).

Todavia, os resultados são conflitantes, principalmente no que diz respeito à dosagem de Cr administrada como promotor de crescimento e, adicionalmente, não há exigências de Cr estabelecidas para ruminantes (VINCENT, 2007; PALLAUF & MILLER., 2006). Apesar de desde as primeiras investigações comprovarem que o Cr é necessário para o metabolismo normal de carboidratos e lipídeos em mamíferos, poucas informações sobre seu papel específico foram apresentadas, indicando a necessidade de identificação da ação biológica do Cr a nível molecular (DAVIS & VINCENT, 1997; ANDERSON, 1985; ANDERSON, 1987; MERTZ, 1993). A análise de sequenciamento de RNA é uma tecnologia ômica de alto rendimento que pode ser utilizada como

ferramenta para investigar os efeitos da nutrição na saúde (NOORI-DALOII & NEJATIZADEH, 2015). Avaliar a coleção completa de transcritos em uma célula ou tecido em um determinado momento é um modo de investigar a influência de alterações dietéticas sobre a transcrição dos genes (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Deste modo, a premissa deste estudo foi avaliar o efeito de doses de cromo na forma de quelato (Cr^{+3} + glicina, Orgolabs®) sobre o desempenho, as características produtivas quantitativas e qualitativas da carcaça e da carne e a análise do perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo, que justifique sua ação como modificador metabólico de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cromo: formas químicas, mecanismo de absorção e fontes

É conhecido o progressivo estudo sobre modificadores metabólicos para animais de produção, que aumentem a taxa de crescimento, melhorem a eficiência alimentar e a composição da carcaça, e conseqüentemente a qualidade da carne (DIKEMAN, 2007). O crescente interesse em estudar o Cr como suplemento dietético para animais de produção justifica-se em seus efeitos positivos como modificador metabólico, alterando a taxa de crescimento e resposta imune (CHANG & MOWAT, 1992; MOONSIE– SHAGEER & MOWAT, 1993; DEPEW et al., 1998), pois em estado trivalente, é descrito como um elemento traço essencial para mamíferos, que funciona como um cofator para o hormônio insulina e aumenta sua capacidade em regular o metabolismo da glicose, proteína e lipídeos (MERTZ, 1993).

O Cr é um elemento traço encontrado em pequenas quantidades nos ingredientes comumente utilizados na alimentação animal (BAILEY, 2014), podendo ser apresentado na forma de compostos inorgânicos ou complexos orgânicos (SUMNER; VALDEZ; MCNAMARA, 2007). É naturalmente detectado nos estados oxidados com íons 0, 2⁺, 3⁺, 6⁺, sendo o trivalente (Cr^{3+}) a forma mais estável (MCDOWELL, 1992) e de consumo seguro em detrimento do hexavalente, que é considerado tóxico, apesar de apresentar melhor taxa de absorção (CAZES, 1999). São esses os dois estados de valência

predominantemente encontrados. Os compostos de Cr hexavalente são extensivamente aplicados em diversas indústrias, enquanto que as formas trivalentes são utilizadas como micronutrientes e suplementos dietéticos (BAGCHI et al., 2002).

O Cr em sua forma trivalente (Cr^{+3}) faz parte do composto organometálico do fator de tolerância à glicose (GTF), sendo esta sua forma biologicamente ativa, que trabalha em sinergia com a insulina na captação de glicose (WHITNEY & CATALDO, 1983). A forma trivalente do Cr constitui a estrutura química do GTF e facilita a interação entre a insulina e seus receptores nos tecidos, potencializando sua atividade. Na ausência de Cr^{+3} , o GTF se torna inativo (MOORADIAN; MORLEY, 1987; ANDERSON; MERTZ, 1997).

O estímulo à ativação da insulina ocorre pela ação da cromodulina, ou substância de baixo peso molecular de ligação ao cromo (*Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance* – LMWCr), um oligopeptídeo com aproximadamente 1500 Da de peso molecular, constituído de quatro tipos de aminoácidos (glicina, cisteína, glutamato e aspartato) que possui a habilidade de potencializar os efeitos da insulina na conversão da glicose em dióxido de carbono ou lipídeos. Tal estímulo é diretamente dependente da quantidade de Cr presente na cromodulina, que desempenha papel intrínseco nos adipócitos. Nenhum outro composto natural que contenha Cr potencializa a ação da insulina deste modo (VINCENT, 1994; YAMAMOTO; WADA; MANABE, 1989).

O cloreto de cromo é a fonte inorgânica mais comum. As fontes inorgânicas apresentam menor taxa de absorção e menor atividade biológica em comparação às orgânicas, deste modo, sendo utilizadas como marcadores em estudos de digestibilidade (ANDERSON; KOZLOVSKY, 1985; OLIVEIRA, DJC; SOARES FILHO, 2005). A concentração de Cr em alguns ingredientes utilizados na alimentação animal apresenta uma variação média de 0,27 a 2,2 mg/kg MS (ARTHINGTON et al., 1997; BRATAKOS; LAZOS; BRATAKOS, 2002; BRYAN; SOCHA; TOMLINSON, 2004) e as forragens apresentam maior concentração de Cr do que os grãos (ANDERSON; BRYDEN; POLANSKY, 1992).

As fontes orgânicas de Cr incluem a niacina ligada ao cromo, cromo-L-metionina, complexo cromo-ácido nicotínico, cromo polinicotinato, cromo picolinato, levedura de cromo e quelato de cromo (ANDERSON; KOZLOVSKY,

1985), sendo a levedura a fonte de Cr que têm demonstrado maior biodisponibilidade e efetividade em estudos de nutrição animal (LYONS, 1997; JEEJEEBHOY, 1999), uma vez que a levedura possui a habilidade de acumular íons em altas concentrações (KASZYCKI et al., 2004). Todavia, a fonte que mais tem recebido atenção nos estudos ao longo dos anos é o cromo picolinato, sendo a mais popular na nutrição animal e humana (VINCENT, 2003).

Os mecanismos de absorção de Cr em ruminantes ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, sabe-se que a absorção de Cr no rúmen é insignificante e a recuperação varia em torno de 92 a 99% (GAEBEL et al., 1987). A hipótese é de que sua absorção ocorra na região proximal do jejuno em combinação com elementos quelatados (KHAN et al., 2014), e uma pequena quantidade pode ser absorvida no íleo e duodeno (CHEN; TSAI; DYER, 1973). O maior mecanismo de absorção é por difusão passiva (STOECKER, 1999). A biodisponibilidade de Cr inorgânico varia entre 1 a 3% da dose ingerida, enquanto que a de Cr orgânico é cerca de 10 a 30 vezes mais disponível, ou seja, de 15 a 30% da dose ingerida (FORBES; ERDMAN, 1983).

Ademais, fatores como a presença de aminoácidos e alto teor de carboidratos nas dietas aumenta a absorção de Cr (HUNT; STOECKER, 1996). Fatores como a interferência com íons de outros minerais, formação de compostos quelatados em forragens e quantidade de niacina presente podem afetar a biodisponibilidade e absorção de Cr. As fontes orgânicas são mais biodisponíveis por suas ligações quelatadas com aminoácidos, ácidos orgânicos, peptídeos ou outros compostos (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018; PECHOVA; PAVLATA, 2007; URBERG; ZEMEL, 1987).

O cromo picolinato é um sal que possui fórmula química CrPic_3 e é um complexo coordenado constituído de cromo trivalente e ácido picolínico (BERNER; MURPHY; SLESINSKI, 2004). Sua utilização como suplemento dietético têm demonstrado efeito positivo no funcionamento ótimo da insulina em pacientes com diabetes tipo 2, promoção de perda de peso, redução dos níveis de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e apolipoproteína B, a principal proteína da fração LDL, e aumento substancial da fração de apolipoproteína A-I, a principal proteína da fração HDL (“bom colesterol”) (MARTIN et al., 2006; PRESS; GELLER; EVANS, 1990).

Ademais, tem apresentado efeito positivo na produção animal, influenciando o desempenho, características da carcaça e deposição muscular de suínos (LIEN et al., 2001; ZHANG et al., 2011), aves (HUANG et al., 2016; KIM et al., 1996) e peixes (RAKHMAWATI et al., 2018). No que diz respeito ao desempenho de ruminantes, os resultados da suplementação com cromo picolinato são controversos (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018). No entanto, pode apresentar efeito sobre a deposição de gordura na carcaça e metabólitos que influenciem o desempenho, como a insulina, através da partição de nutrientes, e também os ácidos graxos não esterificados circulantes no plasma (KITCHALONG et al., 1995; FORBES et al., 1998). Além disso, está relacionado a alterações em parâmetros hematológicos em ruminantes, como aumento do MDA circulante (ZHANG et al., 2014).

Deste modo, questionamentos no que diz respeito à segurança da utilização do CrPic3 como suplemento dietético começaram a ser levantados, pois efeitos deletérios, como clivagem de cromossomos foram observados em células ovarianas de *hamsters* (STEARNS et al., 1995). Quando o efeito foi comparado utilizando como fonte de Cr o cromo nicotinato, tais efeitos não foram observados nos cromossomos. Complementarmente, (STEARNS et al., 2001) observaram efeito mutagênico ao *locus* de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase. Ambos estudos utilizaram doses altas e não-fisiológicas de CrPic3 (0.05 mM⁻¹).

Estudos *in vitro* apresentaram efeitos mutagênicos do CrPic3 sobre o DNA, seja pelo estímulo da produção de espécies reativas ao oxigênio intracelular (*reactive oxygen species* - ROS), como o radical hidroxila, que pode clivar o DNA (BAGCHI et al., 2002; SPEETJENS et al., 1999). Tal estímulo acontece aparentemente pela ligação do cromo com o ácido picolínico, o que não ocorre quando as substâncias são administradas separadamente (SUN et al., 2000). Efeitos como aumento da peroxidação lipídica e concentração hepática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ratos suplementados com CrPic3 foram observados por Preuss et al. (1997). Estudos comparativos do CrPic3 com cromo ligado à niacina, revelam que CrPic3 produz significativamente mais estresse oxidativo e danos ao DNA (BAGCHI et al., 2002).

Assim, a utilização de outras fontes orgânicas com alta taxa de absorção de Cr trivalente pode ser mais interessante no tocante à segurança. Neste contexto, minerais quelatados fornecem uma estrutura molecular que proporciona melhor absorção dos microminerais. São os minerais quelatados íons metálicos quimicamente ligados a uma molécula orgânica, formando uma estrutura estável e altamente biodisponível, sendo mais facilmente absorvida e, conseqüentemente, promove melhor eficiência alimentar, desempenho e qualidade de carcaça e de carne pelo melhor aproveitamento dos microminerais (AAFCO, 2000; CONDÉ et al., 2014).

É conhecido que as substâncias que formam quelatos com cromo geralmente estimulam a sua absorção. O processo de quelatagem constitui-se na ligação de íons metálicos com compostos orgânicos, geralmente aminoácidos, formando um composto solúvel estável que é melhor absorvido pela mucosa intestinal, uma vez que seu transporte é facilitado sem entrar no processo de competição iônica (PAIK, 2001).

O quelato de cromo é uma fonte orgânica capaz de atravessar diretamente a membrana da célula intestinal e ser metabolizada sem qualquer digestão prévia, uma vez que foi quelatada com um aminoácido. Estudos investigando a utilização de cromo metionina (Cr-Met) ou quelato de cromo na nutrição de ruminantes não encontraram nenhum efeito adverso no desempenho animal (OOH; LEE, 2005).

2.2. Efeito do cromo no desempenho animal

É conhecida a função fisiológica do Cr proposta por (MERTZ, 1993) no metabolismo de carboidratos, lipídeos e síntese de proteínas, bem como sua influência no crescimento e longevidade, uma vez que é o componente do GTF, que aumenta a sensibilidade dos tecidos à insulina e também melhora a utilização da glicose. Assim, a captação da mesma, sua utilização para a lipogênese, sua oxidação a dióxido de carbono e a glicogênese são aumentadas pela adição do Cr mais insulina nos tecidos animais (ANDERSON, 1987).

A atenção voltada à utilização do Cr como modificador metabólico e seus benefícios supra fisiológicos tem sido mais voltada a animais em crescimento. As respostas positivas no desempenho têm sido relacionadas à repartição de

energia do tecido adiposo para o muscular (LEIVA et al., 2015; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014).

Com relação à monogástricos, (ZHANG et al., 2011) avaliaram o efeito da suplementação com picolinato de cromo em suínos e observaram que sob a dose de 0,2 µg/g, os animais em fase de terminação apresentaram melhora significativa no ganho de peso médio diário e a massa magra corporal aumentou 3,86% durante todo o período de avaliação, relatando que o Cr promoveu melhora no desempenho, características de carcaça e deposição muscular. Os autores também observaram efeito do Cr no aumento da proporção RNA/DNA, o que demonstra que o Cr contribuiu para a promoção da síntese de RNA e regulou o processo de tradução de proteínas nas células musculares.

Li et al. (2013) avaliaram os efeitos da administração dietética de Cr-Met (0,0, 0,3, 0,6 e 0,9 mg/kg MS) para leitões em fase de crescimento/terminação e observaram aumento no consumo de matéria seca (CMS) e ganho de peso médio diário e melhora na conversão alimentar conforme o aumento do nível de Cr, porém, a área de olho de lombo e a espessura de gordura subcutânea diminuíram linearmente.

No que diz respeito ao desempenho de ruminantes, os resultados disponíveis na literatura são bem variáveis, principalmente levando em consideração a fonte de Cr e a dose utilizada. (KEGLEY; SPEARS; BROWN, 1997) observaram aumento do ganho de peso médio diário de novilhos Angus suplementados com 4 mg/kg MS de cromo-nicotinato, mas não houve efeito da suplementação sobre o CMS e eficiência alimentar, bem como no peso final. Em contrapartida, (BOHRER et al., 2016) não observaram efeitos da suplementação com cromo propionato para novilhos Angus em terminação nas características de desempenho. (MATHISON; ENGSTROM, 1995; WRIGHT; MOWAT; MALLARD, 1995) avaliaram a suplementação com quelato de cromo para novilhos e não observaram efeito sobre o CMS, ganho de peso médio diário ou eficiência alimentar.

(YAN et al., 2008) relataram potencial efeito da suplementação com Cr (0,0, 400,00 e 800,00 ppb de levedura de Cr) para cordeiros alimentados com diferentes níveis de proteína, sobre a modulação da energia entre o tecido muscular e adiposo, embora tenham observado efeito limitado sobre a taxa de

crescimento e as características de carcaça em relação aos efeitos dos diferentes teores de proteína da dieta.

Domínguez-Vara et al. (2009) ao avaliar cordeiros em terminação suplementados com levedura de Cr (0, 0,25 e 0,35 mg Cr/kg MS) observaram aumento linear do peso final, ganho de peso total e ganho médio diário, assim como aumento linear da área de olho de lombo na altura da 12^a costela conforme o aumento da dose de Cr. Adicionalmente, o CMS reduziu linearmente segundo a suplementação com Cr.

Estrada-Angulo et al. (2013) suplementaram cordeiros em fase de terminação, com 0,1,2 ou 3,0 g Cr/animal/dia na forma de levedura, em dieta com elevada proporção de concentrado, e não observaram aumento no CMS, no entanto, o ganho médio diário aumentou conforme o nível de Cr, e a eficiência alimentar foi melhorada, assim como o peso de corpo vazio e a área de olho de lombo. A suplementação aumentou o peso de corpo vazio e o peso das vísceras, no entanto, sem influenciar a proporção de corpo vazio. Os autores concluíram que, conforme o nível de Cr na dieta aumentou, houve melhoria na taxa de crescimento, rendimento de carcaça e na eficiência energética dos cordeiros.

(MORENO-CAMARENA et al., 2015) ao suplementarem cordeiros em terminação com levedura de cromo em diferentes níveis (0,0, 0,2 e 0,4 mg Cr/kg MS) observaram melhoria na conformação muscular e redução da deposição de gordura no fígado, conforme o aumento do nível de Cr. Todavia, (MORENO-CAMARENA et al., 2020), ao testarem a levedura de cromo a 0,0, 0,2, 0,4 e 0,6 mg Cr/kg MS novamente em cordeiros em terminação, não observaram influência do Cr nas características de desempenho e conformação da carcaça, no entanto, uma redução na deposição de gordura perirrenal e intramuscular ocorreu conforme o aumento do nível de Cr.

(MAHMOUD; ZANOUNY, 2018) avaliaram o efeito da suplementação com Cr-Met (0, 1,5 e 3,0 mg Cr/animal/dia) sobre o desempenho e respostas fisiológicas de cordeiros e não observaram influência sobre o CMS. No entanto, o ganho de peso médio diário e o ganho total foram aumentados com as duas doses, assim como houve uma melhora na eficiência alimentar. A suplementação com 3 mg Cr/animal/dia também influenciou respostas fisiológicas, como aumento da proteína sérica, albumina e glicose circulante,

cujos resultados os autores atribuíram à melhora no desempenho pelas alterações fisiológicas em resposta à suplementação com Cr.

(SEIFALINASAB; MOUSAIE; DOOMARY, 2021) investigaram o efeito de doses elevadas de Cr-Met (1,5 e 3,0 mg Cr/kg MS) comparados ao controle, sem cromo adicional, para cordeiros em fase de terminação expostos a estresse por calor e observaram menor CMS para ambas doses, e a taxa de consumo pelo ganho foi 21,5% menor para os animais suplementados com 3,0 mg/kg MS. Adicionalmente, não observaram impacto negativo da alta dosagem sobre os parâmetros hematológicos dos animais, concluindo que altas dosagens de Cr-Met melhoram o desempenho e a eficiência alimentar sem causar efeitos adversos no metabolismo de cordeiros em terminação.

Apesar da discrepância nos resultados no tocante ao CMS encontrados na literatura, em alguns estudos observa-se sua redução, que pode ser causada pela tendência do Cr em promover maior eficiência no uso de nutrientes periféricos, o que reduziria a ingestão de nutrientes adicionais (YARI et al., 2010).

O efeito do Cr no aumento do ganho de peso e melhoria na conformação da carcaça tem sido relacionado com seu papel no metabolismo de carboidratos e proteínas. O Cr também é conhecido por estimular a atividade de algumas enzimas *in vitro* e é importante na estrutura e metabolismo de ácidos nucleicos (WHITNEY; CATALDO, 1983; MERTZ, 1969). Sabe-se que a insulina, além de atuar no metabolismo de carboidratos, lipídeos e na homeostase da glicose, é responsável por regular o metabolismo e a síntese proteica (FELIG, 1975). O efeito da insulina no metabolismo de aminoácidos foi descrito com relação à estimulação da síntese de proteínas, transporte de aminoácidos para as células e inibição do catabolismo de proteínas. Há também efeito da insulina na redução da concentração sistêmica de aminoácidos circulantes e sua relação com a gliconeogênese (WOOL et al., 1972).

Esta redução da concentração de aminoácidos no plasma sugere que o local de captação de aminoácidos mediados pela insulina é o tecido muscular (RUSSEL, 1955). Assim sendo, o Cr está envolvido na regulação do metabolismo energético através da potencialização da insulina, e, de acordo com Fisher (1990), desempenha importante papel na síntese proteica, sendo utilizado

na nutrição humana como suplemento para melhoria do tônus e construção muscular para atletas durante o exercício físico.

Resultados inconsistentes em relação aos efeitos benéficos da suplementação de Cr na dieta no crescimento animal tornaram este micronutriente um tanto controverso. Divergências dos resultados provavelmente estão relacionadas à concentração e disponibilidade de Cr nas dietas base (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018). Segundo o NRC (2001), a quantidade de Cr biodisponível nos ingredientes comuns deve ser avaliada, antes de se estabelecer o seu requerimento para ruminantes.

Além disso, apesar de conhecer a função do cromo como mineral essencial para humanos e animais, sua importância exata, bem como seu mecanismo de ação ainda não estão bem elucidados. Ademais, informações limitadas a respeito da suplementação animal com Cr na forma quelatada com aminoácidos estão disponíveis em comparação às outras fontes orgânicas, como cromo propionato ou levedura de cromo (OOH; LEE, 2005).

2.3. Parâmetros de carcaça e qualidade de carne

Existem informações variáveis a respeito da influência da suplementação com Cr nas características de carcaça e qualidade de carne em ruminantes. No entanto, diversos estudos relataram que a suplementação com Cr influencia o rendimento de carcaça através do aumento do peso do músculo *longissimus* e da área de olho de lombo na altura da 12ª costela, em cordeiros em fase de terminação (DOMÍNGUEZ-VARA et al., 2009; ARVIZU et al., 2011; ESTRADA-ANGULO et al., 2013; SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2015). (BERNHARD et al., 2012) sugerem que a suplementação com Cr durante tal fase aumenta a captação de glicose pelos tecidos e aumenta sua sensibilidade à insulina, o que potencialmente aumenta a síntese proteica nos músculos.

(DOMÍNGUEZ-VARA et al., 2009) suplementaram cordeiros em fase de terminação com levedura de Cr (0, 0,25, ou 0,35 mg Cr/animal/dia) sozinha ou em combinação com levedura de selênio, onde a levedura de Cr afetou positivamente todas as variáveis avaliadas na carcaça dos animais tratados em combinação com levedura de selênio. Efeito quadrático foi observado na suplementação com Cr para peso de carcaça quente e fria e área de olho de

lombo. O tratamento também reduziu linearmente a gordura da carcaça (em g/kg PV e em kg), sugerindo que as leveduras de Cr e selênio interagiram como modificadores das características da carcaça, assim como do crescimento e dos metabólitos sanguíneos avaliados.

(ESTRADA-ANGULO et al., 2013) ao suplementarem cordeiros em terminação alimentados com dietas de alto grão com levedura de Cr (0, 2 ou 3 g levedura Cr/animal/dia), além de observarem aumento na área de olho de lombo, observaram aumento também no peso de carcaça quente e pequenos efeitos no rendimento de cortes.

(ARVIZU et al., 2011), no entanto, não relataram efeito da suplementação com Cr na forma de levedura sobre as características de carcaça, como rendimento, peso e área de olho de lombo, assim como sobre a maciez, teor de umidade e proteína. Todavia, a suplementação com Cr reduziu a espessura de gordura subcutânea na altura da 12^a costela em 18,4%. Tal redução foi justificada pela ação do Cr em promover uma redistribuição do tecido adiposo na carcaça devido à possíveis variações da sensibilidade à insulina nos adipócitos de diferentes sítios de deposição lipídica. Neste contexto, os autores também observaram menor deposição de gordura intramuscular na carne dos animais suplementados, concluindo que a suplementação com Cr foi capaz de produzir uma carne mais magra e indicaram como útil para a produção de carne saudável em sistemas de terminação com dietas de alto grão.

(SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2015) suplementaram cordeiros em terminação submetidos à uma dieta com elevada proporção de concentrado com Cr-Met (0, 0,60, 1,20 e 1,80 mg Cr/animal/dia) e observaram redução linear da deposição de gordura subcutânea conforme o aumento da dose de Cr, o que melhorou o rendimento estimado da carcaça. Adicionalmente, a concentração de gordura no músculo *longissimus* decresceu linearmente, no entanto, a de proteína permaneceu constante, todavia, a proporção proteína/gordura no músculo aumentou linearmente conforme o aumento da dose de Cr. Os autores concluíram que a suplementação com Cr mostra efeito modulador nas carcaças, e observaram que a resposta máxima ocorreu sob maior dosagem (1,80 mg Cr/animal/dia).

(MORENO-CAMARENA et al., 2020) suplementaram cordeiros com Cr na forma de levedura (0, 0,2, 0,4 e 0,6 mg Cr/kg MS) e não observaram sua influência sobre as características de carcaça ou qualidade da carne, como a maciez, no entanto, reduziu a deposição de gordura perirrenal e intramuscular, assim como alterou a proporção de ácidos graxos insaturados e saturados no músculo, onde os saturados (palmítico e esteárico) reduziram linearmente, enquanto que os insaturados (palmitoleico, vacênico, linoleico e araquidônico) aumentaram linearmente conforme a dose de Cr. Os autores concluíram que a suplementação com Cr proporciona a produção de uma carne mais saudável, o que pode ser de grande interesse na nutrição humana.

Deste modo, tem se assumido que o Cr é capaz de manipular a qualidade da carne devido a sua função biológica no metabolismo muscular e de lipídeos. Hong et al. (2002) suplementaram novilhos com Cr-Met (400 ppb) e encontraram melhoria no escore de marmoreio (Cr:controle = 4,7:4,2) e aumento da classificação de carcaças *prime* (Cr:controle, % = 72:66), sendo um resultado diferente dos já encontrados no tocante aos efeitos da suplementação com Cr no metabolismo de lipídeos. Os autores levantaram a hipótese de que a função do Cr em regular a glicose nos tecidos e produzir uma carne marmorizada por meio da suplementação é regulada segundo a fase do crescimento animal.

Resultados concretos do efeito do Cr no tocante à qualidade da carne de ruminantes ainda não são tão difundidos. Sobre o efeito da suplementação com Cr na qualidade da carne de animais de produção, os resultados variam de acordo com a espécie, dose e fonte. Em se tratando de não ruminantes, os resultados sobre a qualidade da carne são melhor definidos.

(HUANG et al., 2016) avaliaram o efeito da suplementação dietética com Cr em diferentes fontes (cromo propionato, cromo picolinato e cloreto de cromo) e em diferentes doses (0,4 ou 2,0 mg de Cr/kg) para frangos de corte submetidos à estresse por calor sobre as características de desempenho e qualidade de carne, e observaram que, independente da fonte, o percentual de gordura abdominal reduziu, no entanto, a gordura intramuscular do peito permaneceu inafetada. Os valores de b^* da cor da carne (que representam o croma que varia as tonalidades de azul ao amarelo) foram menores nos frangos suplementados com cloreto de cromo ou cromo picolinato. Independente da fonte, as perdas por

coçção foram menores na carne dos animais suplementados. Os autores concluíram que a suplementação melhorou tanto o desempenho, quanto as características da carcaça e da carne, independente da fonte de Cr utilizada.

(LI et al., 2013) suplementaram leitões em fase de terminação com Cr-Met (0, 0,3, 0,6 e 0,9 mg/kg MS) e observaram uma redução linear na área de olho de lombo e na espessura de gordura subcutânea, assim como no percentual de gordura intramuscular. Os valores de *shear force* mostraram aumento linear e um efeito quadrático sobre os valores representando a cor vermelha (a^*) da carne foi observado. Também houve efeito linear da concentração de mioglobina na carne, conforme a dose de Cr aumentou. Os autores concluíram que o Cr promoveu efeito positivo na aparência da carne pela melhora da cor, no entanto, pela redução da maciez e da gordura intramuscular, promoveu efeito negativo na palatabilidade.

Em se tratando de produção de ruminantes, nos últimos anos se tem enfatizado a melhora na qualidade da carne. Segundo Miller (1994), as características de qualidade são influenciadas, dentre muitos fatores, pela estrutura muscular e sua composição química, interações dos constituintes químicos, alterações *post mortem* nos tecidos, estresse e fatores pré-abate; em relação à aparência, a percepção da cor da carne, crua ou cozida, influencia a aceitabilidade ao produto. Os consumidores esperam uma cor atrativa da carne crua, sendo um dos atributos mais desejados no momento da compra.

O pigmento responsável pela coloração da carne, além da hemoglobina presente no sangue, é denominado mioglobina (ACTON & DAWSON, 2004), que, segundo Lehninger (2002), é uma proteína sarcoplasmática simples, solúvel em água, que possui capacidade de se ligar ao oxigênio e tem como função o armazenamento do mesmo para o metabolismo aeróbio dos músculos. Pode ser encontrada nos mamíferos, nas células musculares. Dependendo do tipo de músculo, pode compreender cerca de 50 a 80% dos pigmentos totais. A cor pode ser influenciada não somente pela quantidade de mioglobina presente, mas também pelo tipo de molécula e seu estado químico (FOX, 1987; LAWRIE, 2005).

Alguns trabalhos atribuíram os efeitos da dieta à cor da carne para o armazenamento de glicogênio, taxa de resfriamento, ou acúmulo de

antioxidantes, que em última análise podem relacionar-se às características intrínsecas fundamentais da cor do músculo, pH, consumo de oxigênio e atividade redutora de metamioglobina (FRENCH et al., 2000; VESTERGAARD et al., 2000; LYNCH et al., 2002; BRUCE et al., 2004; MANCINI; HUNT, 2005).

No tocante à maciez da carne, essa é uma das características organolépticas que mais influencia a percepção de aceitabilidade do consumidor. A sensibilidade é afetada principalmente pela quantidade e solubilidade de tecido conjuntivo, composição e estado contrátil das fibras musculares, extensão da proteólise muscular e deposição de gordura (JOO et al., 2013).

Têm se proposto um sistema bioquímico envolvido na maciez da carne. Um modelo de amaciamento proposto por Dransfield (1993) é baseado na ativação das calpaínas, pelo aumento na concentração de cálcio livre, a partir do início do *rigor mortis* – o declínio do pH de 6,5 a 5,7 aumenta a atividade da calpaína I de 15% a 97% da atividade máxima. O modelo compreende ainda a inibição das calpaínas pela calpastatina e a inativação de calpaínas e calpastatinas por autólise, na medida em que ocorre o amaciamento da carne.

Desta forma, este sistema de proteases cálcio dependentes está relacionado com a concentração de cálcio no músculo, que pode alterar as a atividade das enzimas proteolíticas, influenciando a maciez da carne, tanto fresca, quanto maturada.

Muitos processos celulares são regulados pelo cálcio que atua em combinação com a calmodulina, uma proteína de ligação ao cálcio presente na regulação de diversas atividades do metabolismo celular, dentre elas, associação a enzimas como quinases e fosfatases, receptores de membrana, fatores de transcrição, síntese e secreção de hormônios pela tireóide, pituitária e adrenal, secreção de insulina, proliferação celular, iniciação da síntese de DNA e está intimamente envolvida com os processos de contração muscular; sabe-se que a concentração intracelular de cálcio promove a ativação de enzimas envolvidas em tais processos. Mac Neil et al. (1987) observaram que o Cr em sua forma trivalente pode ativar a calmodulina em condições *in vitro*.

Uma vez que o Cr possui capacidade de ativar a calmodulina, que por sua vez, está envolvida nos processos celulares regulados pelo cálcio e também atua

no metabolismo de lipídeos, possivelmente influencia as características de qualidade de carne (LUSEBA, 2005).

Além disso, segundo (HOPKINS; HOLMAN; VAN DE VEN, 2015), o declínio do pH e da temperatura das carcaças influencia a maciez da carne ovina. Assim, uma janela ideal de queda de pH e temperatura modela a maciez da carne, incluindo o pH abaixo de 6,0 e temperatura entre 18 e 35 °C. O declínio do pH está associado a glicólise *post mortem*, que é a hidrólise do glicogênio muscular. A concentração de glicogênio muscular no momento do abate é um fator de grande importância que influencia a velocidade de queda do pH e o pH final. Reservas reduzidas de glicogênio reduzem a formação de ácido lático durante a conversão do músculo em carne, e, conseqüentemente, a extensão de queda do pH (BENDALL, 1973).

Reservas insuficientes de glicogênio resultam em valores de pH acima de 5,5 e, em casos extremos, no caso de o pH final permanecer alto (aproximadamente 6,2), a carne formada é conhecida como DFD (escura, firme e dura). Deste modo, quanto menor a reserva de glicogênio muscular no momento do abate, mais lenta será a queda do pH e maior seu impacto negativo na maciez da carne. As carnes DFD possuem grande ocorrência em machos não castrados e/ou terminados a pasto, uma vez que a densidade energética da dieta pode influenciar a reserva de glicogênio muscular. Ademais, o estresse é um fator de grande importância no tocante às reservas de glicogênio (IMMONEN et al., 2000).

Sabe-se que a suplementação com Cr promove aumento da concentração de glicose e de insulina, e age nas células aumentando a sensibilidade à mesma. Em alguns estudos, observa-se glicose sérica reduzida, possivelmente pelo aumento da captação pelos tecidos com sensibilidade à insulina aumentada, aumentando assim, a síntese de glicogênio. Alguns estudos comprovam aumento da concentração de glicogênio no fígado e no músculo de aves suplementadas com Cr (BROOKS et al., 2016).

Assim, mesmo que ocorra uma redução da deposição de gordura intramuscular em ruminantes em fase de terminação, submetidos à uma dieta de alto grão e suplementados com Cr, o que pode afetar negativamente as características de palatabilidade, como maciez e suculência, a maturação da

carne pode ser uma alternativa para suprimir os efeitos deletérios sobre a maciez, além de o Cr ser um importante aliado nas reservas de glicogênio muscular.

Ademais, o Cr é conhecido por reduzir os efeitos do estresse em ruminantes e melhorar o sistema imune (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018). Neste contexto, além de seu papel no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, a suplementação pode ser uma ferramenta metabólica para melhorar a qualidade da carne, sendo esta uma vantagem adicional como suplemento alimentar (OOH; LEE, 2005).

Além disso, a gordura e os ácidos graxos de cadeia longa contribuem para aspectos importantes da qualidade da carne e são fundamentais para os valores nutricionais e sensoriais (WEBB; O'NEILL, 2008). De acordo com Wood et al. (1999), a quantidade e o tipo de gordura na carne influenciam dois componentes organolépticos: a maciez e o sabor. Muitos estudos constataram que ácidos graxos insaturados possuem uma importante função na determinação do sabor e aroma. Contudo, o aumento destas proporções pode reduzir a estabilidade oxidativa dos lipídeos, favorecendo a deterioração da carne, por meio da peroxidação lipídica. Tais danos nas membranas fosfolipídicas resultam em alterações na qualidade da carne, seja ela exsudativa ou de nutrientes (OLIVO, 2006).

Quando ocorre a peroxidação lipídica, o produto final liberado é o malondialdeído (MDA). Sua mensuração é feita através da análise de Substâncias Reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*, que tem como produto principal o MDA. Considerando o mecanismo de ação da cromodulina e do LMWCr como carreadores de Cr em meio intracelular e aumentando a fluidez da membrana celular, (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018) propuseram que o metabolismo da insulina afeta a peroxidação lipídica, e o Cr como cofator da insulina pode estar envolvido na homeostase redox do organismo, contribuindo para a manutenção do *status* antioxidante (KRÓLICZEWSKA et al., 2004). De acordo com (DALÓLIO et al., 2017), a suplementação dietética com Cr para frangos de corte submetidos à estresse por calor proporciona melhora na qualidade da carne e reduz a

peroxidação lipídica, estendendo seu tempo de prateleira pela estabilidade dos lipídeos, além de reduzir a fração de LDL e a proporção de gordura na carne.

Deste modo, uma vez que pouco se conhece a respeito dos efeitos do Cr na estabilidade da carne de ruminantes, bem como no processo de maturação da carne, e é proposto que o mesmo atua no *status* antioxidante do organismo, além de influenciar no perfil lipídico e na cor da carne fresca, bem como no metabolismo do cálcio, avaliar o comportamento da cor e da extensão da peroxidação lipídica durante o tempo de exposição no *display*, bem como da cor e maciez no tempo de maturação é de grande importância para elucidar seus efeitos, uma vez que tais características são fatores de grande importância no tocante ao tempo de prateleira da carne e na aceitabilidade do consumidor (ZHAO; WELLS; MCMILLEN, 1994).

Adicionalmente, a suplementação com Cr para ovinos tem demonstrado reduzir a deposição de gordura abdominal (MOSTAFA-TEHRANI et al., 2006; ZHOU et al., 2013). Deste modo, avaliar o rendimento da carcaça, da porção comestível e da proporção dos componentes da não-carcaça é uma forma de lançar mão das ferramentas de avaliação das diferentes doses de cromo na forma de quelato para cordeiros como forma de responder as lacunas presentes na literatura no que diz respeito ao Cr como modificador metabólico e seus efeitos nas características de desempenho e qualidade de carne.

2.4. Cromo e expressão gênica

A expressão gênica tem por definição como sendo a produção de um fenótipo observável por um gene, que geralmente é direcionado a síntese de uma proteína (ALBERTS, 2002). Um fenótipo é uma característica observável de um organismo, e a mesma é o resultado do genótipo e de sua interação com o ambiente. Deste modo, é conhecido que alguns genes podem afetar determinados fenótipos sob condições ambientais específicas, ou seja, antes de um fenótipo se tornar aparente, é necessário que genes relacionados a ele sejam expressos (GANN, 2010; LESTER; BONNER, 1952). Assim, genes individuais podem dar origem a diversos transcritos e proteoformas. A expressão gênica envolve a transcrição, tradução e renovação de mRNAs e proteínas (BUCCITELLI; SELBACH, 2020).

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de um organismo e pode ser descrito pelo sequenciamento de RNA (RNA-seq) (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Este advento de tecnologia ômica permite entender a expressão gênica em vários níveis, uma vez que ambos mRNAs e proteínas são, na verdade, intermediários na expressão gênica e que possibilitam leituras que conectam os genes aos fenótipos (BUCCITELLI; SELBACH, 2020). Nesse contexto, a nutrigenômica é uma ferramenta genômica tecnológica de alto rendimento nos estudos em nutrição que permite entender como a mesma pode influenciar as vias metabólicas (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Essa abordagem celular permite visualizar os nutrientes como sinalizadores dietéticos que são detectados pelos sensores celulares e influenciam a expressão de genes, tradução de proteínas e, subsequentemente, a produção de metabólitos. Deste modo, a partir da perspectiva nutrigenômica, pode-se inferir que padrões de expressão gênica, proteínas e metabólitos em resposta a determinados nutrientes ou regimes nutricionais podem ser vistos como “sinalizações”. Existe um crescente reconhecimento que micronutrientes podem ser potentes sinalizadores que influenciam a programação do metabolismo celular e desempenham importante papel no controle da homeostase (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Nesse cenário, a abordagem biológica proporcionada pela nutrigenômica identifica as sinalizações do gene, proteína e subsequentemente metabólito que são associados com nutrientes específicos e podem funcionar como marcadores moleculares de alterações metabólicas induzidas por nutrientes. Assim, é possível identificar os fatores de transcrição que funcionam como sensores aos nutrientes e os seus genes-alvo; elucidar a sinalização das vias metabólicas envolvidas e caracterizar a maioria das sinalizações dietéticas; mensurar e validar as sinalizações da expressão gênica em células e órgãos específicos como consequência metabólica de micronutrientes específicos; elucidar as interações entre as vias metabólicas regulatórias relacionadas a determinados nutrientes (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Assim, a análise do perfil transcricional e de genes diferencialmente expressos em função de um regime dietético específico busca examinar como as sinalizações dietéticas em células, tecidos e organismos específicos foram

influenciados pela nutrição. Em órgãos ativos no metabolismo, como o fígado, por exemplo, os fatores de transcrição agem como sensores de nutrientes, alterando o nível de transcrição do DNA de genes específicos em resposta à alteração nutricional (FRANCIS et al., 2003; MÜLLER; KERSTEN, 2003).

O fígado é um órgão envolvido em diversos processos fisiológicos, como o metabolismo de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas), pela partição e o metabolismo dos mesmos que fornecem a energia para conduzir os processos relacionados à homeostase do organismo. Além disso, manipula o metabolismo de proteínas pelo processamento de aminoácidos e pela maior parte das proteínas segregadas no sangue. Adicionalmente, oxida os lipídeos e os direciona ao armazenamento no tecido adiposo, além de equilibrar a homeostase do colesterol. Também atua na regulação do volume sanguíneo, no suporte do sistema imunológico e endócrino, e ainda, armazena glicose na forma de glicogênio. Deste modo, diversas funções estão consolidadas em um único órgão (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2018).

Adicionalmente, a qualidade da carne depende de processos fisiológicos que acontecem no tecido muscular. Esses processos podem estar relacionados a diversos genes associados a características metabólicas e estruturais do músculo (DAMON et al., 2012).

Apesar do papel do Cr no metabolismo da glicose ser grandemente conhecido, conforme já abordado nesta revisão, pouca atenção tem sido dispensada no tocante à elucidação do mecanismo de ação preciso do Cr em humanos e animais. Existem alguns estudos sugerindo a influência do Cr trivalente na expressão gênica em alguns modelos animais em laboratório: (MAPLES; BAIN, 2004) avaliaram o perfil transcricional de genes hepáticos de peixes (*Fundulus heteroclitus*) provenientes de estuário exposto a Cr trivalente e expostos em condições laboratoriais em comparação ao controle, sem exposição, e observaram vinte genes diferencialmente expressos entre os expostos e os não expostos. Vários desses genes são homólogos a sequências conhecidas, incluindo uma proteína de ligação a ácidos graxos (*fatty acid-binding protein* - FABP), citocromo P4502N2 (CYP2N2) e um precursor do fator de iniciação de tradução eIF2B. Através da análise de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR), observou-se a repressão da FABP e do eIF2B.

Utilizando o mesmo modelo animal, (ROLING; BALDWIN, 2006) encontraram cinco genes diferencialmente expressos no fígado de peixes expostos ao Cr trivalente, incluindo os genes GSTs, GST α e ALDH4. Tais genes estão relacionados ao controle do estresse oxidativo e foram suprimidos em resposta ao Cr trivalente.

Considerando que a suplementação com Cr influencia a deposição de massa magra e utilizando ratos como modelo, (PADMAVATHI et al., 2010) estudaram a relação do cromo com a programação do desenvolvimento muscular. Os autores avaliaram os efeitos da restrição dietética materna de Cr durante a gestação no desenvolvimento e função muscular da progênie, em comparação a um tratamento sem restrição dietética. A avaliação dos genes de interesse foi efetuada no músculo *gastrocnemius* da progênie por PCR semi-quantitativo com 18S rRNA. Observou-se redução no percentual de massa magra corporal e de massa livre de gordura na progênie de mães restritas ao Cr. Tais características foram associadas aos genes Atrogin e MuRF1, que também foram reduzidos. Além disso, os genes relacionados ao desenvolvimento muscular (Myf 5 e MyoG) foram significativamente menores para os animais que sofreram restrição.

Adicionalmente, os autores estudaram a tentativa de reverter os efeitos deletérios da restrição no desenvolvimento muscular pela suplementação da progênie restrita com Cr, no entanto, os efeitos fenotípicos foram irreversíveis.

Utilizando como modelo laboratorial a cultura celular de mioblastos de ratos (L6 – linhagem de células resistentes à insulina), (QIAO et al., 2009) avaliaram a influência de três diferentes fontes de Cr (cloreto de cromo, cromo picolinato e quelato de cromo com pequenos peptídeos) na captação e metabolismo da glicose *in vitro*. Os autores observaram maior captação e metabolismo da glicose por estímulo à insulina na cultura de células esqueléticas. A nível molecular, os seguintes genes alvo foram avaliados por PCR quantitativo: IR – receptor de insulina; GLUT4 – transportador de glicose 4; GS – glicogênio sintase; UCP3 – proteína desacopladora mitocondrial 3, e observou-se um grande aumento de mRNA de tais genes estimulado pela insulina, e ainda mais com a adição de Cr, especialmente na forma quelatada com pequenos peptídeos. Assim, os autores concluíram que o Cr na forma de

quelato melhorou a captação e o metabolismo de glicose através da super regulação dos níveis de mRNA dos genes citados nas células musculares comparado à outras formas de Cr.

Do mesmo modo, (FENG et al., 2018) avaliaram a influência do cromo malato em cultura celular de mioblastos (L6) sobre a melhoria da resistência à insulina, e observaram aumento de mRNA através de PCR em tempo real dos genes GLUT-4, AMPKa2, Akt2, Irs-1, PPARc, PI3K e p38-MAPK, relacionados à proteínas de sinalização às vias de captação da glicose.

Partindo da premissa de que o Cr altera o metabolismo de lipídeos e utilizando ruminantes como modelo, (NAJAFPANAH et al., 2014) suplementaram cabritos com 0, 0,5, 1,0 e 1,5 mg de Cr/dia (Cr-met) e avaliaram a expressão do mRNA do gene ACC1 (Acetil-CoA carboxilase – enzima biotina-dependente que catalisa a reação de carboxilação de Acetil-CoA em Malonil-CoA, um metabólito intermediário chave na síntese de ácidos graxos) no fígado, gordura visceral, gordura subcutânea e no músculo *longissimus*. Os autores observaram que a expressão do gene ACC1 foi reduzida sob a dose de 1,5 mg Cr/dia no fígado e nas gorduras visceral e subcutânea, mas não no m. *longissimus*. Fenotipicamente, tal decréscimo na expressão do gene promoveu menor acúmulo de gordura, através da redução da espessura de gordura subcutânea e no percentual de gordura cardíaca. Além disso, não houve alteração no peso corporal, mas houve maior percentual de tecido muscular na carcaça dos animais suplementados. Os autores concluíram que o Cr promoveu direcionamento energético ao tecido muscular e também pode ser utilizado como aditivo dietético para melhoria da qualidade da carne.

Semelhantemente, (SADEGHI et al., 2015) avaliaram o efeito da suplementação com Cr-Met em cabritos (0, 0,5, 1,0 e 1,5 mg Cr/dia) na expressão dos genes Acetil-CoA carboxilase (ACC1), Diglicerídeo Aciltransferase (DGAT1), Proteína de ligação ao ácido-graxo 4 (FABPA4), Ácido-graxo sintase (FAS), Ob LEP gene (Ob = *Obese*; LEP= *leptin*), Lipoproteína lipase (LPL), Lipase hormônio-sensível (HSL) e estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1) em quatro tecidos diferentes: fígado, gorduras subcutânea e visceral e m. *longissimus*. Observou-se redução da expressão dos genes ACC1, DGAT1, FABP4, FAS, HSL e LEP nos animais suplementados com 1,5 mg Cr/dia, mas a

expressão dos genes LPL e SCD1 não foi afetada em todos os tecidos avaliados. Os autores concluíram que a suplementação dietética com doses supranutricionais de Cr altera a biossíntese e o metabolismo lipídico, reduzindo sua deposição e sugerem que o Cr pode ser um melhorador da qualidade da carne de animais de produção.

No tocante à qualidade da carne, (LI et al., 2013) avaliaram três doses de Cr-met (0, 0,3, 0,6 e 0,9 mg Cr/kg MS) para leitões em fase de terminação sobre as características fenotípicas como desempenho, qualidade e cor da carne, e a expressão do gene relacionado à cor por PCR quantitativo em tempo real. Os autores encontraram efeito quadrático sobre os valores relacionados à tonalidade de vermelho na cor da carne segundo a dose de Cr administrada, assim como para os valores de luminosidade. Conforme o Cr na dieta aumentou, um efeito quadrático sobre a quantidade total de mioglobina na carne foi observado, assim como sobre os níveis de mRNA do gene *mb* (mioglobina). Os autores concluíram que a suplementação com Cr-met melhorou a cor da carne pela super regulação do gene relacionado à mioglobina.

(MOORE et al., 2018) partiram da premissa de que a insulina atenua a vasoconstrição e acelera o relaxamento vascular e a recuperação de Ca^{+2} e estimula a expressão do gene Ca^{+2} ATPase em células de músculo liso vascular de ratos e humanos e investigaram o efeito do aumento da sensibilidade celular à insulina induzido por picolinato de cromo (CrPic) na regulação do transporte dos íons de Ca^{+2} no músculo liso vascular em cultura celular. Na ausência de insulina, o CrPic aumentou os níveis de mRNA do gene Ca^{+2} ATPase e, em combinação com a insulina, este aumento foi ainda maior. Os autores observaram um aumento de 35% da recuperação de Ca^{+2} induzida pelo CrPic. Apesar de ser um trabalho realizado em cultura celular, esta informação a respeito da influência do Cr na regulação metabolismo intracelular de cálcio vem ao encontro da hipótese de que o Cr pode afetar a maciez da carne maturada, conforme abordado no tópico de qualidade de carne presente nesta revisão.

Um trabalho recente lançou mão da tecnologia de sequenciamento de RNA (RNA-seq) para avaliar os efeitos da exposição ao picolinato de cromo (200 mg/kg⁻¹) sobre perfil transcricional de genes hepáticos de peixes (*Coral trout - Plectropomus leopardus*). Os autores encontraram 1030 genes diferencialmente

expressos (DEGs) entre os grupos expostos e não expostos ao Cr, incluindo 31 genes hiper-regulados e 82 subregulados. Os genes foram agrupados em 15 categorias funcionais. As seis maiores categorias dos DEGs estão relacionadas a vias do metabolismo lipídico (18,58%). A análise de enriquecimento funcional demonstrou que os DEGs são primariamente relacionados à síntese de esteroides, biossíntese de estrutura terpenóide e vias da biossíntese de hormônios esteroides (WEI et al., 2021).

Diante do exposto, nota-se que pouca atenção tem sido dispensada no tocante à análise do perfil transcricional de genes relacionados ao desempenho e qualidade da carne de ruminantes suplementados com Cr. Além disso, na maioria dos estudos, a abordagem da expressão gênica é avaliada em PCR quantitativo, e não utilizando a tecnologia ômica de alto rendimento, como o sequenciamento de RNA, que avalia todo o transcriptoma de determinado tecido e os genes diferencialmente expressos relacionados aos fenótipos de interesse em produção animal, sendo respostas que poderiam elucidar com clareza o mecanismo de ação do Cr a nível molecular. O sequenciamento de RNA permite análises do transcriptoma de genomas em uma resolução muito mais alta, em que o transcriptoma é sequenciado diretamente usando tecnologias de sequenciamento de próxima geração e comparado a um genoma de referência (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010).

Adicionalmente, o perfil transcricional de genes pode ajudar a identificar genes importantes, proteínas ou metabólitos que são alterados em estados que precedem doenças ou intoxicações e podem funcionar como biomarcadores (MÜLLER; KERSTEN, 2003), sendo uma ferramenta importante, uma vez que pouco se sabe acerca da influência molecular do Cr, e a maior parte dos efeitos fenotípicos de interesse em animais de produção ocorre em resposta a doses supranutricionais.

Uma vez que todas as células nucleadas compartilham o mesmo material genético, o que as diferencia são os genes específicos expressos em cada célula em momentos específicos. Tais genes são envolvidos em processos específicos do tecido ou do desenvolvimento. Somente com um completo entendimento dos *links* bioquímicos entre a nutrição e o genoma será possível compreender inteiramente a influência do Cr na alteração das vias metabólicas e essa

abordagem celular permitirá elucidar seu mecanismo de ação (ADAMS, 2008; MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Nesse contexto, como diversas funções biológicas e relacionadas à partição de nutrientes, bem como a diversas características também correlacionadas aos efeitos do Cr já observados na literatura são desempenhadas pelo fígado, assim como alguns fenômenos do fenótipo muscular já sofreram alterações conhecidas em resposta à suplementação dietética com Cr, os tecidos hepático e muscular foram escolhidos como alvo para a análise do perfil transcricional de genes através do sequenciamento de RNA em resposta à suplementação dietética com Cr na forma quelatada.

2.5. Dose de cromo para ruminantes

Conforme já abordado nesta revisão, o Cr possui funções essenciais no metabolismo normal de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos. Em condições normais, de acordo com o (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2007), dificilmente pode ocorrer deficiência ou toxicidade, e as dietas convencionais aparentemente atendem a quantidade necessária para a manutenção da homeostase no organismo. Todavia, o requerimento de Cr necessário para ruminantes ainda não está estabelecido.

A disponibilidade de cromo contido em dietas comerciais fornecidas a animais ruminantes na maioria das vezes não é mensurada, e por isso, não é conhecida. De acordo com (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018) os requerimentos de Cr parecem ser diferentes de acordo com a fase de vida do animal e condições de estresse. Segundo (COSTA E SILVA et al., 2016), em meta análise, o requerimento de Cr necessário para bovinos de corte em fase de crescimento varia de 1,54 a 3,74 mg, com média de 1,11 mg. (BERNHARD et al., 2012) observou uma diferença no ganho de peso médio diário de novilhos suplementados com 0,3 mg Cr/kg MS em comparação aos não suplementados. (KEGLEY; SPEARS; BROWN, 1997) sugeriram que 0,4 mg Cr/kg MS alteram positivamente o metabolismo de glicose, e tal dosagem foi adotada pelo NRC (2000) como recomendação de Cr para bovinos de corte, no entanto, ela foi baseada em suplementação.

(COSTA E SILVA et al., 2015) estimaram que o requerimento de Cr para manutenção para bovinos de corte é de 22,9 µg/kg PV e, de acordo com McDonald et al. (2002), o nível de toxicidade é de 50 mg/kg MS. Todavia, estudos têm demonstrado que a suplementação com Cr em doses supra-fisiológicas tem impactado positivamente a produção de ruminantes.

Estrada-Angulo et al. (2013) observaram melhoria linear do desempenho e características de carcaça ao suplementarem cordeiros em terminação com 0, 1,2 ou 3,0 g Cr/animal/dia na forma de levedura. Mahmoud; Zanouny (2018) suplementaram cordeiros com 0, 1,5 ou 3,0 mg Cr/animal/dia na forma de Cr-Met e observaram que a dose de 3,0 mg promoveu resposta máxima no desempenho, assim como (SEIFALINASAB; MOUSAIE; DOOMARY, 2021) que testaram 0, 1,5 e 3,0 mg Cr/kg MS (Cr-Met) e relataram resposta máxima sob 3,0 mg Cr/kg MS sem prejudicar os parâmetros sanguíneos dos animais.

Sob dosagens mais baixas, também foram observados efeitos lineares sobre o desempenho em estudo conduzido por (MORENO-CAMARENA et al., 2020) ao suplementarem cordeiros com 0, 0,2, 0,4 e 0,6 mg Cr/kg MS. (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2015) utilizaram Cr-Met sob 0, 0,6, 1,2 e 1,8 mg Cr/animal/dia para cordeiros em terminação e observaram resposta máxima no desempenho sob 1,8 mg Cr/animal/dia. É possível observar que os resultados positivos são respostas à doses supranutricionais e não-fisiológicas de Cr, onde, na maior parte dos estudos, os efeitos são lineares.

Adicionalmente, (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018) relatam que a dose de Cr tem sido expressa de formas diferentes nos estudos, como em mg/kg MS, mg/animal/dia, mg/kg PV^{0,75}/dia, ppm, dentre outras unidades de medida, não havendo um padrão. Ademais, é conhecido que a utilização de Cr na forma quelatada é mais absorvível e segura.

Diante do exposto, optou-se por avaliar três doses diferentes de Cr (1,0, 1,5 e 3,0 mg Cr/kg MS) na forma de quelato (Cr⁺³ + glicina, Orgolabs®) em comparação ao controle, sem cromo adicional sobre as características de desempenho, carcaça, qualidade de carne e análise do perfil transcricional de genes musculares e hepáticos de cordeiros alimentados com dieta com elevada proporção de concentrado.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito de três doses suplementares cromo na forma de quelato (glicina, Orgolabs®) sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade de carne, bem como sobre o perfil de expressão gênica muscular e hepática de cordeiros alimentados com dieta com elevada proporção de concentrado.

3.1. Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito do cromo sob três doses diferentes, comparado ao tratamento controle, sem cromo adicional, sobre as características produtivas quantitativas como a ingestão de matéria seca, ganho de peso, rendimento de carcaça, rendimento de porção comestível, área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea e densidade óssea.
- b) Avaliar o efeito do cromo sob três doses diferentes sobre as características qualitativas da carne como pH, cor, maciez, *shelf life*, peroxidação lipídica e perfil de ácidos graxos;
- c) Avaliar o perfil de expressão gênica no fígado e no músculo esquelético dos animais provenientes de tratamentos com resultados extremos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O experimento foi realizado no anexo do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne presente no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) em Pirassununga – SP, em área sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W. Gr) e altitude média de 635 metros. Segundo a classificação de Koppen, o clima da região é classificado como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FZEA, protocolada sob nº 9035160620.

4.2. Instalações

Os animais foram mantidos em galpão coberto e cercado com tela de alambrado, em baias individuais de 2 por 1,25 m, com piso ripado e água a vontade.

4.3. Animais e dieta

Foram utilizados 32 cordeiros machos, não castrados, cruzados da raça Dorper x Santa Inês, recém-desmamados, com peso vivo médio inicial de 18 kg e 60 dias. A dieta foi composta por 6% de volumoso (feno de capim *Cynodon* sp.) e 94% de concentrado a base de milho grão moído, farelo de soja, ureia e minerais, diferindo apenas na inclusão ou não de Cromo glicina e, conseqüentemente, na dose de cromo, e foi fornecida diariamente *ad libitum* às 07h00.

A formulação das dietas foi feita com base nas recomendações do (NRC, 2007) para cordeiros em terminação. A dose de Cr estabelecida para os tratamentos seguiu os padrões encontrados em revisão de literatura para cordeiros em fase de terminação. O requerimento de Cr para ovinos nesta categoria ainda não está estabelecido. A fonte de Cr orgânico utilizada foi o quelato de cromo (Cr^{+3} + glicina – Orgolabs®).

A mistura foi feita em misturador tipo horizontal com hélices helicoidais com capacidade para 500 kg, durante 10 minutos por batida. A composição percentual das dietas com base na matéria seca se encontra na tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual das dietas com base na MS

Ingredientes, %	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0
Milho grão moído	76,98	76,98	76,98	76,98
Farelo de soja	13,00	13,00	13,00	13,00
Feno <i>Cynodon</i> sp.	6,00	6,00	6,00	6,00
Calcáreo calcítico	2,00	2,00	2,00	2,00
Suplemento mineral ¹	0,60	0,60	0,60	0,60
Uréia	0,90	0,90	0,90	0,90
Cloreto de amônio	0,50	0,50	0,50	0,50
Quelato de Cr ²	0,0000	0,0010	0,0015	0,0030
Hidroxí-seleniometionina ³	0,0015	0,0015	0,0015	0,0015
Vitamina E ⁴	0,015	0,015	0,015	0,015
Monensina sódica ⁵	0,004	0,004	0,004	0,004
TOTAL	100	100	100	100
Nutrientes				
NDT, %	81,29	81,29	81,29	81,29
Proteína bruta, %	17,39	17,39	17,39	17,39
Proteína degradável no rúmen, %	10,2	10,2	10,2	10,2
FDN ⁶ , %	16,68	16,68	16,68	16,68
FDN efetiva, %	6,91	6,91	6,91	6,91
FDA ⁷ , %	13,23	11,43	11,07	12,33
N ligado a FDN, %	0,26	0,26	0,25	0,31
N ligado a FDA, %	0,52	0,52	0,52	0,52
Lignina em detergente ácido, %	2,48	1,65	1,69	2,77
Cálcio, %	0,87	0,87	0,87	0,87
Fósforo, %	0,42	0,42	0,42	0,42
Cr, mg/kg	0,07	1,94	2,27	3,89

¹ Coplasal Ovinos® (Coplacana): cálcio, 155g; fósforo, 83g; magnésio, 10g; enxofre, 35g; sódio, 120g; cobre, 756mg; zinco, 2800mg; iodo, 56mg; cobalto, 44 mg; selênio (selenito de sódio), 14 mg; flúor, 250 mg. ² Cr⁺³ + glicina, 10,1% Cr, Orgolabs®. ³ Selisseo® 2% Se, Adisseo (dose: 0,50 mg/kg MS (BEZERRA et al., 2020)). ⁴ Microvit® E Promix 50, (500 IU/g, α -tocopherol), Adisseo (dose de 100 UI/kg MS (BEZERRA et al., 2020)). ⁵ Rumenpac® - Mcassab (mínimo de monensina 200 mg/kg – neste estudo, a dose utilizada é de 8 mg/kg MS (POLIZEL et al., 2021)). ⁶ Fibra em detergente neutro. ⁷ Fibra em detergente ácido.

A adaptação dos animais ao manejo experimental foi feita durante cinco dias, em que receberam a dieta CTL. O nível de oferta para o primeiro dia de confinamento foi de 4% do peso vivo em matéria seca da dieta e o nível de oferta foi ajustado para manter consumo *ad libitum* (10% sobras). A sobra dos cochos foi retirada diariamente durante os primeiros dias de confinamento, sendo que

após este período as sobras passaram a ser retiradas três vezes por semana antes do trato da manhã, calculando-se a média do consumo para cada baia.

Amostras foram recolhidas e devidamente acondicionadas em sacos plásticos para análise de matéria seca, proteína bruta, nitrogênio não proteico, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro, segundo os padrões da (AOAC, 1995). Os nutrientes digestíveis totais foram estimados segundo (WEISS; CONRAD; ST. PIERRE, 1992). Os teores de Cr nos ingredientes e nos tratamentos CTL, Cr1,0, Cr1,5 e Cr3,0 foram estimados de acordo com Caputi (2013), apresentando concentrações de 0,07, 1,94, 2,27 e 3,89 mg Cr/kg MS, respectivamente.

A ingestão diária foi calculada pela subtração quantidade de matéria seca da dieta das sobras da quantidade de matéria seca da dieta fornecida. Também foi calculada a conversão alimentar e a eficiência alimentar dos animais, que foram pesados sem jejum a cada 14 dias para acompanhamento do ganho de peso. Fezes foram coletadas para realização de exame ovos por gramas de fezes (OPG) como manejo preventivo contra verminoses.

4.4. Tratamentos

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, em que os 32 animais foram distribuídos em quatro tratamentos, onde cada animal (baia) foi considerado uma unidade experimental, sendo oito repetições por tratamento:

1) Tratamento CTL: sem suplementação dietética com cromo.

2) Tratamento Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS

3) Tratamento Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS

4) Tratamento Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS

Importante frisar que os números são em cima da suplementação com Cr.

4.5. Abate, mensurações na carcaça e coleta de amostras

Após 60 dias de confinamento, os cordeiros foram transportados ao matadouro-escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em caminhão próprio para ovinos, com distância de 200 m do galpão experimental. O abate foi realizado seguindo os procedimentos humanitários estabelecidos

pela legislação brasileira. As carcaças foram então esfoladas e evisceradas e, imediatamente, uma amostra do músculo *longissimus* na altura da 12^o costela foi retirada, assim como uma amostra do fígado, e foram prontamente congeladas em nitrogênio líquido para a análise do perfil transcricional de genes por sequenciamento de RNA. Em seguida, as carcaças foram lavadas, identificadas e pesadas para determinação do peso de carcaça quente através da razão entre o peso da carcaça quente e o peso vivo final do animal, multiplicada por 100. O peso do corpo vazio foi determinado através da fórmula $PVC = PCA - (TGI - TGIV)$ em que PVC = peso de corpo vazio, PCA: peso corporal ao abate, TGI = Peso do trato gastrointestinal cheio, TGIV = Peso do trato gastrointestinal vazio (SAÑUDO & SIERRA, 1986). A gordura pélvica, renal e cardíaca foi separada manualmente, e pesada (USDA, 1982), assim como os outros componentes da não carcaça, como cabeça, couro, patas e trato reprodutivo, para determinação do rendimento verdadeiro e dos componentes da não carcaça com base no peso corporal vazio.

Foram mensurados o pH e a temperatura (0h *post mortem*) das carcaças no músculo *longissimus* na altura da 12^o costela, utilizando termômetro e pHgâmetro digitais com probe de penetração (modelo HI8314, Hanna Instruments) e armazenadas em câmara fria (0-2 °C) por 24 horas. Após este período, o pH e a temperatura foram mensurados novamente no mesmo local e as carcaças foram novamente pesadas para a determinação do peso de carcaça fria. O rendimento de carcaça fria foi calculado através da razão entre o peso da carcaça fria e o peso vivo final do animal, multiplicada por 100.

As carcaças foram divididas ao meio, e a meia-carcaça esquerda foi seccionada entre a 12^a e a 13^a costela para a mensuração da área de olho de lombo com uma grade reticulada transparente específica de 1 cm² e a espessura de gordura subcutânea, utilizando uma régua com graduação milimétrica.

4.6. Maturação, cor, perdas por cocção, força de cisalhamento e tempo de prateleira

Durante a desossa, bifes de aproximadamente 2,5 cm de espessura foram removidos do músculo *longissimus* entre a 12^a e a 13^a costela. Os mesmos foram identificados e embalados individualmente a vácuo, em saco plástico de filme

flexível de alta barreira ao oxigênio e agrupados por tratamento, e, em sequência, distribuídos aleatoriamente entre três tempos de maturação a 2°C de temperatura em câmara fria: 1, 7 e 14 dias, a partir do abate. Posteriormente a cada tempo de maturação, foram efetuadas as análises descritas a seguir.

A análise de cor foi feita 30 minutos após a exposição do músculo *longissimus* ao oxigênio, através de um espectrofotômetro portátil (modelo CM2500d Konica Minolta Brasil), utilizando um iluminante D65, com ângulo de observação de 10° e abertura do obturador de 10 mm, previamente calibrado com os padrões preto e branco, operando no sistema CIE L*a*b (CIE, 1986) (em que L* é o croma associado à luminosidade (L*=0 preto, 100 branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b*, que varia do azul (-) ao amarelo). A avaliação da cor foi realizada em três pontos distintos da amostra e tomando-se como valor da cor a média das três leituras.

Os procedimentos para cocção dos bifes destinados à análise de força de cisalhamento foram realizados segundo a *American Meat Science Association* (AMSA, 1995). Foram retirados quatro a seis cilindros (1,27 cm de diâmetro) de cada amostra na orientação da fibra muscular e cisalhados em um texturômetro (TMS-PRO - *Food Technology Corporation*, Sterling, EUA) para a determinação da força de cisalhamento em Newton (N) (AMSA, 1995).

Para análise do comportamento da cor e da peroxidação lipídica durante a exposição no display (tempo de prateleira), bifes com aproximadamente 1,5 cm de espessura foram retirados do músculo *longissimus* entre as 12ª e 13ª costelas, no momento da desossa, e acomodados em bandejas de isopor com papel absorvente, envoltos em filme de PVC, separadas por tratamento e colocadas aleatoriamente em painel expositor refrigerado a uma temperatura de 4°C e incidência luminosa de 1.000 lux, onde permaneceram por cinco dias, sendo coletados nos tempos 1, 3 e 5 (dias). As amostras foram analisadas para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) antes e após a exposição nos dias 1, 3 e 5, através dos procedimentos descritos abaixo.

Foram pesadas 5g de amostra dos bifes expostos no painel expositor refrigerado, que posteriormente foram trituradas e homogeneizadas para análise de TBARS, conforme metodologia proposta por (VYNCKE, 1975), em que uma curva com cinco pontos foi preparada, utilizando-se uma solução de

tetraetoxipropano de concentração conhecida. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 530 e 638 nm em espectrofotômetro (Multiskan GO – Thermo Scientific®). Para obter-se a concentração de malondialdeído nas amostras, a equação fornecida pela curva foi utilizada. Os resultados foram expressos em μg malondialdeído/kg carne.

4.7. Rendimento da porção comestível

Após 24h *post mortem*, as $\frac{1}{2}$ carcaças esquerdas foram subdivididas em cortes comerciais, e a porção comestível da carcaça e de seus respectivos cortes primários foi determinada pela soma do peso dos cortes cárneos desossados. A porcentagem da porção comestível da carcaça foi determinada com relação ao peso de meia carcaça resfriada (BONILHA et al., 2012).

4.8. Perfil de Ácidos Graxos da carne

Para determinação do perfil de ácidos graxos da carne, as amostras foram trituradas e homogeneizadas. Então, utilizou-se uma parcela de aproximadamente 3g do centro do músculo *longissimus*. A extração foi realizada pelo método descrito por Folch et al. (1957), onde os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1 em homogenizador Ultra Turrax Marconi®. Em seguida, os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%.

A gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com metodologia descrita por Kramer et al. (1997). Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (CG-2010 Plus - Shimadzu, auto injetor AOC 20i), utilizando coluna capilar SP-2560 (100 m \times 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial da coluna foi de 45°C, com aquecimento progressivo até chegar a 175°C, mantendo-se por 27 minutos. Em seguida, um novo aumento de 4°C/minuto foi iniciado até 215°C, mantendo-se durante 35 minutos. Foi utilizado Hidrogênio (H₂) como gás de arraste com fluxo de 40 cm³/s. A temperatura utilizada pelo detector por ionização em chama (FID) foi de 250°C, H₂ flow de 40 ml/min, air flow de 400 mL/min, Make-up de 30 mL/min kPa (N₂) e *Sampling Rate* de 40 msec. O tempo total da corrida por amostra (*Stop time*) foi de 86 minutos.

Os ácidos graxos foram identificados de acordo com o tempo de retenção dos ésteres de metil das amostras, utilizando-se os padrões 463 Nu-Chek®, ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18:2 trans-10 cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (Sigma®) e ácido tricosanóico (Sigma®). Os ácidos graxos foram quantificados por normalização da área dos picos dos ésteres de metil, com uso do Software GC solution 2.42®. Os ácidos graxos foram expressos em porcentagem do total de metil éster quantificado.

4.9. Análises de rúmen

Durante a evisceração, efetuou-se uma incisão através de corte único na região mediana do abdômen, iniciando-se na região do púbis em sentido ao esterno, para obtenção do composto rúmen, retículo, omaso e abomaso. Para avaliar o índice de rumenite, após a obtenção do composto, o rúmen foi isolado dos outros compartimentos, aberto, lavado em água corrente e examinado. As papilas ruminais foram classificadas visualmente, de acordo com a incidência de lesões, em uma escala de escore de 0 a 10 (BIGHAM; MCMANUS, 1975), em que cada ponto de escore representa 10% do rúmen comprometido, considerando incidência de rumenite qualquer classificação acima de zero. A avaliação é visual e subjetiva, portanto foi realizada por uma pessoa treinada.

Posteriormente, o saco cranial do rúmen foi identificado, de onde foram amostrados fragmentos de 1 cm² e acondicionados em solução tampão fosfato e armazenados a -4°C para conservação das células, para avaliação morfológica das papilas. Para a determinação do número de papilas por cm², as papilas foram contadas em um fragmento de 1 cm², por três avaliadores, determinando-se como o número de papilas a média das três contagens. Posteriormente foram seccionados da base dos fragmentos doze papilas, para mensuração da área média das papilas, percentual de área papilar e superfície total de absorção por cm² de parede. A estimativa do fragmento e das doze papilas para mensuração das variáveis foi realizada através do programa de análise de imagens *UTHSCSA Image Tool* (RESENDE-JUNIOR et al., 2006).

4.10. Análise dos resultados de desempenho, das características de carcaça e qualidade da carne, e rúmen

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC) com oito repetições para cada tratamento, totalizando 32 unidades experimentais. O modelo estatístico foi composto por:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ij} = Valor observado na parcela do tratamento i , no bloco j

μ = média geral

T_i = Efeito do tratamento i , aplicado na parcela

B_j = efeito do bloco j

e_{ijk} = efeito dos fatores não controlados

Os resultados do tempo de prateleira e maturação da carne (TBARS, cor L, a^* , b^* e maciez) foram avaliados como medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico para medidas repetidas no tempo foi composto por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + D(ik) + \beta(j) + (\alpha\beta) - (ij) + \delta_k + E_{ijkl}$$

Onde:

i = tratamento;

j = medidas no tempo;

k = blocos, $n = 4$;

Y_{ijkl} = valor da subparcela que recebeu os tratamentos i no tempo j no bloco k ;

μ = media geral;

α_i = efeito de tratamento i ;

$D(ik)$ = erro associado ao tratamento i no bloco k ;

$\beta(j)$ = efeito de tempo j ;

$(\alpha\beta) - (ij)$ = efeito da interação entre o tratamento e o tempo;

δ_k = efeito de bloco k ;

E_{ijk} = erro associado ao tratamento no tempo no bloco.

O efeito dos tratamentos sobre as características de desempenho, de carcaça e qualidade de carne e de rúmen foi avaliado por análise de regressão, cujos contrastes testados foram: CTL versus Cr1,0; CTL versus Cr1,5; CTL versus 3,0, considerando-se o animal como efeito fixo e o bloco como efeito aleatório, com ajuste para polinômios não igualmente espaçados. Os efeitos

lineares e quadráticos foram testados. As médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$), através do software SAS® (SAS, Institute Inc., Cary, NC). Considerou-se como significativo, valores de $P \leq 0,05$, e como tendência, valores de $P = 0,06$ a $0,1$.

4.11. Perfil de expressão gênica no músculo e fígado

Após o término de todas as análises descritas acima, foram selecionados o fígado e o músculo coletados no momento do abate dos animais provenientes do tratamento controle (CTL) e do tratamento extremo (Cr3,0) para a análise de sequenciamento de RNA.

4.11.1. Extração de RNA, análise de qualidade, preparo de biblioteca e sequenciamento

O RNA total foi extraído de 100 mg dos tecidos coletados no abate usando o reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA). A integridade do RNA foi verificada pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Somente amostras com $RIN > 8$ foram usadas. Um total de 2 μ g de RNA total de cada amostra foi usado para a preparação da biblioteca de acordo com o protocolo descrito no guia do kit TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina, San Diego, CA). O tamanho médio das bibliotecas foi estimado usando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) e quantificado usando PCR quantitativo com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após a quantificação, as amostras foram diluídas e agrupadas em pool, dois pools de 16 amostras. Duas lanes de uma flowcell de sequenciamento foram clusterizadas usando o kit TruSeq PE Cluster v3-cBot-HS (Illumina, San Diego, CA, EUA), e sequenciadas usando o equipamento HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, EUA) com um Kit TruSeq SBS v3-HS (200 ciclos), de acordo com as instruções do fabricante. As análises de sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômica da ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

4.11.2. Controle de qualidade, alinhamento das *reads* e contagem

Adaptadores de sequenciamento e *reads* de baixa complexidade foram removidos em uma etapa inicial de filtragem de dados. As estatísticas de controle

de qualidade e leitura foram estimadas com o software FASTQC versão 0.10.1 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>). O software Tophat v. 1.2.0 (TRAPNELL et al., 2009) foi usado para mapear *reads* para o conjunto de referência Oar_v3.1 disponível no Ensembl (http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Info/Index/). Uma montagem guiada por referência foi realizada usando o *Cufflinks* versão 2.0.2, com uma contagem mínima de alinhamento por locus de 10 (LANGMEAD et al., 2009), para identificar novas transcrições. Uma combinação de novas transcrições identificadas por *Cufflinks* e aquelas do arquivo GTF de referência no Ensembl foi usada como referência para quantificação de *reads* para cada transcrição. A abundância (contagem de *reads*) de mRNAs para todos os genes anotados foi calculada usando o software HTSeq versão 0.5.4 (<http://www.huber.embl.de/users/anders/HTSeq/>) (ANDERS e HUBER, 2010). Somente leituras de sequência mapeadas exclusivamente para cromossomos conhecidos (excluindo leituras mapeadas para contigs não atribuídos) foram usadas nesta análise.

4.11.3. Identificação de genes diferencialmente expressos e análise de vias

Genes expressos diferencialmente foram identificados usando o pacote estatístico DESeq2 disponível como parte do software de código aberto *Bioconductor* para bioinformática (LOVE et al., 2014). Antes da análise estatística, os dados da contagem de *reads* foram filtrados da seguinte forma: i) as transcrições com contagem zero foram removidas (não expressas); ii) genes com menos de 1 *read* por amostra foram removidos em média (expressão muito baixa); iii) genes que não estão presentes em pelo menos quatro amostras foram removidos (expressão rara).

Os níveis de expressão da transcrição foram ajustados como uma distribuição binomial negativa. Gráficos de diagnóstico exploratório foram gerados para verificar as estimativas de dispersão. A abordagem de corte realizada para identificar os DEGs foi a metodologia de Benjamini-Hochberg (1995) para controlar a taxa de descoberta falsa (FDR) em 10%. A análise de enriquecimento dos termos de ontologia genética foi concluída com a ferramenta

Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 (HUANG et al., 2007), utilizando a lista de genes que apresentaram FDR <10%.

5. RESULTADOS

5.1 Desempenho e características de carcaça

Não foi observado efeito dos tratamentos para nenhuma das características de desempenho avaliadas (Tabela 2). O ganho de peso médio diário variou de 310 a 352 g/dia e a ingestão média de alimento foi de 1,40 kg/dia, estando dentro aos valores de consumo preditos pelo NRC (2007), entre 1,0 e 1,5 kg/dia.

Tabela 2. Desempenho de cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo em dietas com alto concentrado

	Tratamento				Valor de P		
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	Dieta	Linear	Quadrático
Peso inicial, kg	24,8±1,98	25,2±1,98	24,8±1,99	25,0±1,97	0,998	0,957	0,951
Peso final, kg	43,1±2,31	43,5±2,31	42,4±2,38	44,5±2,29	0,934	0,682	0,731
GMD, kg	0,328±0,018	0,326±0,018	0,310±0,019	0,352±0,017	0,450	0,330	0,267
CMS (kg/dia)	1,425±0,08	1,456,31±0,08	1,334±0,08	1,404±0,07	0,770	0,748	0,723
CA	4,50±0,25	4,52±0,25	4,35±0,26	4,11±0,26	0,609	0,227	0,723
EA	0,23±0,013	0,22±0,013	0,24±0,014	0,25±0,013	0,556	0,201	0,735

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. GMD: Ganho de peso médio diário. CMS: Consumo de matéria seca. CA: Conversão alimentar. EA: Eficiência alimentar.

Para as características de carcaça, apenas observou-se efeito do tratamento com cromo para rendimento de paleta ($P = 0,001$; Tabela 3), tendendo a aumentar o percentual de rendimento quando suplementado 1,5 mg Cr/kg MS ($P = 0,083$). Adicionalmente, o tratamento com cromo tendeu a aumentar o rendimento de costelas+vazio ($P = 0,070$), observando-se um efeito quadrático com uma queda de rendimento quando forneceu-se 1,5 mg Cr/kg MS ($P = 0,023$). Semelhantemente, observou-se uma tendência para um efeito quadrático com uma redução no peso de costelas+vazio sob dose de 1,5 mg Cr/kg MS ($P = 0,069$).

Tabela 3. Características da carcaça de cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo em dietas com alto concentrado

	Tratamento				Valor de P		
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	Tratamento	Linear	Quadrático
PCQ (kg)	21,0±1,10	21,0±1,10	20,0±1,14	21,8±1,08	0,736	0,654	0,438
RCQ (%)	48,8±0,66	48,4±0,66	47,5±0,71	48,9±0,62	0,493	0,897	0,171
PCF (kg)	20,4±1,06	20,4±1,06	19,2±1,10	21,1±1,05	0,700	0,675	0,428
RCF (%)	47,2±0,69	47,0±0,69	45,9±0,73	47,3±0,65	0,475	0,994	0,203
AOL (cm ²)	23,5±1,37	24,5±1,37	21,3±1,44	22,3±1,35	0,428	0,388	0,835
EGS (mm)	2,60±0,23	2,40±0,23	2,43±0,25	2,31±0,22	0,835	0,410	0,810
KPH (kg)	1,30±0,22	1,37±0,22	1,10±0,22	1,71±0,22	0,315	0,229	0,270
KPH (% Carcaça)	6,05±0,85	6,30±0,85	5,93±0,87	7,89±0,93	0,357	0,138	0,404
Componentes não-carcaça (%)	60,9±2,36	60,9±0,36	63,4±2,53	58,0±0,23	0,464	0,385	0,272
Peso corporal vazio (kg)	39,6±2,13	39,8±2,13	39,0±2,19	41,2±2,12	0,911	0,623	0,672
Rendimento verdadeiro (%)	53,1±0,67	52,8±0,67	51,6±0,72	53,0±0,65	0,442	0,897	0,210
Paleta (kg)	1,28±0,07	1,22±0,07	1,33±0,07	1,32±0,07	0,712	0,551	0,893
Carré (kg)	1,95±0,15	1,97±0,015	1,63±0,15	1,90±0,15	0,407	0,714	0,338
Costelas+vazio (kg)	1,79±0,13	1,76±0,13	1,45±0,13	1,90±0,12	0,125	0,611	0,069
Pernil (kg)	2,44±0,16	2,49±0,16	2,18±0,16	2,61±0,18	0,330	0,519	0,243
Rendimento porção comestível (%)	51,6±1,03	50,4±1,03	50,1±1,03	51,1±1,01	0,732	0,840	0,283
Rendimento paleta (%)	12,8±0,42	12,1±0,42	14,7±0,42	12,8±0,39	0,001	0,577	0,083
Rendimento carré (%)	19,5±0,74	19,3±0,74	17,8±0,74	18,4±0,70	0,371	0,221	0,477
Rendimento costelas+vazio (%)	17,9±0,66	17,3±0,66	16,0±0,66	18,4±0,62	0,070	0,589	0,023
Rendimento pernil (%)	24,5±1,05	24,7±1,05	24,1±1,08	25,2±1,03	0,901	0,669	0,689

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. PCQ: Peso de carcaça quente. RCQ: Rendimento de carcaça quente. PCF: Peso de carcaça fria. RCF: Rendimento de carcaça fria. AOL: Área de olho de lombo. EGS: Espessura de gordura subcutânea. KPH: gordura pélvica, renal e cardíaca (do inglês "kidney, pelvic and heart fat"). Rendimento verdadeiro: calculado através da razão entre o peso de carcaça quente e o peso corporal vazio, multiplicada por 100. O peso corporal vazio é obtido pelo peso da gordura pélvica, renal e cardíaca, assim como dos outros componentes da não carcaça, como cabeça, couro, patas e trato reprodutivo, subtraídos do peso vivo antes do abate.

5.2 Perfil de ácidos graxos e qualidade de carne

Em relação aos efeitos do cromo na deposição de lipídeos e perfil de ácidos graxos na carne, os resultados são apresentados na tabela 4, indicando que não houve efeitos de tratamento ou dose-dependentes para esses atributos, com exceção de um efeito quadrático com redução no percentual de ácido erúxico na dose de 1,5 mg Cr/kg MS (C22:1n9; P = 0,05) e uma tendência linear com uma queda no percentual de ácido cáprico (C10:0; P = 0,068).

Tabela 4. Lipídeos totais e perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo (Cr⁺³+ glicina) em dietas com elevada proporção de concentrado

	Tratamento				Valor de P		
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	Tratamento	Linear	Quadrático
Lipídeos totais, %	1,87±0,001	2,38±0,001	2,68±0,001	2,69±0,001	0,450	0,161	0,449
C8:0	0,01±0,008	0,01±0,008	0,01±0,008	0,01±0,008	0,927	0,760	0,557
C10:0	0,14±0,000	0,14±0,000	0,13±0,000	0,12±0,000	0,271	0,068*	0,720
C11:0	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,001	0,639	0,668	0,262
C12:0	0,14±0,021	0,10±0,021	0,12±0,025	0,10±0,020	0,511	0,224	0,739
C12:1	0,00±0,002	0,00±0,002	0,00±0,002	0,00±0,002	0,888	0,789	0,800
C13:0	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,001	0,114	0,169	0,318
C14:0 iso	0,01±0,263	0,37±0,263	0,01±0,311	0,31±0,246	0,666	0,514	0,928
C14:0	2,30±0,245	1,87±0,245	2,32±0,290	1,81±0,230	0,332	0,227	0,913
C15:0 iso	0,05±0,006	0,06±0,006	0,06±0,007	0,05±0,006	0,974	0,810	0,693
C15:0 anteiso	0,09±0,006	0,08±0,006	0,09±0,007	0,08±0,006	0,476	0,681	0,917
C14:1c9	0,11±0,041	0,16±0,041	0,12±0,049	0,15±0,038	0,746	0,528	0,760
C15:0	0,52±0,056	0,41±0,056	0,51±0,066	0,40±0,052	0,378	0,223	0,995
C16:0 iso	0,06±2,496	3,45±2,496	0,07±2,953	3,11±2,335	0,668	0,487	0,956
C16:0	23,59±2,491	20,71±2,491	23,95±2,948	20,53±2,330	0,684	0,467	0,917
C17:0 iso	0,13±0,216	0,42±0,216	0,13±0,256	0,38±0,202	0,678	0,506	0,932
C16:1c9	2,17±0,128	2,27±0,128	2,29±0,151	2,14±0,119	0,807	0,813	0,355
C17:0	1,83±0,142	1,66±0,142	1,80±0,168	1,53±0,135	0,473	0,193	0,822
C17:1	1,40±0,994	2,75±0,994	1,34±1,176	2,44±0,929	0,696	0,578	0,925
C18:0	11,45±0,705	10,39±0,705	11,67±0,834	9,77±0,659	0,227	0,130	0,609
C18:1 trans	5,08±3,182	9,65±3,182	5,65±3,773	9,57±2,953	0,638	0,411	0,916
C18:1 c9	37,44±3,813	33,23±3,813	37,58±4,518	33,58±3,546	0,778	0,568	0,987
C18:1 c11	3,16±0,284	2,72±0,284	2,85±0,336	2,79±0,263	0,710	0,433	0,511
C18:1 c12	0,62±0,045	0,55±0,045	0,61±0,053	0,58±0,042	0,710	0,702	0,721
C18:1 c13	0,26±0,029	0,20±0,029	0,26±0,034	0,24±0,027	0,453	0,986	0,599
C18:1 t16	0,02±0,011	0,04±0,011	0,03±0,013	0,04±0,010	0,470	0,214	0,855
C18:1 c15	0,07±0,701	0,98±0,701	0,08±0,829	0,98±0,655	0,666	0,443	0,988
C18:2 c9c12	5,75±0,713	4,60±0,713	5,26±0,846	5,52±0,662	0,694	0,998	0,391
C20:0	0,03±0,003	0,03±0,003	0,03±0,004	0,03±0,003	0,997	0,837	0,955

C18:3 n6	0,04±0,011	0,04±0,011	0,04±0,013	0,06±0,010	0,578	0,273	0,490
C18:3 n3	0,10±0,014	0,11±0,014	0,10±0,016	0,12±0,013	0,670	0,345	0,625
C20:1	0,08±0,017	0,10±0,017	0,09±0,021	0,11±0,017	0,831	0,454	0,759
C18:2 c9t11	0,25±0,058	0,22±0,058	0,27±0,068	0,23±0,054	0,940	0,884	0,848
C18:2 t10c12	0,01±0,004	0,01±0,004	0,01±0,004	0,01±0,004	0,888	0,811	0,687
C20:2	0,03±0,015	0,05±0,014	0,03±0,016	0,05±0,014	0,589	0,460	0,917
C20:3 n6	0,11±0,011	0,10±0,012	0,10±0,014	0,12±0,011	0,471	0,446	0,176
C20:4 n6	1,60±0,238	1,16±0,238	1,25±0,281	1,45±0,224	0,590	0,825	0,228
C22:1n9	0,11±0,015	0,09±0,015	0,08±0,017	0,11±0,015	0,248	0,886	0,050
C20:5 n3	0,05±0,008	0,05±0,008	0,04±0,009	0,05±0,008	0,935	0,744	0,683
C22:5	0,19±0,030	0,15±0,030	0,17±0,035	0,16±0,028	0,762	0,587	0,515
C22:6 n3	0,05±4,179	5,81±4,179	0,03±4,944	5,04±3,909	0,667	0,502	0,943
AGS	40,37±1,267	41,58±1,267	40,96±1,492	39,77±1,198	0,764	0,623	0,424
MUFA	50,50±4,396	45,77±4,396	50,99±5,215	46,45±4,077	0,790	0,613	0,998
PUFA	7,31±1,260	7,05±1,333	7,90±1,569	8,65±1,455	0,855	0,451	0,812
P/S	0,18±0,842	1,46±0,842	0,20±0,996	1,39±0,909	0,594	0,442	0,968

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg/kg MS de cromo. AGS: Ácidos graxos saturados. MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados. PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados. P/S: Proporção de ácidos graxos poliinsaturados:saturados.

Efeitos do tratamento com cromo sobre os resultados de qualidade e tempo de prateleira da carne são apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Em relação as características de qualidade da carne, o cromo não afetou as variáveis L^* e b^* da cor, com exceção de uma tendência a reduzir a intensidade de a^* (tonalidades de vermelho) nos tratamentos com 1,0 e 1,5 mg Cr/kg MS ($P = 0,071$) e um efeito quadrático com o aumento da dose deste micromineral na dieta ($P = 0,026$). Por outro lado, foi observado um efeito linear com maior força de cisalhamento quando foi aumentada a dose de cromo na dieta dos animais ($P = 0,026$). De forma geral, as variáveis de cor, perdas por cocção e forças de cisalhamento foram afetadas em função do tempo de maturação da carne ($P = 0,013$; Tabela 5). A respeito da influência do tratamento com cromo para o tempo de prateleira, não foi observado nenhum efeito na coloração (L^* , a^* e b^*) nem na oxidação lipídica da carne (TBARS). Enquanto ao tempo de prateleira, as variáveis de cor e TBARS foram afetadas independentemente de tratamento (Tabela 6).

Tabela 5. Cor, perdas por cocção e força de cisalhamento da carne de cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo (Cr^{+3} + glicina) em dietas com elevada proporção de concentrado

	Tratamento				Dias de maturação			Valor de P				
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	1	7	14	Tratamento	Tempo	Tratamento*tempo	Linear	Quadrático
L*	40,21	38,92	40,19	39,41	36,78	40,85	41,43	0,699	<,0001	0,304	0,671	0,810
a*	15,28A	14,93B	14,24B	15,74A	14,06	15,99	15,11	0,071*	0,001	0,494	0,387	0,026*
b*	14,19	13,60	13,29	14,56	12,07	15,15	14,50	0,327	<,0001	0,641	0,529	0,095
PPC (%)	26,03	27,76	24,25	23,01	23,40	23,31	29,07	0,224	0,013	0,392	0,118	0,559
Força cisalhamento (N)	27,15	31,46	33,19	35,09	51,27	24,53	19,37	0,136	<,0001	0,516	0,026*	0,445

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. L* é o croma associado à luminosidade ($L^*=0$ preto, 100 branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b*, que varia do azul (-) ao amarelo. PPC: Perdas por cocção. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Tempo de prateleira da carne de cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo (Cr^{+3} + glicina) em dietas com elevada proporção de concentrado

	Tratamento				Dias no display			Valor de P				
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	1	3	5	Tratamento	Tempo	Tratamento*tempo	Linear	Quadrático
L*	43,07	41,71	42,24	40,86	39,14	43,98	42,80	0,248	<,0001	0,864	0,065	0,890
a*	12,78	13,02	12,40	12,75	12,73	13,11	12,38	0,534	0,088	0,155	0,766	0,730
b*	14,00	13,58	13,70	13,63	11,63	15,21	14,34	0,841	<,0001	0,653	0,520	0,597
TBARS	0,20	0,17	0,17	0,15	0,14	0,16	0,22	0,489	0,004	0,780	0,166	0,518

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. L* é o croma associado à luminosidade ($L^*=0$ preto, 100 branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b*, que varia do azul (-) ao amarelo. TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, expressas em μg de malondialdeído/kg de carne.

5.3 Parâmetros de morfologia ruminal

Não foram observados efeitos de tratamentos para nenhuma das características de morfologia ruminal ou para a incidência de rumenite ou lesões cecais nos cordeiros (Tabela 7).

Tabela 7. Características ruminais e incidência de lesão cecal em cordeiros suplementados com diferentes níveis de cromo (Cr⁺³+ glicina) em dietas com elevada proporção de concentrado

	Tratamento				Valor de P		
	CTL	Cr1,0	Cr1,5	Cr3,0	Tratamento	Linear	Quadrático
Escore rumenite	0,00±0,065	0,00±0,065	0,00±0,069	0,11±0,062	0,521	0,209	0,481
Escore lesão cecal	0,00±1,13	0,00±1,13	0,00±0,14	0,23±0,12	0,521	0,209	0,481
AMP, cm ²	0,18±0,03	0,22±0,03	0,16±0,03	0,21±0,03	0,531	0,726	0,865
ASA	10,31±1,32	10,09±1,32	10,05±1,38	10,90±1,32	0,966	0,732	0,721
ATSA	90,71±1,56	90,64±1,56	90,42±1,61	90,26±1,56	0,997	0,827	0,999
NMP	54,94±6,85	44,72±6,85	60,34±7,27	51,99±6,85	0,489	0,985	0,997

CTL: sem suplementação dietética com cromo. Cr1,0: 1,0 mg Cr/kg MS. Cr1,5: 1,5 mg Cr/kg MS. Cr3,0: 3,0 mg Cr/kg MS. AMP: área média de papilas, ASA: Área de superfície absorptiva por cm² de parede. ATSA: área total da superfície absorptiva. NMP: número médio de papilas por cm².

5.4 Perfil transcricional de genes expressos no fígado e no músculo e análise de expressão diferencial

Diferenças na expressão gênica global dos tecidos hepáticos e muscular esquelético foram analisados entre os grupos controle e suplementado com 3,0 mg de Cr/kg MS, devido a que essa foi a dosificação com resultados fenotípicos mais expressivos. Vinte e um genes diferencialmente expressos (DEGs) no fígado foram identificados, dos quais 10 foram regulados positivamente (\log_2 [FC] < 0) e 11 regulados negativamente (\log_2 [FC] > 0) no tratamento de Cr3,0. Enquanto no músculo esquelético, de 21 DEGs, 12 foram regulados positivamente e 9 com regulação negativa no grupo Cr3,0. As figuras 1 e 2 mostram os gráficos do tipo *Volcano plot* indicando DEGs em tecidos hepático e muscular esquelético para os tratamentos controle e Cr3,0. Os 21 DEGs em fígado e 21 DEGs em músculo esquelético para o contraste, considerando um valor de P ajustado (FDR) < 0,1, são apresentados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

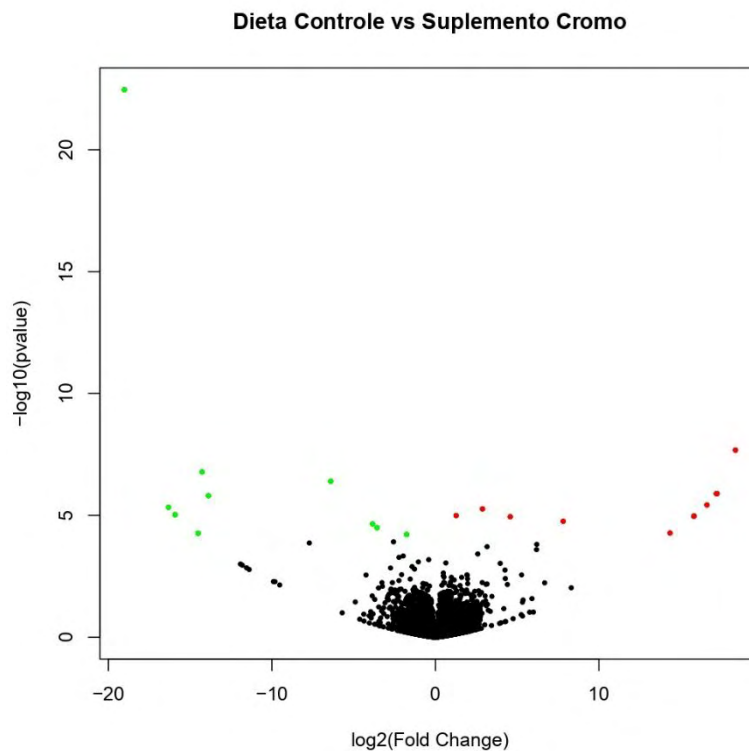


Figura 1. Genes diferencialmente expressos no fígado de cordeiros entre os tratamentos controle e suplementação com 3,0 mg de Cr/kg MS. O gráfico Volcano plot mostra log2 Fold Change (eixo x) versus o $-\log_{10}$ (P-valor ajustado [FDR], eixo y), indicando regulação positiva ($\log_2 [FC] < 0$; verde) e regulação negativa ($\log_2 [FC] > 0$; vermelho) de DEGs do tratamento Cr3,0 vs. Controle.

Tabela 8. Genes diferencialmente expressos no fígado de cordeiros suplementados com 3,0 mg de cromo ou não em dietas com alto concentrado

Gene Code	Gene name	baseMean	log2FoldChange ¹	lfcSE ²	Stat ³	P-value	FDR ⁴
LOC121818085	Unidentified	4,55E+14	-1,90E+14	1,92E+14	-9,92E+14	3,4876E-09	7,51407E-05
LOC114115623	<i>TOMM20</i>	2,88E+14	1,83E+14	3,27E+13	5,60E+14	210581,022	0,000226848
LOC101113807	<i>OVGP1</i>	7,39E-01	-1,43E+14	2,73E+14	-5,24E+14	16488970,2	0,001184183
LOC101120326	<i>TUBA1B</i>	4,41E+13	-6,41E+14	1,26E+14	-5,07E+14	39916442,6	0,002149999
LOC114117819	<i>CCNB1</i>	2,30E+14	1,72E+14	3,55E+14	4,84E+14	128080262	0,004599149
SFTPB	<i>SFTPB</i>	1,57E+14	1,72E+14	3,56E+14	4,84E+13	127848956	0,004599149
LOC101108681	<i>ZNF347</i>	5,04E-01	-1,39E+14	2,89E+14	-4,80E+14	156078446	0,004803872
LOC105602189	Unidentified	6,32E-01	1,66E+14	3,59E+14	4,63E+14	374349392	0,010081697
ANO2	<i>ANO2</i>	8,13E-01	-1,63E+14	3,56E+14	-4,58E+14	467364722	0,011188192
EP4C	<i>EP4</i>	7,92E+14	2,88E+14	6,34E-01	4,55E+14	541750948	0,011672024
ANO4	<i>ANO4</i>	2,87E-01	1,58E+14	3,59E+13	4,40E+14	1061893405	0,016407774
GLT1D1	<i>GLT1D1</i>	1,98E+14	1,27E+14	2,87E-01	4,41E+14	1019117881	0,016407774
GRID1	<i>GRID1</i>	1,38E+14	-1,59E+14	3,59E+14	-4,43E+14	94329280	0,016407774
LOC114109518	<i>RPL37A</i>	6,83E+14	4,58E+14	1,04E+14	4,39E+13	1142337452	0,016407774
LOC121819395	<i>Merlin/NF2</i>	2,86E-01	1,58E+14	3,59E+14	4,40E+14	1091605130	0,016407774
LOC101121371	<i>RPL37A</i>	5,14E+14	7,82E+14	1,82E+14	4,30E+14	1743328241	0,023475004
LOC101122347	<i>WWP1</i>	7,91E+14	-3,84E+14	9,06E-01	-4,24E+14	2262180648	0,028669813
LOC101115571	<i>KRT18</i>	3,49E+14	-3,57E+14	8,58E-01	-4,16E+14	3216929775	0,038504862
LOC101119111	<i>NSA2</i>	2,26E+14	-1,45E+13	3,60E+14	-4,04E+13	5412764136	0,058309002
SCGB1A1	<i>SCGB1A1</i>	1,04E+14	1,43E+13	3,55E+14	4,04E+14	5297091761	0,058309002
SPNS3	<i>SPNS3</i>	1,83E+13	-1,76E+14	4,39E-01	-4,01E+13	6077776601	0,062355094

¹log2FoldChange: valores negativos indicam DEGs regulado positivamente e os DEGs regulados negativamente são apresentados com valores positivos no tratamento Cr3,0 vs. Controle. ²lfcSE: *log Fold Change Standard error*. ³Teste de Wald, 8 repetições por tratamento. ⁴P ajustado (FDR). *TOMM20* = mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog; *OVGP1* = oviduct-specific glycoprotein-like; *TUBA1B* = tubulin alpha-1B chain; *CCNB1* = G2/mitotic-specific cyclin-B1-like; *SFTPB* = surfactant protein B; *ZNF347* = zinc finger protein 347; *ANO2* = anoctamin 2; *EP4* = Prostaglandin EP4 receptor; *ANO4* = anoctamin 4; *GLT1D1* = glycosyltransferase 1 domain containing 1; *GRID1* = glutamate ionotropic receptor delta type subunit 1; *GRID1* = glutamate ionotropic receptor delta type subunit 1; *Merlin/NF2* = Merlin/neurofibromatosis type 2; *RPL37A* = 60S ribosomal protein L37a; *WWP1* = NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP1; *KRT18* = keratin, type I cytoskeletal 18-like; *NSA2* = ribosome biogenesis protein NSA2 homolog; *SCGB1A1* = secretoglobin family 1A member 1; *SPNS3* = sphingolipid transporter 3.

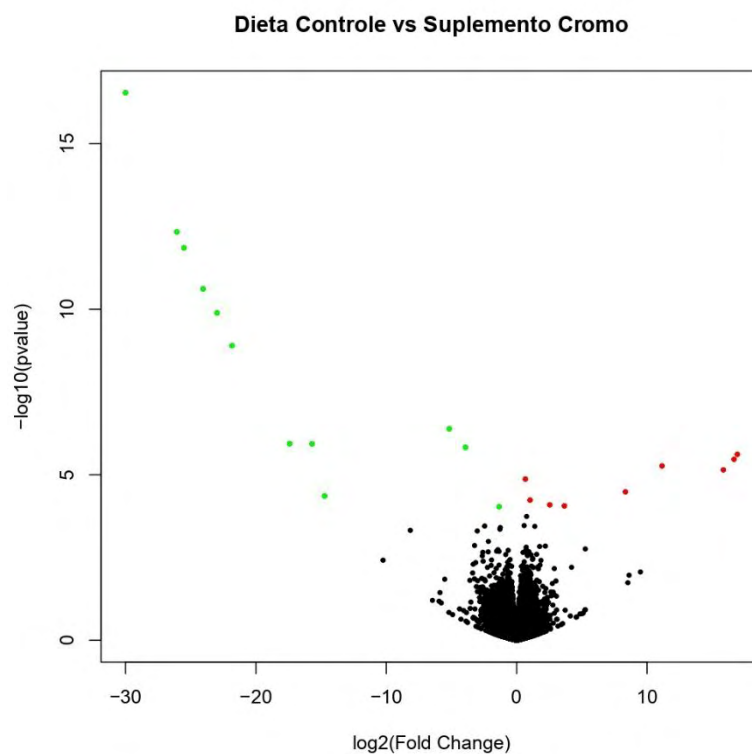


Figura 2. Genes diferencialmente expressos no músculo esquelético de cordeiros entre os tratamentos controle e suplementação com 3,0 mg de Cr/kg MS. O gráfico Volcano plot mostra log2 Fold Change (eixo x) versus o $-\log_{10}$ (P-valor ajustado [FDR], eixo y), indicando regulação positiva (\log_2 [FC] < 0; verde) e regulação negativa (\log_2 [FC] > 0; vermelho) de DEGs do tratamento Cr3,0 vs. Controle.

Tabela 9. Genes diferencialmente expressos no músculo de cordeiros suplementados com 3,0 mg de cromo ou não em dietas com alto concentrado

Gene Code	Gene name	baseMean	log2FoldChange ¹	lfcSE ²	Stat ³	P-value	FDR ⁴
LOC105606567	<i>RPL39</i>	8,30E+14	-3,00E+01	3,55E+14	-8,45E+13	2,91E-03	6,00E-13
LOC114118459	<i>RPS25</i>	3,72E+14	-2,61E+14	3,60E+14	-7,24E+14	4,64E+00	4,81E-09
LOC114113934	<i>RPL35A</i>	6,90E+14	-2,55E+14	3,60E+14	-7,08E+14	1,40E+02	9,65E-09
LOC101107031	<i>BTF3</i>	5,54E+14	-2,41E+14	3,60E+14	-6,68E+14	2,43E+03	1,25E-07
LOC114114907	<i>HNRNPA1</i>	1,86E+14	-2,30E+14	3,57E+14	-6,43E+14	1,29E+03	5,35E-07
LOC101119111	<i>NSA2</i>	4,65E+13	-2,18E+14	3,60E+14	-6,07E+14	1,27E+05	4,38E-06
LOC114116224	<i>ULBP1</i>	1,50E+14	-5,17E+14	1,02E+14	-5,06E+14	4,10E+07	0,0012
LOC114118388	<i>RRM2</i>	2,13E-01	-1,74E+14	3,58E+14	-4,86E+14	1,16E+08	0,0027
LOC121818987	Unidentified	1,50E+13	-1,57E+14	3,23E+14	-4,86E+14	1,17E+08	0,0027
LOC114116087	Unidentified	3,30E+14	-3,93E+14	8,16E-01	-4,81E+14	1,49E+08	0,0031
LOC121817503	<i>COX6C</i>	1,03E+14	1,69E+14	3,59E+13	4,71E+14	2,43E+08	0,0046
LOC114115302	<i>TMED5</i>	7,62E-01	1,67E+14	3,59E+14	4,64E+14	3,41E+07	0,0059
LOC114110822	<i>ODC1</i>	1,13E+14	1,12E+14	2,45E+14	4,55E+13	5,43E+08	0,0087
LOC101109899	<i>HNRNPA1-like</i>	7,98E-01	1,59E+14	3,53E+14	4,49E+14	7,12E+08	0,0105
DLL1	<i>DLL1</i>	9,23E+14	6,70E-01	1,54E-01	4,35E+14	1,36E+09	0,0188
LOC101121371	<i>RPL37A</i>	1,54E+14	8,35E+14	2,01E+14	4,15E+13	3,30E+09	0,0428
LOC121819647	Unidentified	2,58E-01	-1,47E+14	3,61E+13	-4,09E+14	4,39E+09	0,0535
EMP1	<i>EMP1</i>	9,69E+14	1,03E+14	2,55E-01	4,02E+14	5,84E+09	0,0673
LOC101113252	<i>MYH3</i>	7,44E+14	2,54E+14	6,44E-01	3,94E+14	8,13E+09	0,0888
LOC114109518	<i>RPL37A</i>	3,47E+14	3,66E+14	9,34E-01	3,92E+14	8,73E+09	0,0906
GCNT1	<i>GCNT1</i>	6,49E+14	-1,35E+14	3,45E-01	-3,91E+14	9,23E+09	0,0912

¹log2FoldChange: valores negativos indicam DEGs regulado positivamente e os DEGs regulados negativamente são apresentados com valores positivos no tratamento Cr3,0 vs. Controle. ²lfcSE: *log Fold Change Standard error*. ³Teste de Wald, 8 repetições por tratamento. ⁴P-adj: valor de P ajustado. *RPL39* = 60S ribosomal protein L39; *RPS25* = 40S ribosomal protein S25; *RPL35A* = 60S ribosomal protein L35a-like; *BTF3* = Basic Transcription Factor 3; *HNRNPA1* = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; *NSA2* = ribosome biogenesis protein NSA2 homolog; *ULBP1* = UL16-binding protein 1-like; *RIR2* = ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2-like; *COX6C* = cytochrome c oxidase subunit 6C-like; *TMED5* = transmembrane emp24 domain-containing protein 5; *ODC1* = ornithine decarboxylase-like; *HNRNPA1* = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like; *DLL1* = delta like canonical Notch ligand 1; *RPL37A* = 60S ribosomal protein L37a; *EMP1* = epithelial membrane protein 1; *MYH3* = myosin-3; *GCNT1* = glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1.

5.5 Análise de enriquecimento funcional dos DEGs em tecido hepático e muscular esquelético

A análise de enriquecimento funcional KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) identificou 40 vias metabólicas em fígado (figura 3) e 42 vias metabólicas em músculo esquelético (figura 4) afetadas pela alimentação com cromo nos cordeiros.

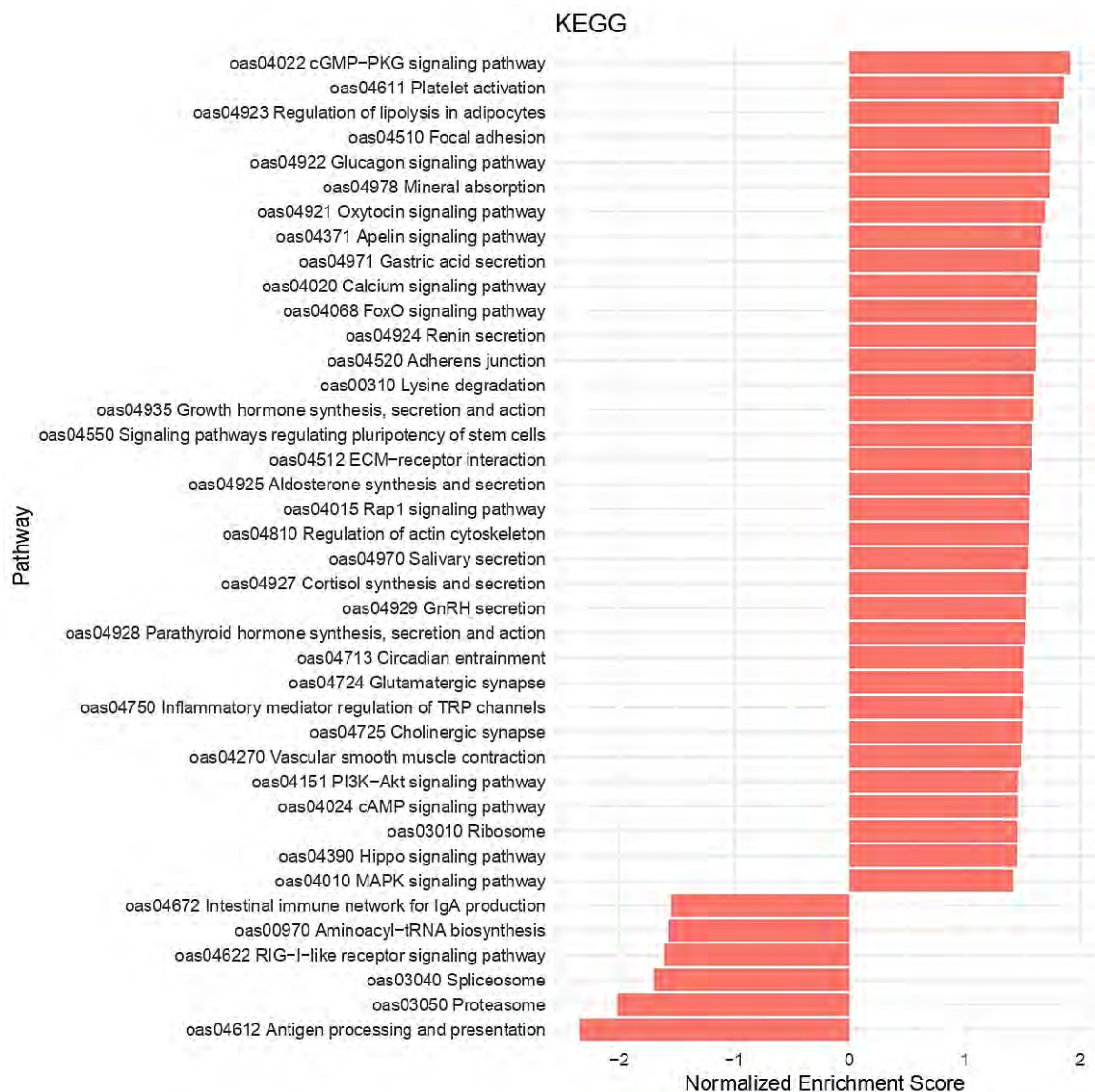


Figura 3. Resultados da anotação de genes diferencialmente expressos no fígado, classificados de acordo com as vias metabólicas KEGG. A ordenada mostra os nomes das vias metabólicas KEGG, e a abcissa mostra a proporção do número de genes anotados na via.

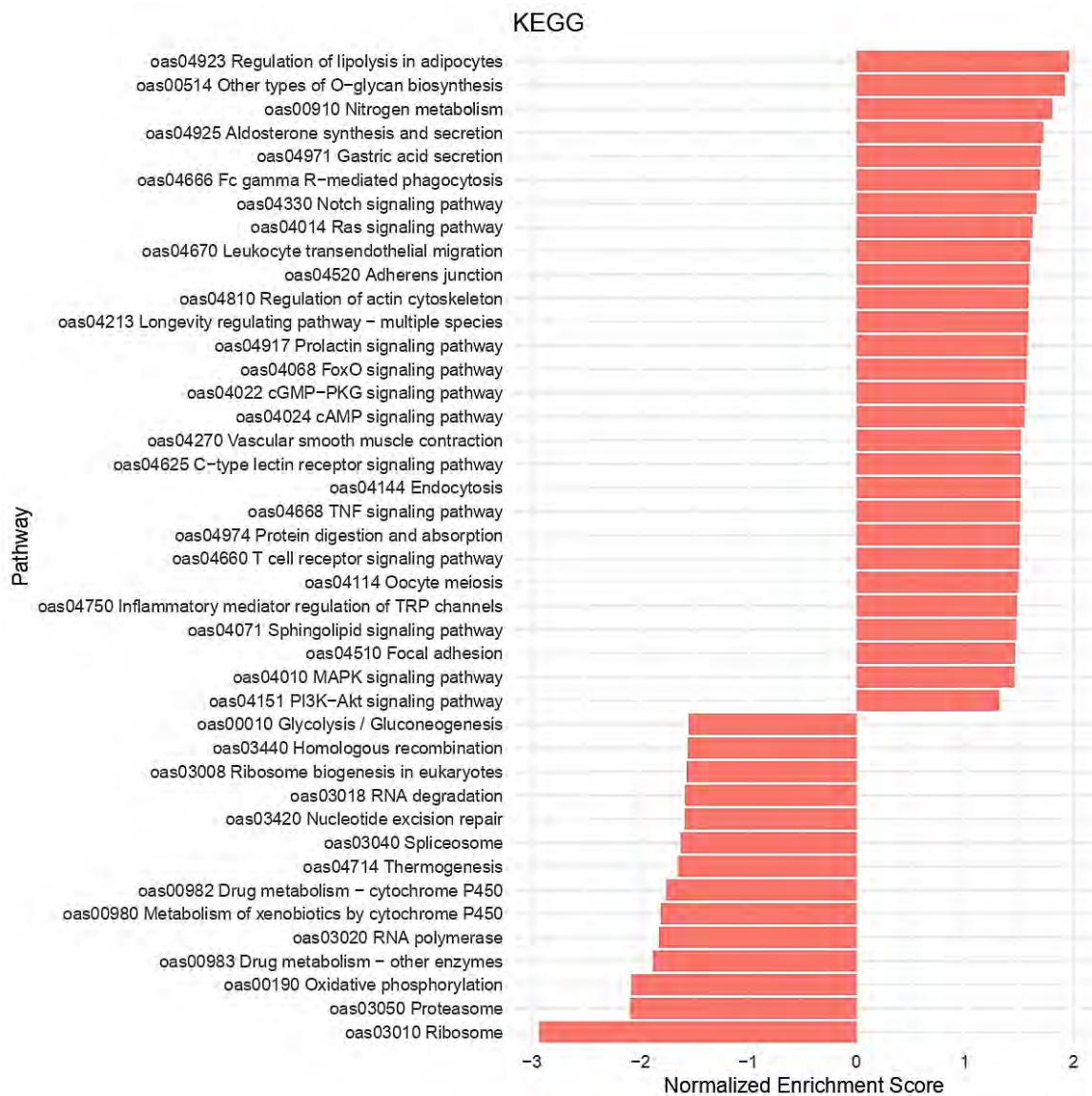


Figura 4. Resultados da anotação de genes diferencialmente expressos no músculo, classificados de acordo com as vias metabólicas KEGG. A ordenada mostra os nomes das vias metabólicas KEGG, e a abcissa mostra a proporção do número de genes anotados na via.

6. DISCUSSÃO

O cromo é um micromineral que atua nos tecidos insulino-dependentes, aumentando a sensibilidade à insulina, o que leva a uma maior captação de glicose, aumento na síntese proteica e redução da lipólise em situações de maior demanda energética (LASHKARI; HABIBIAN; JENSEN, 2018). Alguns estudos com suplementação com cromo em cordeiros sugerem uma melhoria no

crescimento (DOMÍNGUEZ-VARA et al., 2009) e conversão alimentar (SEIFALINASAB et al., 2022), porém, este resultado não foi observado em nenhuma das medidas de desempenho do presente trabalho. Resultados similares sobre os parâmetros de crescimento também foram encontrados em outros estudos em ovinos que receberam uma fonte de cromo orgânico na alimentação (ARVIZU et al., 2011; ZIYAD, 2013; MORENO-CAMARENA et al., 2015).

Essas discrepâncias na resposta do cromo sobre o desempenho, podem estar relacionadas a fatores como a fonte de cromo utilizada, tempo de suplementação com este micromineral, composição da dieta (GENTRY et al. 1999), manejo nutricional prévio, concentrações basais de cromo e idade dos animais (MORENO-CAMARENA et al., 2015). Outro fator consistente do cromo sobre a resposta produtiva está associado às condições de estresse do animal. Existem evidências em bezerros sob estresse de vacinação e transporte, que a suplementação com cromo na dieta aumentou o ganho de peso (CHANG; MOWAT 1992; MOONSIE-SHAGEER; MOWAT 1993) e em outros casos como o estresse térmico, apresenta benefícios no desempenho (SEIFALINASAB et al., 2022).

O uso de dietas com elevado teor de concentrado proporciona uma padronização no ganho de peso e uma uniformidade no acabamento das carcaças. No presente estudo, as dietas foram formuladas para atender as exigências nutricionais de cordeiros em fase de terminação, as quais apresentavam uma inclusão de 94% de concentrado e um mesmo teor de PB (17,39%) e NDT (81,29%). Em vista de que não houve diferenças no CMS em todos os tratamentos, é provável que uma ingestão similar de energia atendesse as necessidades destes animais para acabamento e outras características de carcaça. Portanto, isto pode explicar a ausência de influência da suplementação com cromo na maioria das características de carcaça avaliadas. Estudos com suplementação com cromo apresentam resultados variáveis sobre as características de carcaça em ruminantes.

Apesar de não terem sido observadas diferenças no rendimento e outras características de carcaça no presente trabalho, alguns estudos relataram que a suplementação com cromo em cordeiros durante a terminação, apresenta uma

influência sobre o rendimento de carcaça devido a um aumento na musculosidade, que foi avaliada pelo peso e área de olho de lombo do músculo *longissimus* (DOMÍNGUEZ-VARA et al., 2009; ESTRADA-ANGULO et al., 2013; SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2015). Um aumento na proporção de paleta e a tendência a incrementar o rendimento de costelas + vazio em animais suplementados com cromo pode estar relacionado ao crescimento alométrico destes músculos. Em bovinos, foi determinado que os músculos principalmente do abdômen e alguns da parte proximal do membro torácico apresentam um coeficiente maior em relação ao desenvolvimento total da carcaça (BERG; BUTTERFLIED, 1976). Adicionalmente, um aumento na captação de glicose devido a uma maior sensibilidade à insulina, conseqüentemente aumenta a síntese proteica no musculo (BERNHARD et al., 2012). Isto, em músculos com um coeficiente de crescimento maior pode justificar o aumento no rendimento da paleta e a tendência de maior proporção de costelas + vazio em cordeiros suplementados com cromo.

No quesito qualidade de carne, resultados semelhantes ao presente estudo foram observados em carne suína quando os leitões em fase de terminação receberam cromo-metionina em doses de 0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg/kg MS (LI et al., 2013). Os autores indicaram que os valores de força de cisalhamento na carne aumentaram de forma linear com incremento na dose de cromo na dieta, o que atribuíram a uma redução no teor de gordura intramuscular. No entanto, no presente trabalho não foi observado diferenças no teor de lipídeos na carne. Nesse sentido, embora não foi reportado na literatura, é provável que o cromo ao aumentar a sensibilidade a insulina e conseqüentemente a síntese proteica, apresente um efeito sobre a atividade da calpastatina.

Esta proteína é um inibidor natural das calpainas no processo de transformação do músculo em carne e no amaciamento desta (THERKILDSEN; OKSBJERG, 2009). Enquanto, para o índice de vermelho (a^*), a suplementação com este micromineral teve um efeito quadrático, aumentando os valores de a^* até a dosificação de 0,6 mg/kg MS e posteriormente uma queda com um fornecimento de 0,9 mg/kg MS. Esse aumento na intensidade de vermelho na carne de animais tratados com cromo pode ser atribuído a dois fatores; uma

melhora na capacidade antioxidante e aumento na concentração do pigmento de mioglobina (LI et al., 2013; FRAZ et al., 2022).

A gordura e os ácidos graxos de cadeia longa contribuem para aspectos importantes da qualidade da carne e são fundamentais para os valores nutricionais e sensoriais (WEBB; O'NEILL, 2008). De acordo com Wood et al. (1999), a quantidade e o tipo de gordura na carne influenciam dois componentes organolépticos: a maciez e o sabor. É constatado que os ácidos graxos insaturados possuem uma importante função na determinação do sabor e aroma.

Contudo, o aumento destas proporções pode reduzir a estabilidade oxidativa dos lipídeos, favorecendo a deterioração da carne, por meio da peroxidação lipídica (WOOD et al., 2004). No entanto, a suplementação com cromo não alterou o perfil de ácidos graxos da carne independentemente da dose, o que não comprometeu o tempo de vida útil da carne. Com relação às diferenças na expressão gênica global dos tecidos hepáticos e muscular esquelético, a análise de enriquecimento funcional KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) identificou 40 vias metabólicas em fígado e 42 vias metabólicas em músculo esquelético afetadas pela alimentação com cromo nos cordeiros.

Dietas ricas em carboidratos podem induzir a um acúmulo excessivo de lipídeos nos hepatócitos, levando à formação do fígado gorduroso (LEBEAUPIN et al., 2018; ZHAO et al., 2020). Esta condição patológica ocorre quando há um desequilíbrio entre as taxas de síntese, mobilização de gotículas lipídicas e secreção de ácidos biliares (SEEBACHER et al., 2020). Finalmente, o acúmulo excessivo de lipídeos no fígado pode levar a distúrbios metabólicos, principalmente resistência à insulina (BALAKUMAR et al., 2016). As gotículas lipídicas são organelas compostas por um núcleo de lipídeos neutros que contêm ésteres de colesterol, triglicerídeos e uma camada de fosfolipídios circundantes, as quais estão envoltas por diferentes proteínas (DEEVSKA; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, 2017). Estas estruturas inicialmente foram caracterizadas em células adiposas e posteriormente em hepatócitos (DEEVSKA; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, 2017), e desempenham uma função importante no metabolismo energético e de armazenamento de lipídeos no tecido hepático (KRAHMER et al., 2013).

O cromo é considerado fundamental na alimentação em humanos e animais, já que este oligoelemento está envolvido em vários processos biológicos do organismo, dos quais a função mais conhecida está relacionada com o metabolismo dos carboidratos mediado pela insulina (OGNIK et al., 2021) e na prevenção do fígado gorduroso (CHEN et al., 2010). Isto foi evidenciado em alguns trabalhos em que o consumo de cromo ajudou a diminuir a deposição de gotículas de lipídeos nos hepatócitos (DONG et al., 2008; SREEJAYAN et al., 2008). Curiosamente, estudos com uso de cromo trivalente demonstraram que esta molécula aumenta a autofagia celular em epitélio tubular renal (LI et al., 2016; YANG et al., 2017). No presente estudo, a regulação positiva dos genes *GRID1*, *WWP1* e *SPNS3* (Tabela 8), e no enriquecimento funcional KEEG, a via de sinalização de receptores tipo RIG-I, processamento e apresentação de antígeno e o proteassoma em fígado de animais suplementados com Cr3,0 podem estar relacionados autofagia de lipídeos. Portanto, é provável que este seja o mecanismo mais efetivo para reduzir o acúmulo de lipídeos em hepatócitos e melhorar a sensibilidade à insulina quando os animais consomem dietas com elevadas quantidades de carboidratos como a que foi utilizada no presente estudo.

A autofagia é um mecanismo essencial que regula a degradação de componentes celulares, organelas danificadas ou em excesso, e proteínas com conformações incorretas ou de vida longa dentro dos lisossomos (YANG; KLIONSKY, 2010). Uma diminuição na atividade autofágica permite o acúmulo de grandes moléculas e organelas disfuncionais, como por exemplo mitocôndrias danificadas, que podem contribuir a um estresse oxidativo, e conseqüentemente ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como a resistência à insulina (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008; LIU et al., 2009).

No tecido hepático, a lipofagia que é uma forma de autofagia, é ativada para a regulação do conteúdo de lipídeos nos hepatócitos e para regular a homeostase energética (SINGH et al., 2009; ZHAO et al., 2020). No presente estudo, a regulação positiva da via do receptor tipo RIG-I no fígado de cordeiros pertencentes ao grupo Cr3,0 pode ser um mecanismo para reduzir o acúmulo de lipídeos no tecido hepático e prevenir a resistência à insulina (Figura 3). O papel desta via quando está ativa, é induzir a autofagia de gotículas de gordura

(lipofagia) para proteger o fígado da lipotoxicidade (FRIETZE et al., 2022). Adicionalmente, os receptores tipo RIG-I atuam como sensores imunológicos que ativam células da via de apresentação de antígenos (KATO; TAKAHASI; FUJITA, 2011).

Estudos em adipócitos indicaram que esta via pode ajudar à eliminação de lipídeos intracelulares que estão em excesso, através da atividade lissosômica (SCHIPPER et al., 2012; HUH et al., 2013; DUGAIL, 2014). Portanto, é provável que a regulação positiva da via de processamento e apresentação de antígeno no fígado dos cordeiros do grupo Cr3,0 também seja um mecanismo protetor dos hepatócitos ao acúmulo de lipídeos (Figura 3).

O proteassoma é um complexo enzimático localizado no citosol das células e é necessário para a degradação de proteínas, as quais são marcadas por ubiquitinas (DEMASI; SIMÕES; BONATTO, 2015). No presente estudo, a regulação positiva desta via no fígado dos animais do grupo Cr3,0 pode ter uma relação com a regulação positiva do gene *WWP1* (Tabela 8) que pode estar envolvido em processos autofágicos. A proteína ligase 1 da ubiquitina E3 codificada pelo *WWP1*, medeia a degradação de proteínas através do sistema ubiquitina-proteassoma em vários tecidos (CIECHANOVER et al., 2005; HU et al., 2021; LIN et al., 2022). Embora esta via seja importante para a degradação de proteínas, também pode ser útil na eliminação do excesso de lipídeos, pois está estabelecido que na superfície das gotículas lipídicas existe uma diversidade de proteínas como as perilipinas (KIMMEL et al., 2010; DUGAL, 2014), as quais podem ser alvo das ubiquitinas (XU et al., 2006).

O gene *GRID1* também conhecido como *GLUD1* codifica o receptor de glutamato delta-1, que em estado supermetilado pode induzir ao desenvolvimento de fígado gorduroso (GUHA et al., 2022). Em caprinos foi observado que a metilação de *GRID1* pode induzir a uma regulação negativa deste gene (YANG et al., 2018). No entanto, em fígado de cordeiros alimentados com Cr3,0 do presente trabalho, o *GRID1* foi regulado positivamente e é provável que este gene seja ativado em processos de autofagia. Porém, são escassas as pesquisas que relacionem o processo de autofagia com a regulação do gene *GRID1* (ZHU et al., 2020).

Nas gotículas lipídicas, os esfingolipídios são outra classe de lipídeos que se acumulam em paralelo aos triglicerídeos em fígado e outros tecidos como o músculo, e um excesso destas moléculas é observado em animais e humanos com distúrbios metabólicos (CHAURASIA; SUMMERS, 2015; IQBAL et al., 2017). É relatado que dos esfingolipídios, a ceramida quando é acumulada em excesso pode levar a uma redução na sensibilidade à insulina, interrupção das funções metabólicas em mitocôndrias e células β pancreáticas, levando à morte celular em vários tecidos (PARK et al., 2008; BHARATH et al., 2015). O gene *SPNS3* pertence a uma família composta por três transportadores lipídicos, dos quais o *SPNS1* é o mais conhecido (ZHU et al., 2018). O *SPNS1* é um dos principais transportadores acoplado às membranas dos lisossomos, cuja função é remover do lúmen lisossômico os resíduos de degradação como os esfingolipídios, e sua participação na autofagia foi associada a estágios tardios deste mecanismo (ZHU et al., 2018). Apesar de não ter sido observada a expressão de *SPNS1* neste estudo, houve uma regulação positiva de *SPNS3* no fígado dos animais do grupo Cr3,0, e é possível que sua função seja similar.

Os ácidos biliares contribuem na absorção intestinal de lipídeos e vitaminas lipossolúveis para ser metabolizados no fígado (CHIANG, 2009; RUSSELL, 2009). Adicionalmente, estas moléculas são sinalizadoras para a ativação de receptores nucleares e de membrana nos hepatócitos que regulam o metabolismo dos triglicerídeos, colesterol, glicose e o gasto energético (CHIANG, 2013; SEEBACHER et al., 2020). Pesquisas indicam que os ácidos biliares estimulam a regulação dos transportadores de membrana codificados por *TMEM16A* (conhecido como *anoctamin 1* ou *ANO1*) nos colangiócitos (células dos ductos biliares no fígado) (LI et al., 2018).

Esses transportadores são responsáveis por regular o fluxo de cloreto dos colangiócitos e estimular a secreção biliar (DUTTA et al., 2008; LI et al., 2018). Embora o *TMEM16A/ANO1* seja o mais predominante nos transportadores de membrana, foi demonstrado que o gene *TMEM16B/ANO2* é um paralogo próximo, o qual pertence a um grupo de canais de cloreto ativados por cálcio (SCUDIARI et al., 2012). Neste estudo observou-se que a suplementação com Cr3,0 teve um efeito regulatório positivo do gene

TMEM16B/ANO2. Embora a atividade dos canais de cloreto regulada por *TMEM16A/ANO1* seja a mais conhecida, é provável que haja uma contribuição de outras isoformas de *TMEM16* (LI et al., 2018), como por exemplo *TMEM16B/ANO2*. Curiosamente, a regulação positiva de *TMEM16B/ANO2* nos cordeiros do grupo Cr3,0 pode ser uma forma de depurar lipídeos dos hepatócitos, uma vez que a formação de ácidos biliares a partir do colesterol é a principal rota para a eliminação de lipídeos no tecido hepático (CHIANG; FERRELL, 2018). Por outro lado, também identificou-se dentro dos DEGs o *TMEM16D/ANO4* com regulação negativa nos cordeiros do grupo Cr3,0 (Tabela 8). Este gene, com função pouco conhecida, foi identificado em um sequenciamento de exoma humano, indicando que a expressão desta variante está relacionada com a desregulação da glicose (AKBARI et al., 2021). Isto pode sugerir que a suplementação com cromo ajuda a regular o metabolismo da glicose em animais alimentados dietas com elevada proporção de concentrado.

Pesquisas com uso de cromo na dieta têm evidenciado efeitos positivos deste oligoelemento na melhoria da sensibilidade à insulina em tecidos insulín-dependentes (HUA et al., 2012). Adicionalmente, uma sinalização competente de insulina no fígado é importante para manter as funções fisiológicas das células hepáticas e permitir um funcionamento normal das vias que controlam o ciclo celular e de diferenciação, que leva à regeneração deste tecido (STARZL; PORTER; PUTNAM, 1976; MICHAEL et al., 2000). Assim, foi evidenciado no presente trabalho que o fornecimento de Cr3,0 na alimentação dos cordeiros teve uma regulação positiva dos genes *TUBA1A*, *NSA2* e *ZNF347* que podem estar relacionados com processos de regeneração do tecido hepático. A expressão de *TUBA1B* está associada ao desenvolvimento de microtúbulos que fazem parte do citoesqueleto das células (CHEN et al., 2008), e são importantes na regulação da proliferação celular (LU et al., 2013). Adicionalmente, em culturas de hepatócitos foi identificado o gene *TUBA1A* como um dos principais moduladores da gliconeogênese (WEX et al., 2018). Apesar de o *TUBA1A* não estar dentro dos DEGs do presente estudo, é provável que a regulação positiva de *TUBA1B* no fígado tenha uma função similar sobre a gliconeogênese, já que ambos genes compartilham 99,5% de homologia (BUSCAGLIA et al., 2021).

Estudos em culturas de células HeLa e outras linhagens celulares evidenciaram que a superexpressão de *NSA2* (também chamado *TINP1*) induziu a proliferação celular através da inibição dos genes *p21* e *p53* (LI et al., 2013). Além disso, a expressão de *NSA2* também foi relacionada com a biogênese de ribossomos (XING et al., 2018). Por outro lado, a expressão positiva de *ZNF347* no fígado dos cordeiros do grupo Cr3,0 não foi encontrada em outros trabalhos abordando este tecido. No entanto, a regulação positiva desse gene em glândula salivar foi associada à via ribossômica (MI et al., 2020). Embora alguns estudos relacionem a biogênese ribossomal com a contribuição para processos cancerígenos (HEIN et al., 2013; QUIN et al., 2014), a regulação da síntese de ribossomos em processos fisiológicos é um sensor importante para as respostas às mudanças nutricionais que possam afetar a função do fígado (PELAVA; SCHNEIDER; WATKINS, 2016).

Anteriormente, foi destacada a importância dos genes regulatórios da proliferação celular no tecido hepático. No entanto, foi uma surpresa a resposta negativa do tratamento Cr3,0 no presente estudo sobre a regulação dos genes *EP4* e *CCNB1* no fígado. Mas, alguns estudos indicam que em situações de autofagia, um estímulo positivo sobre *EP4* induz a ativação de células tronco hematopoiéticas bem como, a diferenciação em miofibroblastos que são indicativos de fibrose hepática (CAO et al., 2022).

Enquanto ao *CCNB1*, sua função foi destacada como um dos genes reguladores do ciclo celular em processos de regeneração hepática posterior a alguma lesão (COLAK et al., 2020). No entanto, a expressão de *CCNB1* em hepatócitos foi associada a acúmulo anormal de lipídeos e consequente esteatose hepática (ABDULHAMEED et al., 2019). Portanto, é provável que a regulação positiva de genes que atuam na proliferação celular e a biogênese ribossômica no fígado dos cordeiros do grupo Cr3,0 seja um mecanismo de reposição de organelas eliminadas por processos autofágicos, relatados anteriormente. Por outro lado, a regulação negativa de alguns genes relacionados com proliferação celular em cordeiros deste mesmo tratamento pode sugerir um desenvolvimento adequado da regeneração celular sem atingir um crescimento exacerbado que leve a processos cancerígenos no fígado.

O *Keratin 18 (KRT18)* foi identificado em células hepáticas, cujas proteínas codificadas por este gene cumprem uma função citoprotetora não mecânica, servindo como alvos para a ação de quinases ativadas de forma anômala (KU; OMARY, 2006). Além disso, as proteínas codificadas por este gene estão envolvidas na modulação de vias de sinalização celular como a apoptose e também na proteção de mitocôndrias (KU et al., 2005; 2007). É provável que no presente estudo, a regulação positiva de *KRT18* no fígado dos cordeiros do grupo Cr3,0 seja uma resposta à ação antioxidante deste oligoelemento. Alguns ensaios com humanos e animais, indicaram que a suplementação com cromo pode atenuar as citocinas pro-inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo (JAIN et al., 2012; SUSHKO; ISKRA; PONKALO, 2019). Isto devido a uma melhoria no status redox através do aumento e atividade das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (SUNDARAM; SINGHAL; SANDHIR, 2012; SUSHKO; ISKRA; PONKALO, 2019).

Por outro lado, é provável que uma ação antioxidante do cromo explique a regulação negativa de *TOMM20* e *NF2* (ou *Merlin*) nos cordeiros suplementados neste estudo. A literatura reporta que *TOMM20* é um gene responsável por codificar proteínas da membrana externa das mitocôndrias que atuam no reconhecimento e classificação de proteínas relacionadas com a biogênese mitocondrial. Porém, a expressão deste gene também foi relacionada com danificação de mitocôndrias (OTT et al., 2007; SARNYAI et al., 2020). Em relação ao *NF2*, um ensaio com uma linhagem de células β de insulinoma pancreático indicou que a inibição deste gene livra essas células do apoptose estimulada por alta concentração de glicose (YUAN et al., 2016).

O cromo é um oligoelemento essencial para a regulação da insulina e para a manutenção normal do metabolismo dos carboidratos e lipídeos (ANDERSON, 1998). A homeostase da glicose sanguínea é um processo que envolve a secreção e a responsividade à insulina nos tecidos dependentes deste hormônio (CHEN et al., 2009). Assim, o músculo esquelético é um dos principais alvos para a ação insulínica, pois este tecido é responsável por depurar mais de 75% da glicose circulante (STUMP et al., 2006). Por outro lado, em ruminantes, níveis de glicose sanguíneos dentro dos parâmetros homeostáticos estão

interrelacionados com a deposição corporal de proteína e gordura (OHH; LEE, 2005). Portanto, uma regulação da via da glicose através da alimentação com cromo pode ter um grande impacto na produção e qualidade da carne ovina.

A nível molecular, foi relatado que a suplementação com cromo contribui na modulação da síntese de RNA e regula a tradução de proteínas no tecido muscular esquelético (ZHANG et al., 2011). Nas células, a concentração de RNA é um indicador que determina o grau de síntese proteica (CLEMMESSEN, 1994), sendo o RNA ribossômico o maior contribuinte deste processo (MILLWARD et al., 1974). No presente estudo, o músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0, apresentou uma regulação positiva dos genes *RPL35A*, *RPL39* e *RPS25* e no enriquecimento funcional KEEG, as vias do ribossomo e a biogênese de ribossomos foram afetadas. Em humanos, a regulação positiva do gene *RPL35A* que codifica proteínas ribossômicas, foi correlacionada com processos de hipertrofia da massa muscular (SEABORNE et al., 2018). Em relação ao gene *RPL39* presente em ribossomos, o mesmo foi destacado como um biomarcador para crescimento em animais de produção, atuando na regulação do ciclo celular e na síntese de proteínas (MOHAMMADABADI et al., 2021). Apesar de ter havido uma regulação positiva desses genes relacionados com a síntese proteica, o peso dos cordeiros do grupo Cr3,0 não foi afetado. No entanto, um aumento no RNA ribossômico e na concentração total de RNA não necessariamente são parâmetros que determinam um incremento significativo na deposição de proteína nos tecidos (MILLWARD et al., 1974). Nesse sentido, uma abundância de RNA pode ser um indicador de disponibilidade de energia ou substrato para a síntese proteica ou concentração de metabolitos e hormônios (ZHANG et al., 2011).

A maciez é um atributo com grande impacto na palatabilidade da carne e que influencia na qualidade do produto (PFLANZER; FELÍCIO, 2009). Anteriormente, no presente estudo, reportou-se um aumento nos valores de força de cisalhamento em resposta ao incremento na dosificação de cromo, o qual se correlaciona negativamente com a maciez da carne. Fatores como, o tipo de fibra muscular, proteólise muscular, e quantidade e solubilidade de colágeno podem afetar a maciez da carne (STARKEY et al., 2016). Embora no presente estudo não analisou-se o teor e solubilidade do colágeno na carne, curiosamente

foi observada uma regulação positiva do gene *RPS25* para os cordeiros do grupo Cr3,0, que além de estar relacionado com a síntese de proteínas ribossômicas, também está associado a modulação do colágeno. Um trabalho com suínos indicou que as proteínas codificadas por *RPS25* regulam a síntese e o remodelamento do colágeno (REYER et al., 2017), o que pode levar a um aumento na deposição de matriz extracelular (COELHO et al., 2022) e contribuir à produção de carnes com maiores valores de força de cisalhamento (PURSLOW, 2014).

Neste estudo, a regulação positiva do gene *GCNT1* no músculo dos cordeiros do grupo Cr3,0 pode estar relacionada também com a maior força de cisalhamento observada na carne. Um estudo com culturas de mioblastos C2C12 de roedores demonstrou que a superregulação de *GCNT1* está implicada na biossíntese de o-glicano, queratano sulfato e lumicanos que contribuem para os arranjos de miotubos no tecido muscular (GRASSOT et al., 2014). Por outro lado, a biossíntese de o-glicano pode contribuir à formação e acúmulo de reticulações de colágeno na matriz extracelular, o que pode levar a um aumento na dureza na carne (TIZIOTO et al., 2013).

A deposição de gordura intramuscular é uma característica desejada em alguns nichos de mercado da carne bovina (HUNT et al., 2014) e ovina (PRZYBYLAK et al., 2016). De forma geral, o desenvolvimento do tecido adiposo intramuscular ocorre de maneira mais intensa durante a vida fetal e neonatal, fornecendo os locais para deposição de gordura mediante a lipogênese durante fase de engorda do animal (DU et al., 2013). A deposição de gordura intramuscular depende de um balanço entre a captação e síntese de ácidos graxos, e a degradação através da β -oxidação (TEIXEIRA et al., 2017), sendo estes processos modulados pela regulação gênica (DE JAGER et al., 2013). No presente estudo, a expressão de *RRM2* e *HNRNPA1*, e uma regulação negativa de *COX6C*, *TMED5* e *OCD1* no músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0 pode estar relacionada com o metabolismo lipídico desse tecido. Um estudo com culturas de pré-adipócitos derivados de gordura de frangos indicou que a superexpressão de *RRM2* participa em processos de diferenciação adipogênica, assim como, também pode atuar na deposição de gordura intramuscular especificamente (ZHANG et al., 2019).

O citocromo c oxidase é uma enzima mitocondrial composta de várias subunidades que atua na cadeia respiratória para produção de energia, sendo a subunidade VIc codificada pelo gene COX6C, uma das mais importantes (WANG et al., 2022). No entanto, é relatado que em ambientes abundantes de glicose no citosol das células, a expressão de COX6C é amplamente inibida (FONTANESI et al., 2006). Portanto, é provável que a regulação negativa de COX6C em músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0 seja devido a maior utilização de glicose como consequência de maior sensibilidade à insulina, reduzindo a degradação de ácidos graxos para produção de energia. Adicionalmente, foi observada uma regulação negativa de TMED5 nos cordeiros do grupo Cr3,0. Curiosamente, estudos com hepatócitos e adipócitos 3L3-L1 identificaram o TMED5 como um gene alvo regulado positivamente por PPAR α e PPAR γ , respectivamente (DEFOUR; KERSTEN, 2021). Os PPARs são fatores de transcrição com múltiplas funções, incluindo o balanço energético, diferenciação celular e metabolismo lipídico (GROSS et al., 2017). A literatura reporta que a isoforma PPAR α é mais abundante em fibras musculares de ruminantes (BIONAZ et al., 2013) e sua ativação pode levar a processos de oxidação de lipídeos (CAMPBELL et al., 2003). Embora o PPAR α não tenha sido identificado como um DEG no presente estudo, é provável que TMED5 seja alvo desse fator de transcrição, e sua regulação negativa no músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0 seja um mecanismo de redução da oxidação de lipídeos para direcionar mais glicose para produção de energia em fibras musculares.

A ornitina descarboxilase codificada pelo gene ODC1 é uma enzima importante na síntese de poliaminas, as quais regulam processos biológicos como, o crescimento e a apoptose celular (HAUN et al., 2018). Por outro lado, no metabolismo lipídico, foi sugerido que as poliaminas inibem a ação da lipoproteína lipase que é importante para o transporte de ácidos graxos dentro das células (KLIMOV et al., 1985). Neste sentido, a regulação negativa de ODC1 em músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0 pode estar relacionada a um aumento no transporte de ácidos graxos para dentro dos adipócitos intramusculares.

As ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas codificadas pelo gene HNRNPA1, são um grande grupo de proteínas nucleares que se ligam ao RNA

celular e desempenham vários processos biológicos, incluindo, regulação de várias etapas do metabolismo do RNA, função mitocondrial, e o metabolismo de lipídeos e glicose (GUI et al., 2020; ZHAO et al., 2020). Neste estudo, houve uma regulação positiva de HNRNPA1 no músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0. Curiosamente, a expressão de HNRNPA1 no tecido muscular regula vários genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, entre estes o CPT1 (GUI et al., 2020). A carnitina palmitoiltransferase 1 codificada pelo CPT1 é uma enzima da membrana externa das mitocôndrias que regula o processo inicial da β -oxidação de ácidos graxos (BROWN et al., 1997). Tal enzima é abundante em fibras musculares, mas também pode ser encontrada em concentrações menores nas células adiposas (ESSER et al., 1996). Apesar de ter havido uma regulação de genes relacionados com o metabolismo lipídico no músculo esquelético dos cordeiros do grupo Cr3,0, não foi observada diferença na deposição de gordura na carne comparado com os animais do tratamento controle. É provável que o estímulo do cromo sobre a regulação de genes relacionados com a deposição de gordura e outros com β -oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético possa resultar em um maior *turnover* lipídico, evitando um aumento na deposição de gordura (TEIXEIRA et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

Não houve influência do cromo (quelato – Cr+3 + glicina, Orgolabs®) sob nenhuma das doses administradas para nenhuma das características de desempenho avaliadas, bem como para a maioria das características da carcaça ou parâmetros de morfologia ruminal dos cordeiros, bem como o perfil de ácidos graxos da carne. A suplementação com cromo promoveu um incremento no rendimento da paleta e dos cortes de costela e vazio, no entanto, afetou negativamente as características de qualidade da carne no tocante à maciez e à cor. Observou-se um perfil diferencial de transcritos entre os grupos no fígado e no músculo dos cordeiros, em resposta à suplementação com cromo.

A suplementação dietética com cromo trabalhou efetivamente a nível molecular na síntese de RNA, deposição de proteínas, hipertrofia muscular e síntese de colágeno, o que explica também os maiores valores de força de cisalhamento. Ademais, fatores de transcrição moduladores de funções como

balanço energético também foram positivamente regulados nos animais suplementados, indicando menor deposição de tecido adiposo intramuscular. O cromo afetou positivamente o metabolismo do RNA, função mitocondrial, e o metabolismo de lipídeos e glicose.

REFERÊNCIAS

ABDULHAMEED, Mohamed Diwan M.; PANNALA, Venkat R.; WALLQVIST, Anders. Mining public toxicogenomic data reveals insights and challenges in delineating liver steatosis adverse outcome pathways. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 1007, 2019.

ABRAHAM, A. S., BROOKS, B. A. & EYLATH, U. Chromium and cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.35, p.203-207, 1991.

ACTON, J. C., DAWSON, P. L. Impact of proteins on food colour. In: Proteins on food processing. **Woodhead Publish: Cambridge**, 2004.

ADAMS, J. Transcriptome: Connecting the Genome to Gene Function. **Nature**, v. 1, n. 1, p. 195, 2008.

AKBARI, Parsa et al. Sequencing of 640,000 exomes identifies GPR75 variants associated with protection from obesity. **Science**, v. 373, n. 6550, p. eabf8683, 2021.

AMSA - AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation and Instrumental Tenderness Measurements of Fresh Meat. In: **American Meat Science Association**, Chicago - IL. Anais... Chicago - IL: 1995.

ANDERS, S., HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biol**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010.

ANDERSON, R. A. Chromium in Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Vol. 1, 5th (Ed. W. Mertz), **Academic Press Inc. New York**. pp. 225-244, 1987.

ANDERSON, R. A.; BRYDEN, N. A.; POLANSKY, M. M. Dietary chromium intake. **Biological Trace Element Research**, v. 32, n. 1-3, p. 117-121, 1992.

ANDERSON, R. A.; KOZLOVSKY, A. S. Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 1177-1183, 1985.

ANDERSON, R.A. Chromium in tissues and fluids. In: MERTZ, W. Trace elements in human and animal nutrition. San Diego: Academic Press, 1987. p. 225-40.

ANDERSON, R.A. et al. Effects of supplemental chromium on patients with symptoms of reactive hypoglycemia. **Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 351-355, 1987.

ANDERSON, Richard A. Chromium, glucose intolerance and diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 17, n. 6, p. 548-555, 1998.

AOAC. Association OF Official Agricultural Chemistis. In: Official methods of analysis of AOAC International, 16th edition, Arlington. Anais... Arlington: 1995.

ARTHINGTON, J. D. et al. Supplemental Dietary Chromium Does Not Influence ACTH, Cortisol, or Immune Responses in Young Calves Inoculated with Bovine Herpesvirus-1. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 1, p. 217–223, 1997.

ARVIZU, R. R. et al. Effects of genotype, level of supplementation, and organic chromium on growth performance, carcass, and meat traits grazing lambs. **Meat Science**, v. 88, n. 3, p. 404–408, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.018>>.

BAGCHI, D. et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 5–22, 2002.

BAILEY, C. H. Improved meta-analytic methods show no effect of chromium supplements on fasting glucose. **Biological Trace Element Research**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 2014.

BALAKUMAR, M. et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 93-104, 2016.

BENDALL, J. R. Post mortem changes in muscle. In: G. H. Bourne (ed.) Structure and Function of Muscle. P. 243–309. Academic Press, New York, 1973.

BENJAMINI, Y., HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **J Roy Statist Soc Ser B (Methodological)**, v. 57, p. 289-300, 1995.

BERNER, T. O.; MURPHY, M. M.; SLESINSKI, R. Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 6, p. 1029–1042, 2004.

BERNHARD, B. C. et al. Chromium supplementation alters both glucose and lipid metabolism in feedlot. **American society of animal Science**, v. 202, p. 4857–4865, 2012.

- BHARATH, Leena P. et al. Ceramide-initiated protein phosphatase 2A activation contributes to arterial dysfunction in vivo. **Diabetes**, v. 64, n. 11, p. 3914-3926, 2015.
- BIGHAM, M. L.; MCMANUS, W. R. Whole wheat grain feeding of lambs. Effects of roughage and wheat grain mixtures. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 26, p. 1053–1062, 1975.
- BIONAZ, Massimo et al. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013, 2013.
- BLIGH E.G; DYER W.J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology Issued by The National Research Council Of Canada A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification1. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. Disponível em: <www.nrcresearchpress.com>.
- BOHRER, B. M. et al. Effects of supplementing zinc or chromium to finishing steers fed ractopamine hydrochloride on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 2, p. 771–779, 2016.
- BONILHA, S. F. M. et al. Características de carcaça de bovinos nelore, caracu, guzerá e gir selecionados para peso pós-desmame 1. **Boletim da Indústria Animal**, v. 69, p. 63–69, 2012.
- BRATAKOS, M. S.; LAZOS, E. S.; BRATAKOS, S. M. Chromium content of selected Greek foods. **Science of the Total Environment**, v. 290, n. 1–3, p. 47–58, 2002.
- BROOKS, M. A. et al. Chromium propionate in broilers: Effect on insulin sensitivity. **Poultry Science**, v. 95, n. 5, p. 1096–1104, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew018>>.
- BROWN, Nicholas F. et al. Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation: inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. **Biochemical Journal**, v. 327, n. 1, p. 225-231, 1997.
- BRUCE, H. L., STARK, J. L., & BEILKEN, S. L. The effects of finishing diet and postmortem ageing on the eating quality of the *M. longissimus thoracis* of electrically stimulated Brahman steer carcasses. **Meat Science**, v.67(2), p.261–268, 2004.
- BRYAN, M. A.; SOCHA, M. T.; TOMLINSON, D. J. Supplementing intensively grazed late-gestation and early-lactation dairy cattle with chromium. **Journal of**

Dairy Science, v. 87, n. 12, p. 4269–4277, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73571-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73571-7)>.

BUCCITELLI, C.; SELBACH, M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. **Nature Reviews Genetics**, v. 21, n. 10, p. 630–644, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>>.

BUSCAGLIA, Georgia et al. Bridging the Gap: The Importance of TUBA1A α -Tubulin in Forming Midline Commissures. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021.

CALLAHAN B.J., et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v.13, p. 581–583, 2015.

CAMPBELL, S. E. et al. 17 β -estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and lipid oxidative genes in skeletal muscle. **Journal of molecular endocrinology**, v. 31, n. 1, p. 37-45, 2003.

CAO, Ying et al. Macrophages evoke autophagy of hepatic stellate cells to promote liver fibrosis in NAFLD mice via the PGE2/EP4 pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 6, p. 1-19, 2022.

CAZES, R.L. Cromo orgânico. A Hora Veterinária, n.19, 1999.

CHAURASIA, Bhagirath; SUMMERS, Scott A. Ceramides–lipotoxic inducers of metabolic disorders. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 10, p. 538-550, 2015.

CHEN, N. S. C.; TSAI, A.; DYER, I. A. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. **Journal of Nutrition**, v. 103, n. 8, p. 1182–1186, 1973.

CHEN, Tzu-Hsuan et al. Moscatilin induces apoptosis in human colorectal cancer cells: a crucial role of c-Jun NH₂-terminal protein kinase activation caused by tubulin depolymerization and DNA damage. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4250-4258, 2008.

CHEN, Wen-Ying et al. Chromium attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in KK/HIJ mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 397, n. 3, p. 459-464, 2010.

CHIANG, John YL. Bile acid metabolism and signaling. **Comprehensive physiology**, v. 3, n. 3, p. 1191, 2013.

CHIANG, John YL. Bile acids: regulation of synthesis: thematic review series: bile acids. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 10, p. 1955-1966, 2009.

- CHIANG, John YL; FERRELL, Jessica M. Bile acid metabolism in liver pathobiology. **Gene expression**, v. 18, n. 2, p. 71, 2018.
- CIE. Recommendations on uniform color spaces - color equations, psychometric color terms. In: Commission Internationale de l'éclairage (CIE), Paris (France). **Anais...** Paris (France): 1986.
- CIECHANOVER, Aaron. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 79-87, 2005.
- CLEMMESSEN, Catriona. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. **Marine Biology**, v. 118, n. 3, p. 377-382, 1994.
- COELHO, Diogo et al. Integrated Omics analysis of pig muscle metabolism under the effects of dietary *Chlorella vulgaris* and exogenous enzymes. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2022.
- COLAK, Dilek et al. RNA-Seq transcriptome profiling in three liver regeneration models in rats: comparative analysis of partial hepatectomy, ALLPS, and PVL. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.
- CONDÉ, M. S. et al. Minerais quelatados na nutrição de suínos. **REVISTA ELETRÔNICA NUTRITIME**, v. 11, p. 3547–3565, 2014.
- COSTA E SILVA, L. F. et al. Macrominerals and trace element requirements for beef cattle. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–20, 2015.
- COSTA E SILVA, L. F. et al. Mineral requirements for beef cattle. Nutritional requirements, diet formulation and performance prediction of Zebu and Crossbred cattle, p. 213–250, 2016. Disponível em: <<http://www.brcorte.com.br/en/>>.
- DALÓLIO, F. S. et al. Dietary chromium supplementation for heat-stressed broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 74, n. 1, p. 101–116, 2017.
- DAMON, M. et al. Comparison of muscle transcriptome between pigs with divergent meat quality phenotypes identifies genes related to muscle metabolism and structure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- DE JAGER, N. et al. Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1112-1128, 2013.
- DEBRAS, E., GRIZARD, J., AINA, E., TESSERAUD, C., CHAMPREDON, C., ARNAL, M. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry periods in goats. **American Journal of Physiology**, v.56 p.E295- E302, 1989.

DEEVSKA, Gergana M.; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, Mariana N. The expanding role of sphingolipids in lipid droplet biogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1155-1165, 2017.

DEFOUR, Merel; KERSTEN, Sander. Probing the role of the PPAR α regulated gene TMED5. **Can we ENERGISE our metabolic health?**, p. 55., 2021.

DEMASI, Marilene; SIMÕES, Vanessa; BONATTO, Diego. Cross-talk between redox regulation and the ubiquitin–proteasome system in mammalian cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1594-1606, 2015.

DIKEMAN, M. E. Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality. **Meat Science**, v. 77, n. 1 SPEC. ISS., p. 121–135, 2007.

DOMÍNGUEZ-VARA, I. A. et al. Effects of feeding selenium-yeast and chromium-yeast to finishing lambs on growth, carcass characteristics, and blood hormones and metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, n. 1–2, p. 42–49, 2009.

DONG, Feng et al. Chromium (D-phenylalanine) 3 supplementation alters glucose disposal, insulin signaling, and glucose transporter-4 membrane translocation in insulin-resistant mice. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 10, p. 1846-1851, 2008.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, v. 34, n. 2, p. 217- 234, 1993.

DU, Meat et al. Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1419-1427, 2013.

DUGAIL, Isabelle. Lysosome/lipid droplet interplay in metabolic diseases. **Biochimie**, v. 96, p. 102-105, 2014.

DUNSHEA, F. R., D'SOUZA, D. N., CHANNON, H. A. Metabolic modifiers as performance-enhancing technologies for livestock production. **Animal Frontiers**, v.6, p.6-14, 2016.

DUTTA, Amal K. et al. Extracellular nucleotides stimulate Cl⁻ currents in biliary epithelia through receptor-mediated IP₃ and Ca²⁺ release. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 5, p. G1004-G1015, 2008.

ESSER, Victoria et al. Expression of a cDNA Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Heart Identifies the Product as the Muscle Isoform of Carnitine

Palmitoyltransferase I (M-CPT I): M-CPT I IS THE PREDOMINANT CPT I ISOFORM EXPRESSED IN BOTH WHITE (EPIDIDYMAL) AND BROWN ADIPOCYTES (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 12, p. 6972-6977, 1996.

ESTRADA-ANGULO, A. et al. Effects of feeding different levels of chromium-enriched live yeast in hairy lambs fed a corn-based diet: Effects on growth performance, dietary energetics, carcass traits and visceral organ mass. **Animal Production Science**, v. 53, n. 4, p. 308–315, 2013.

FELIG, P. Amino acid metabolism in man. *Biochemistry - Annual Review of Biochemistry*. v.44, p.933-955, 1975.

FENG, W. et al. Chromium malate alleviates high-glucose and insulin resistance in L6 skeletal muscle cells by regulating glucose uptake and insulin sensitivity signaling pathways. **BioMetals**, v. 31, n. 5, p. 891–908, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0132-4>>.

FISHER, J. A. *The Chromium Program*. Harpercollins; 1st edition, 311p., 1990.

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

FONTANESI, Flavia et al. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 6, p. C1129-C1147, 2006.

FORBES, C. D. et al. Growth and metabolic characteristics of Suffolk and Gulf Coast Native yearling ewes supplemented with chromium tripicolinate. **Small Ruminant Research**, v. 28, n. 2, p. 149–160, 1998.

FORBES, R.; ERDMAN, J. Bioavailability of Trace Mineral elements. **Ann Rev Nutr** 3:213–231., p. 198–209, 1983. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.nu.03.070183.001241>>.

FOX, J. R. *The pigments of meat. The Science of meat products*. Food & Nutrition Press: Westport, 1987.

FRANCIS, G. A. et al. Nuclear Receptors and the Control of Metabolism. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 261–311, 2003.

FRENCH, P., O'RIORDAN, E. G., MONAHAN, F. J., CAFFREY, P. J., VIDAL, M., MOONEY, M. T., TROY, D. J., & MOLONEY, A. P. Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. **Meat Science**, v.56, p.173–180, 2000.

FRIETZE, Karla K. et al. Lipotoxicity reduces DDX58/Rig-1 expression and activity leading to impaired autophagy and cell death. **Autophagy**, v. 18, n. 1, p. 142-160, 2022.

GAEBEL, G. et al. the effect of diet, intraruminal ph and osmolarity on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 72, n. 4, p. 501–511, 1987.

GALLO, S. B. et al. Influence of feeding regime and finishing system on lamb muscle fiber and meat quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2204–2210, 2009.

GANN, A. Jacob and Monod: From operons to EvoDevo. **Current Biology**, v. 20, n. 17, p. R718–R723, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.027>>.

GENTRY, L.R., FERNANDEZ, J.M., WARD, T.L., WHITE, T.W., SOUTHERN, L.L., BIDNER, T.D., THOMPSON, D.L., HOROHOV, D.W., CHAPA, A.M., SAHLU, T. Dietary protein and chromium tripicolinate in Suffolk wether lambs: effects on production characteristics, metabolic and hormonal responses, and immune status. **Journal of Animal Sciences**, v. 77: 1284–1294, 1999. <https://doi.org/10.2527/1999.7751284x>

GODFRAY, H.C., J.R. BEDDINGTON, I.R. CRUTE, L. HADDAD, D. LAWRENCE, J.F. MUIR, J. PRETTY, S. ROBINSON, S.M. THOMAS, e C. TOULMIN. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v.327, p.812–818, 2010.

GRASSOT, Vincent et al. Highlights of glycosylation and adhesion related genes involved in myogenesis. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014.

GROSS, Barbara et al. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 36-49, 2017.

GUHA, Shreyoshi et al. Epigenetics and mitochondrial dysfunction insights into the impact of the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Cell Biochemistry and Function**, 2022.

GUI, Weiwei et al. LncRNAH19 improves insulin resistance in skeletal muscle by regulating heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2020.

HAUN, Cody T. et al. Soy protein supplementation is not androgenic or estrogenic in college-aged men when combined with resistance exercise training. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

HAYIRLI, A.; BREMMER, D.R., BERTICS, S.J. et al. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1228-1230, 2001.

HEIN, Nadine et al. The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 19, n. 11, p. 643-654, 2013.

HONG, S. M., K. I. SUNG, S. J. OHH, J. S. SHIN, C. H. KIM E H. S. KIM. Effect of chromium methionine supplementation to castrated fattening steers on carcass quality and blood metabolites. **Proc. Ann. Congress Kor. Soc. Anim. Sci. Tech.** p. 196, 2002.

HOPKINS, D. L.; HOLMAN, B. W. B.; VAN DE VEN, R. J. Modelling lamb carcass pH and temperature decline parameters: Relationship to shear force and abattoir variation. **Meat Science**, v. 100, p. 85–90, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.09.144>>.

HU, Xiaoli et al. The emerging role of WWP1 in cancer development and progression. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2021.

HUA, Yanan et al. Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 313-319, 2012.

HUANG, D. W. et al. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W169-75, 2007.

HUANG, Y. et al. Effects of Supplemental Chromium Source and Concentration on Growth Performance, Carcass Traits, and Meat Quality of Broilers Under Heat Stress Conditions. **Biological Trace Element Research**, v. 170, n. 1, p. 216–223, 2016.

HUH, Jin Young et al. A novel function of adipocytes in lipid antigen presentation to iNKT cells. **Molecular and cellular biology**, v. 33, n. 2, p. 328-339, 2013.

HUNT, C. D.; STOECKER, B. J. Deliberations and Evaluations of the Approaches, Endpoints and Paradigms for Boron, Chromium and Fluoride Dietary Recommendations. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 9, p. 2441S-2451S, 1996.

HUNT, M. R. et al. Consumer assessment of beef palatability from four beef muscles from USDA Choice and Select graded carcasses. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 1-8, 2014.

IMMONEN, K. et al. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v. 55, n. 1, p. 25–31, 2000.

IQBAL, Jahangir et al. Sphingolipids and lipoproteins in health and metabolic disorders. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 506-518, 2017.

JAIN, Sushil K. et al. Effect of chromium dinicocysteinate supplementation on circulating levels of insulin, TNF- α , oxidative stress, and insulin resistance in type 2 diabetic subjects: Randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 8, p. 1333-1341, 2012.

JEEJEEBHOY, K. N. Potential Toxin. **Nutrition Reviews**, v. 57, n. 11, p. 329–335, 1999.

JOO S. T., HWANG Y. H., FRANK D. Characteristics of Hanwoo cattle and health implications of consuming highly marbled Hanwoo beef. **Meat Science**, v.132, p.45–51, 2017.

KASZYCKI, P. et al. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. **Microbiological Research**, v. 159, n. 1, p. 11–17, 2004.

KATO, Hiroki; TAKAHASI, Kiyohiro; FUJITA, Takashi. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. **Immunological reviews**, v. 243, n. 1, p. 91-98, 2011.

KEGLEY, E. B.; SPEARS, J. W.; BROWN, T. T. Effect of Shipping and Chromium Supplementation on Performance, Immune Response, and Disease Resistance of Steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 7, p. 1956–1964, 1997.

KHAN, N. et al. Determination of minor and trace elements in aromatic spices by micro-wave assisted digestion and inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 158, p. 200–206, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.103>>.

KIM, Y. H. et al. Effects of dietary levels of chromium picolinate on growth performance, carcass quality and serum traits in broiler chicks. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 1996.

KIMMEL, Alan R. et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 3, p. 468-471, 2010.

- KLIMOV, A. N. et al. Inhibition of lipoprotein lipolysis by polyarginine and evaluation of the mechanism of its interaction with lipoprotein lipase. **Biokhimiia (Moscow, Russia)**, v. 50, n. 5, p. 804-813, 1985.
- KLINDWORTH A., et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v.41, 2013.
- KORNERGAY, E. T., Z. WANG, C. M. WOOD AND M. D. LINDEMANN. Supplemental chromium picolinate influences nitrogen balance, dry matter digestibility, and carcass traits in growing/finishing pigs. **Journal of Animal Sciences**, v.75, p.1319-1323, 1997.
- KRAHMER, Natalie et al. Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 5, p. 1115-1126, 2013.
- KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, Heidelberg, v. 32, p. 1219-1228, 1997.
- KRÓLICZEWSKA, B. et al. Changes in selected serum parameters of broiler chicken fed supplemental chromium. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 11–12, p. 393–400, 2004.
- KU, Nam-On et al. Keratins as susceptibility genes for end-stage liver disease. **Gastroenterology**, v. 129, n. 3, p. 885-893, 2005.
- KU, Nam-On et al. Keratins let liver live: mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1639-1649, 2007.
- KU, Nam-On; OMARY, M. Bishr. A disease-and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. **The Journal of cell biology**, v. 174, n. 1, p. 115-125, 2006.
- LANGMEAD, B. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.
- LASHKARI, S.; HABIBIAN, M.; JENSEN, S. K. A Review on the Role of Chromium Supplementation in Ruminant Nutrition—Effects on Productive Performance, Blood Metabolites, Antioxidant Status, and Immunocompetence. **Biological Trace Element Research**, v. 186, n. 2, p. 305–321, 2018.
- LAWRIE, R. A.. *Ciência da Carne*. Ed.Artmed, 6ª ed., Porto Alegre, Artmed, 2005.

LEBEAUPIN, Cynthia et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 69, n. 4, p. 927-947, 2018.

LEHNINGER, ALBERT LESTER. Lehninger – Princípios da Bioquímica. Ed. Savier, 3ª ed., São Paulo, 975p., 2002.

LEIVA, T. et al. Effects of excessive energy intake and supplementation with chromium propionate on insulin resistance parameters, milk production, and reproductive outcomes of lactating dairy cows. **Livestock Science**, v. 180, p. 121–128, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.08.007>>.

LESTER, G.; BONNER, D. M. The occurrence of beta- galactosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 63, p. 759–769, 1952.

LI, Qin et al. Bile acids stimulate cholangiocyte fluid secretion by activation of transmembrane member 16A Cl⁻ channels. **Hepatology**, v. 68, n. 1, p. 187-199, 2018.

LI, Wei et al. A novel human TINP1 gene promotes cell proliferation through inhibition of p53 and p21 expression. **Oncology Reports**, v. 30, n. 4, p. 1848-1852, 2013.

LI, Wei-Jen et al. Hexavalent chromium induces expression of mesenchymal and stem cell markers in renal epithelial cells. **Molecular carcinogenesis**, v. 55, n. 2, p. 182-192, 2016.

LI, Y. S. et al. Effects of dietary chromium methionine on growth performance, carcass composition, meat colour and expression of the colour-related gene myoglobin of growing-finishing pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1021–1029, 2013.

LIEN, T. F. et al. Effect of supplemental levels of chromium picolinate on the growth performance, serum traits, carcass characteristics and lipid metabolism of growing-finishing pigs. **Animal Science**, v. 72, n. 2, p. 289–296, 2001.

LIN, Zhenghong; YAN, Xiaohua. Regulation of Ubiquitination and Sumoylation Signaling in Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.

LINDEMANN, M.D, WOOD, C.M., HARPER, A.F. et al. Dietary chromium picolinate additions improve gain:feed and carcass characteristics in growing-finishing pigs and increase litter size in reproducing sows. **Journal of Animal Science**, v.73, p.457-465, 1995.

LIU, Hui-Yu et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of

key autophagy genes by insulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31484-31492, 2009.

LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of applied physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–236, 1970.

LOVE, M. I., HUBER, W. e ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, London, GBR, v. 15, n. 12, p. 550-570, 2014.

LU, Cuihua et al. Increased α -tubulin1b expression indicates poor prognosis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 9, p. 2713-2720, 2013.

LUSEBA, D. Effect of selenium and chromium on stress level, growth performance, selected carcass characteristics and mineral status of feedlot cattle. 2005. 214f. These (Doctor of Philosophy in Veterinary Science) - Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, Pretoria, 2005.

LYNCH, A., BUCKLEY, D. J., GALVIN, K., MULLEN, A. M., TROY, D. J., & KERRY, J. P. Evaluation of rib steak colour from Friesian, Hereford and Charolais heifers pastured or overwintered prior to slaughter. **Meat Science**, v.61, p.227–232, 2002.

MAC NEIL, S., DAWSON, R., LAKEY, T. & MORRIS,. Activation of calmodulin by the essential trace element chromium. **Cell Calcium**, p.201-216, 1987.

MAHMOUD, A.; ZANOUNY, A. Impact of Organic Chromium on Some Productive Performances and Physiological Responses of Growing Barki Lambs. **Egyptian Journal of Nutrition and Feeds**, v. 21, n. 2, p. 337–344, 2018.

MANCINI, R. A., HUNT, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, v.71, p.100-121, 2005.

MAPLES, N. L.; BAIN, L. J. Trivalent chromium alters gene expression in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 626–631, 2004.

MARTIN, J. et al. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1826–1832, 2006.

MATHISON, G. W.; ENGSTROM, D. F. Chromium and protein supplements for growing-finishing beef steers fed barley-based diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 4, p. 549–558, 1995.

MATSUZAWA-NAGATA, Naoto et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet–induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

MATTHEWS, J. O., SOUTHERN, L. L., FERNANDEZ, J. M., PONTIF, J. E., BIDNER, T. D., ODGAARD R. L. Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2172–2178, 2001.

MCCARTY, M. F. Anabolic effects of insulin on bone suggest a role for chromium picolinate in preservation of bone density. **Medical Hypotheses Journal**, v.45, p.241-246, 1995.

MCDONALD, P. M.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D. **Animal Nutrition**. 6th edition. Longman, London and New York, 543p. 2002.

MCDOWELL, L.R. Minerals in animal and human nutrition. **Academic Press**, p.368-370, 1992.

MERTZ, W. Chromium in human nutrition: A review. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 4, p. 626–633, 1993.

MI, Jing Lin et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Four Genes Associated with Survival Outcome for Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Science Repository**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2020.

MICHAEL, M. Dodson et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Molecular cell**, v. 6, n. 1, p. 87-97, 2000.

MILLER R.K. Quality Characteristics. In: Kinsman D.M., Kotula A.W., Breidenstein B.C. (eds) **Muscle Foods**. Springer, Boston, MA, 1994.

MILLWARD, D. J. et al. Protein metabolism in skeletal muscle: the effect of feeding and fasting on muscle RNA, free amino acids and plasma insulin concentrations. **British journal of nutrition**, v. 32, n. 1, p. 127-142, 1974.

MOHAMMADABADI, Mohammadreza et al. Key genes regulating skeletal muscle development and growth in farm animals. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 835, 2021.

MOONEY, K.W., CROMWELL, G.L. Efficacy of chromium picolinate and chromium chloride as potential carcass modifiers in swine. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2661–2671, 1997.

MOORADIAN, A.; MORLEY, J. Micronutrient in diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 877–895, 1987.

MOORE, J. W. et al. Chromium Picolinate Modulates Rat Vascular Smooth Muscle Cell Intracellular Calcium Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 2, p. 180–184, 2018.

MORENO-CAMARENA, L. et al. Effects of dietary chromium-yeast level on growth performance, blood metabolites, meat traits and muscle fatty acids profile, and microminerals content in liver and bone of lambs. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 1532–1541, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1853620>>.

MORENO-CAMARENA, L. et al. Effects of organic chromium supplementation to finishing lambs diet on growth performance, carcass characteristics and meat quality. **Journal of Integrative Agriculture**, 2015.

MOSTAFA-TEHRANI, A. et al. Non-carcass components and wholesale cuts of Iranian fat-tailed lambs fed chromium nicotinate or chromium chloride. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1–2, p. 12–19, 2006.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics : goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. April, p. 315–322, 2003.

MURDIE P.J. AND HOLMES S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **Plos one**, v.A8(4), p. e61217, 2013.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL. 89, p. 1–13, 2010.

NAJAFPANAH, M. J. et al. Chromium downregulates the expression of Acetyl CoA Carboxylase 1 gene in lipogenic tissues of domestic goats: A potential strategy for meat quality improvement. **Gene**, v. 543, n. 2, p. 253–258, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.006>>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington: 6th National Academy Press, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids**. Washington: 6th National Academy Press, 2007.

- NOORI-DALOII, M. R., NEJATIZADEH, A. Nutritional Transcriptomics: An Overview. **Nutritional Transcriptomics. Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods**, p.545–556, 2015.
- NRC – National Research Council. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th.ed. Washington, DC: National Academy Press, 242p. 2000
- OGNIK, Katarzyna et al. The effect of the high-fat diet supplemented with various forms of chromium on rats body composition, liver metabolism and organ histology Cr in liver metabolism and histology of selected organs. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 64, p. 126705, 2021.
- OKADA, S., SUZUKI, M., OHBA, H. Enhancement of ribonucleic acid synthesis by chromium(III) in mouse liver. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.19, p.95-103, 1983.
- OLIVEIRA, DJC; SOARES FILHO, C. Suplementação com cromo para ruminantes. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 8, n. 1, p. 71–77, 2005.
- OLIVO, R. Alterações oxidativas em produtos cárneos. In: OLIVO, R. et. al. O mundo do frango. São Paulo: Rubison Olivo, 2006. Cap. 44, p.533-542.
- OOH, S. J.; LEE, J. Y. Dietary chromium-methionine chelate supplementation and animal performance. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 6, p. 898–907, 2005.
- OTT, Martin et al. The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27633-27639, 2007.
- PADMAVATHI, I. J. N. et al. Maternal dietary chromium restriction programs muscle development and function in the rat offspring. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 3, p. 349–355, 2010.
- PAIK, I. Application of chelated minerals in animal production. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 14, n. December, p. 191–198, 2001.
- PALLAUF, J, MULLER, A,S. Inorganic feed additives. In: Mosenthin R, Zentek J, Zebrowska T, editors. **Biology of Nutrition in Growing Animals**. Philadelphia, PA, USA: Elsevier; p. 179–249, 2006.
- PARK, Tae-Sik et al. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 10, p. 2101-2112, 2008.

- PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 1, p. 1–18, 2007.
- PELAVA, Andria; SCHNEIDER, Claudia; WATKINS, Nicholas J. The importance of ribosome production, and the 5S RNP–MDM2 pathway, in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 4, p. 1086-1090, 2016.
- PFLANZER, S. B.; DE FELÍCIO, P. E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, v. 83, n. 4, p. 697-701, 2009.
- POLIZEL, D. M. et al. Low doses of monensin for lambs fed diets containing high level of ground flint cor. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 4, p. 1–8, 2021.
- PRESS, R. I.; GELLER, J.; EVANS, G. W. The effect of chromium picolinate on serum cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. **Western Journal of Medicine**, v. 152, n. 1, p. 41–45, 1990.
- PREUSS, H.G., GROJEC, P.L., LIEBERMAN, S., et al. . Effects of different chromium compounds on blood pressure and peroxidation in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Nephrology** v.47, p.325-30, 1997.
- PRZYBYLAK, A. et al. Estimation of intramuscular level of marbling among Whiteheaded Mutton Sheep lambs. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 199-204, 2016.
- PURSLOW, Peter P. New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 133-153, 2014.
- QIAO, W. et al. Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. **Biological Trace Element Research**, v. 131, n. 2, p. 133–142, 2009.
- QUIN, Jaclyn E. et al. Targeting the nucleolus for cancer intervention. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 6, p. 802-816, 2014.
- RAKHMAWATI, R. et al. Bioefficacy of dietary chromium picolinate and chromium yeast on growth performance and blood biochemical in Red Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture Research**, v. 49, n. 2, p. 839–846, 2018.
- RESENDE-JUNIOR, J. C. et al. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 526–536, 2006.

RESENDE-JUNIOR, J. C. et al. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 526–536, 2006.

REYER, Henry et al. Genetics of body fat mass and related traits in a pig population selected for leanness. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

ROBINSON M.D., MCCARTHY D.J., SMYTH G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v.26(1), p.139-140, 2010.

ROLING, J. A.; BALDWIN, W. S. Alterations in hepatic gene expression by trivalent chromium in *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. SUPPL. 1, p. 122–127, 2006.

ROSEBROUGH, R.W., STEELE, N.C. Effect of supplemental dietary chromium or nicotic acid on carbohydrate metabolism during basal starvation and refeeding periods in poult. **Poultry Science**, v.60, p. 407, 1981.

RUSSELL, A. Fed Proc. v.14, p.696- 706, 1955.

RUSSELL, David W. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S120-S125, 2009.

SADEGHI, M. et al. Transcription analysis of genes involved in lipid metabolism reveals the role of chromium in reducing body fat in animal models. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 45–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.05.004>>.

SÁNCHEZ-MENDOZA, B. et al. Effects of high-level chromium methionine supplementation in lambs fed a corn-based diet on the carcass characteristics and chemical composition of the longissimus muscle. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, n. 3, p. 376–379, 2015.

SARNYAI, Farkas et al. Bgp-15 protects mitochondria in acute, acetaminophen overdose induced liver injury. **Pathology & Oncology Research**, v. 26, n. 3, p. 1797-1803, 2020.

SCHIPPER, Henk S. et al. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 9, p. 3343-3354, 2012.

SCHWARZ, K., WALTER, M. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. **Archives in Biochemistry and Biophysic**, v. 4, p.292–295, 1959.

SCUDIERI, Paolo et al. The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 2, p. 177-183, 2012.

SEABORNE, Robert A. et al. Human skeletal muscle possesses an epigenetic memory of hypertrophy. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2018.

SEEBACHER, Fabian et al. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2020. p. 72-81.

SEIFALINASAB, A.; MOUSAIE, A.; DOOMARY, H. Dietary High Chromium-Methionine Supplementation in Summer-Exposed Finishing Lambs: Impacts on Feed Intake, Growth Performance, and Blood Cells, Antioxidants, and Minerals. **Biological Trace Element Research**, 2021.

SINGH, Rajat et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1131-1135, 2009.

SPEETJENS, J. K. et al. The nutritional supplement chromium(III) tris(picollinate) cleaves DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 483–487, 1999.

SREEJAYAN, Nair et al. Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. **Obesity**, v. 16, n. 6, p. 1331-1337, 2008.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631–656, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>>.

STARKEY, Colin P. et al. Do sarcomere length, collagen content, pH, intramuscular fat and desmin degradation explain variation in the tenderness of three ovine muscles?. **Meat Science**, v. 113, p. 51-58, 2016.

STARZL, Thomas E.; PORTER, Kendrick A.; PUTNAM, Charles W. Insulin, glucagon, and the control of hepatic structure, function, and capacity for regeneration. **Metabolism**, v. 25, n. 11 Sup, p. 1429-1434, 1976.

STEARNS, D. M. et al. Chromium(III) picollinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1643–1648, 1995.

STEARNS, D. M. et al. Chromium(III) tris(picollinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 135–142, 2001.

STOECKER, B. J. Chromium absorption, safety, and toxicity. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, v. 12, n. 2, p. 163–169, 1999.

SUMNER, J. M.; VALDEZ, F.; MCNAMARA, J. P. Effects of chromium propionate on response to an intravenous glucose tolerance test in growing Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3467–3474, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-623>>.

SUN, Y. et al. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 129–136, 2000.

SUNDARAM, Bhuvaneshwari; SINGHAL, Kirti; SANDHIR, Rajat. Ameliorating effect of chromium administration on hepatic glucose metabolism in streptozotocin-induced experimental diabetes. **Biofactors**, v. 38, n. 1, p. 59-68, 2012.

SUSHKO, O. O.; ISKRA, R. J.; PONKALO, L. I. Influence of chromium citrate on oxidative stress in the tissues of muscle and kidney of rats with experimentally induced diabetes. **Regulatory Mechanisms in Biosystems**, v. 10, n. 2, p. 209-214, 2019.

TEIXEIRA, Priscilla D. et al. Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. **Meat Science**, v. 133, p. 110-118, 2017.

TIZIOTO, Polyana Cristine et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological genomics**, v. 45, n. 21, p. 1012-1020, 2013.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-11, 2009.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. **The liver**. v. 27, n. 21, 2018.

URBERG, M.; ZEMEL, M. B. of Glucose Tolerance in Elderly Humans. **Metabolism**, v. 36, n. 9, p. 896–899, 1987.

VARGAS-RODRIGUEZ, C. F. et al. Effects of supplemental chromium propionate and rumen-protected amino acids on productivity, diet digestibility, and energy balance of peak-lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3815–3821, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7767>>.

VESTERGAARD M., THERKILDSEN M., HENCKEL P., JENSEN LR., ANDERSEN HR., & SEJRSEN K. Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on meat and eating quality of young bulls and the relationship

between muscle fibre characteristics, fibre fragmentation and meat tenderness. **Meat Science**. V.54, p.187–195, 2000.

VINCENT, J. B. Relationship between Glucose Tolerance Factor and Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance. **The Journal of Nutrition**, Volume 124, Issue 1, n. July 1993, p. 117–118, 1994.

VINCENT, J. B. The potential value and toxicity of chromium picolinate as a nutritional supplement, weight loss agent and muscle development agent. **Sports Medicine**, v. 33, n. 3, p. 213–230, 2003.

VINCENT, J.B. The nutritional biochemistry of chromium (III). 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2007.

VYNCKE, W. Evaluation of the Direct Thiobarbituric Acid Extraction Method for Determining Oxidative Rancidity in Mackerel (*Scomber scombrus* L. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 77, n. 6, p. 239–240, 1975.

WANG, Changyu et al. Novel role of COX6c in the regulation of oxidative phosphorylation and diseases. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2022.

WEBB, E.C. AND O'NEILL, H.A., The animal fat paradox and meat quality. **Meat Science**. V.80, p.28-36, 2008.

WEI, L. et al. Dietary Trivalent Chromium Exposure Up-Regulates Lipid Metabolism in Coral Trout: The Evidence From Transcriptome Analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. February, 2021.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; ST. PIERRE, N. R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 39, n. 1–2, p. 95–110, 16 nov. 1992. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840192900344>>.
Acesso em: 21

WEX, Brigitte et al. SLC35B4, an inhibitor of gluconeogenesis, responds to glucose stimulation and downregulates Hsp60 among other proteins in HepG2 liver cell lines. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1350, 2018.

WHITNEY, E.N., CATALDO, C.B. Understanding Normal and Clinical Nutrition. West Pub., St. Paul, Minn., 1983.

WOOD, J. D., ENSER, M., FISHER, A. V., NUTE, G. R., RICHARDSON, R. I., & SHEARD, P. R. Manipulating meat quality and composition. **Proceedings of the Nutrition Society**, 58, 363–370, 1999.

WOOL, G., CASTLES, J., LEADER, D. P., FOX, A. Handbook of Physiology, Endocrine Pancreas, ed. D. F. Steiner, N. Freinkel, 385-94. Washington DC : **American Physiological Society**, p.721, 1972.

WRIGHT, A. J.; MOWAT, D. N.; MALLARD, B. A. Supplemental chromium and niacin for stressed feeder calves. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 75, n. 3, p. 351–358, 1995.

XU, Guoheng; SZTALRYD, Carole; LONDOS, Constantine. Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 1, p. 83-90, 2006.

YAMAMOTO, A.; WADA, O.; MANABE, S. Evidence that chromium is an essential factor for biological activity of low-molecular-weight, chromium-binding substance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 163, n. 1, p. 189–193, 1989.

YAN, X. et al. Effects of chromium yeast on performance, insulin activity, and lipid metabolism in lambs fed different dietary protein levels. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 6, p. 853–860, 2008.

YANG, C. et al. Methylation pattern variation between goats and rats during the onset of puberty. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 793-800, 2018.

YANG, Cheng-Lin et al. Trivalent chromium induces autophagy by activating sphingomyelin phosphodiesterase 2 and increasing cellular ceramide levels in renal HK2 cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 11, p. 2424-2433, 2017.

YANG, Zhifen; KLIONSKY, Daniel J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 2, p. 124-131, 2010.

YARI, M. et al. Physiological calf responses to increased chromium supply in summer. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4111–4120, 2010.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2568>>.

YUAN, T. et al. Loss of Merlin/NF2 protects pancreatic β -cells from apoptosis by inhibiting LATS2. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 2, p. e2107-e2107, 2016.

ZHANG, F. J. et al. Effects of temperature-humidity index and chromium supplementation on antioxidant capacity, heat shock protein 72, and cytokine responses of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 7, p. 3026–3034, 2014.

ZHANG, Hongbing et al. Effect of chromium picolinate supplementation on growth performance and meat characteristics of swine. **Biological trace element research**, v. 141, n. 1, p. 159-169, 2011.

ZHANG, Meng et al. Identification of differentially expressed genes and pathways between intramuscular and abdominal fat-derived preadipocyte differentiation of chickens in vitro. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2019.

ZHAO, Mingxia et al. Loss of hnRNP A1 in murine skeletal muscle exacerbates high-fat diet-induced onset of insulin resistance and hepatic steatosis. **Journal of molecular cell biology**, v. 12, n. 4, p. 277-290, 2020.

ZHAO, Tao et al. Lipophagy mediated carbohydrate-induced changes of lipid metabolism via oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and ChREBP/PPAR γ pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 10, p. 1987-2003, 2020.

ZHOU, B. et al. Effect of dietary yeast chromium and l-carnitine on lipid metabolism of sheep. **Biological Trace Element Research**, v. 155, n. 2, p. 221–227, 2013.

ZHU, Qingqing et al. A novel prognostic index model constructed with five autophagy-related genes may be a potential prognostic biomarker and therapeutic target in liver hepatocellular carcinoma. 2020.

ZHU, Xiao et al. Biological function of SPNS2: From zebrafish to human. **Molecular Immunology**, v. 103, p. 55-62, 2018.