

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

**Ácidos graxos como um componente dietético funcional e de
importância nutricional: uma abordagem genômica**

Aline Silva Mello Cesar
Zootecnista

Tese de Livre Docência

Piracicaba – SP
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

**Entendendo o papel dos ácidos graxos como um componente dietético
funcional e de importância nutricional**

Aline Silva Mello Cesar

Documento apresentado à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP), para obtenção do título de Livre Docência em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de Biologia Molecular Aplicada à Ciências dos Alimentos.

Piracicaba – SP

2022

**Aos meus amores,
Albino e André,
Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Aos Professores que contribuíram para a minha formação e que me incentivaram a seguir essa carreira que me faz sentir realizada e feliz pelas escolhas que fiz: Professora.

Aos Professores Luiz Lehmann Coutinho e Severino Matias de Alencar pelo incentivo e sugestões.

Às Professoras e Pesquisadoras Luciana Correia de Almeida Regitado e Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce pelos ensinamentos, discussões e sugestões no meu direcionamento profissional.

Ao Professor James Reecy pela oportunidade de desenvolver meus estudos e pesquisa na Iowa State University, USA.

Aos meus queridos colegas que fizeram parte de muitos dos estudos aqui descritos e que construímos uma amizade para a vida, Andrezza Felício, Gabriel Moreira, Bruna Petry, Priscila Trevisoli, Ariana Nascimento, Mirele Poleti, Priscila Oliveira, Gabriella Oliveira, Bárbara Silva-Vignato, Juliana Petrini e Juliana Afonso.

À minha querida amiga Cristina Tschorny Moncau pela nossa amizade e vivência por todos esses anos.

Aos meus queridos orientados que fazem parte da minha formação como Docente e que sem perceberem são o estímulo do meu crescimento profissional. Em especial, Simara Fanalli, Bruna Martins, Felipe Freitas, Fernanda Ciconello, Heloísa Defant, Julia Martins, Julia Dezen, Débora Campos, Janaína Lustosa, Laura Pian, Natália Peccin, Milena Custódio, Karina Mesquiati, Izabela Bitencort, Laura Oliveira, Tânia Rodrigues, Felipe Braguim.

Às funcionárias Mariana Baccarin Dargelio e Denise Leme do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, um obrigada especial.

Às funcionárias Maria Antonia Calori (Tota) e Ivani Zambello do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pela parceria e consolidação do Laboratório de Biologia Molecular e Micotoxinas – LABMIC.

A todos os Professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

À FAPESP pelo fomento das bolsas e auxílios à pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos meus amores Albino Luchiari Filho e André Cesar Luchiari pelo amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado nas alegrias, nas tristezas, nos sucessos e nas dificuldades e por serem a razão de tudo.

RESUMO

Os lipídios são uma classe de moléculas presentes em todos os tipos de células. Contribuem com a estrutura celular, o armazenamento de energia e várias funções biológicas, desde a regulação transcricional até os processos fisiológicos. Estas moléculas também são responsáveis pelo valor nutricional da carne, que são diretamente influenciadas pela dieta animal. Devido ao aumento da preocupação dos consumidores em relação à segurança alimentar e à qualidade dos alimentos consumidos, o interesse na produção de carne com alto valor nutricional vem aumentando de forma significativa. Assim, avanços tecnológicos na área da biologia molecular têm se destacado como um campo de estudo que combina nutrição e ferramentas da biologia molecular, podendo ser destacada a área de estudo chamada de nutrigenômica. A nutrigenômica busca conhecer e entender os processos biológicos resultantes da interação entre genes e nutrientes por meio da aplicação de técnicas e tecnologias modernas da biologia molecular que incluem vários segmentos do Dogma Central da Biologia Molecular como: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Dentro desta área do conhecimento bastante complexa, ainda se desconhece o papel dos ácidos graxos como um componente dietético funcional e de importância nutricional em relação à produção e saúde animal, assim como em relação à saúde humana. Assim, o presente trabalho traz os principais resultados da minha contribuição para a melhor compreensão do papel dos ácidos graxos, seguindo as abordagens da genômica e aplicação da biologia molecular na Ciências dos Alimentos, abrangendo as implicações práticas na área dos estudos de alimentos funcionais.

Palavras-chave: Alimentos funcionais, biologia molecular, doenças metabólicas, nutrigenômica, saúde.

ABSTRACT

Lipids are a class of molecules present in all types of cells. They contribute to cell structure, energy storage and various biological functions, from transcriptional regulation to physiological processes. These molecules are also responsible for the nutritional value of meat, which are directly influenced by the animal diet. Due to the increasing concern of consumers regarding food safety and the quality of the food consumed, interest in the production of meat with high nutritional value has increased significantly. Thus, technological advances in the field of molecular biology have emerged as a field of study that combines nutrition and molecular biology tools, and the area of study called nutrigenomics can be highlighted. Nutrigenomics seeks to know and understand the biological processes resulting from the interaction between genes and nutrients through the application of modern molecular biology techniques and technologies that include several segments of the Central Dogma of Molecular Biology such as: genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics. Within this very complex area of knowledge, the role of fatty acids as a functional and nutritionally important dietary component in relation to animal production and health, as well as in relation to human health, is still unknown. Thus, the present work brings the main results of my contribution to a better understanding of the role of fatty acids, following the approaches of genomics and application of molecular biology in Food Science, covering the practical implications in functional food studies.

Keywords: Functional foods, molecular biology, metabolic diseases, nutrigenomics, health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dogma Central da Biologia Molecular e os estudos publicados segundo a molécula alvo estudada.....	16
Figura 2 – Conexões diferenciais negativas (DH) entre os genes expressos do grupo Alto e Baixo valor genético estimado para gordura intramuscular (GIM)	24
Figura 3 – Conexões diferenciais negativas (DH) entre os genes expressos do grupo Alto e Baixo valor genético estimado para gordura intramuscular (GIM)	25
Figura 4 – As redes de co-expressão mostram a correlação negativa entre miRNAs e processos biológicos enriquecidos em módulos de RNAm no grupo GEBV de baixo IMF.....	28
Figura 5 – Redes de co-expressão mostrando a correlação negativa entre miRNA e processos biológicos enriquecidos em módulos de RNAm no grupo GEBV de alto IMF	29
Figura 6 – Resumo gráfico do estudo de identificação de proteínas diferencialmente abundantes no músculo esquelético (<i>Longissimus dorsi</i>) entre os grupos de animais da raça Nelore com valores genéticos estimados extremos para gordura intramuscular (GIM)	30
Figura 7 – Vias canônicas enriquecidas a partir da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos Alto vs. Baixo com base em valores genéticos estimados para gordura intramuscular	31
Figura 8 – Resumo gráfico do estudo de identificação de proteínas diferencialmente abundantes no músculo esquelético (<i>Longissimus dorsi</i>) entre os grupos de animais da raça Nelore com valores genéticos estimados extremos para ácido oleico e ácido linoléico conjugado (CLA cis-9, trans-11).....	32
Figura 9 – Gráfico Circos de regiões de hotspot eQTL que contêm os fatores de transcrição (FT) <i>EGR4</i> (rs110242967), <i>RUNX1T1</i> (rs134095631) e <i>USF1</i> (rs135914685).....	34
Figura 10 – Redes de co-expressão e principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do <i>hotspot</i> localizado no BTA3 (rs110242967).....	36
Figura 11 – Redes de co-expressão dos principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do <i>hotspot</i> localizado no BTA11 (rs135914685).....	37
Figura 12 – Redes de co-expressão dos principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do <i>hotspot</i> localizado no BTA14 (rs134095631).....	38

Figura 13 – Desenho experimental do projeto.....	41
Figura 14 – Fluxograma das análises realizadas no estudo, iniciando pela coleta e extração do RNA, passando pelas etapas de obtenção dos dados e análises de bioinformática e bioestatística	46
Figura 15 – Estresse oxidativo na disfunção de adipócitos em diabetes tipo 2 e síndrome metabólica.....	51
Figura 16 – Mapa de vias de disfunção mitocondrial em doenças neurodegenerativas.	52
Figura 17 – Rede criada com algoritmo de redes de análise básica MetaCore (fator de transcrição)	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Descrição das vias metabólicas construídas identificadas a partir dos genes diferencialmente expressos entre o grupo de maior e menor GEBV para gordura intramuscular (GIM) com p-valor $\leq 0,10$ 23
- Tabela 2 – Efeito do uso de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre as características de qualidade da carcaça e da carne de suínos em fase de crescimento e terminação¹ 43
- Tabela 3 – Efeito do uso de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos no perfil de ácidos graxos da carne de suínos em fase de crescimento e terminação¹ 44
- Tabela 4 – Mapas de vias biológicas identificadas pelo *software* MetaCore (valor p nominal $< 0,1$) a partir da lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no músculo esquelético de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5% e 3,0% de óleo de soja)..... 47
- Tabela 5 – Mapas de vias biológicas identificadas pelo *software* MetaCore (valor p nominal $< 0,1$) a partir da lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no músculo hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5% e 3,0% de óleo de soja)..... 49
- Tabela 6 – Genes diferencialmente expressos comuns entre as comparações no músculo esquelético de suínos machos imunocastrados alimentados com diferentes perfis de ácidos graxos..... 54
- Tabela 7 – Genes diferencialmente expressos comuns entre as comparações no tecido hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com diferentes perfis de ácidos graxos..... 54
- Tabela 8 – Efeito das dietas sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e perfil de ácidos graxos do fígado de suínos machos imunocastrados alimentados com dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja (SOY1.5: 1,5% e SOY3.0: 3,0% óleo de soja)..... 56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	DESENVOLVIMENTO	17
2.1	Aplicação da ferramenta de genotipagem de SNP em larga escala para identificação de regiões genômicas e genes candidatos por posição.....	19
2.2	Uso da ferramenta de sequenciamento de RNAm total para análise de expressão gênica diferencial e identificação de genes reguladores candidatos.....	20
2.3	Uso da ferramenta de sequenciamento de miRNA total e integração de dados genômicos para identificação de biomarcadores candidatos.....	27
2.4	Aplicação da abordagem de proteômica para o estudo da abundância diferencial de proteínas e identificação de biomarcadores candidatos	29
2.5	Aplicação de ferramentas da bioinformática e bioestatística para identificação de eQTL (<i>expression quantitative trait loci</i>).....	33
2.6	Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticas nas características de interesse econômico na produção de suínos	39
2.7	Efeito de diferentes fontes e níveis de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de diferentes tecidos de animal modelo como o suíno.....	45
2.7.1	Efeito de diferentes níveis de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo).....	46
2.7.2	2.7.2 Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo) 53	
2.7.3	Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo).....	55
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Aqueles que estudam os lipídios entram em uma área da ciência fascinante e ao mesmo tempo ampla e cheia de lacunas e perguntas ainda não preenchidas ou respondidas completamente. Para muitos, lipídios são moléculas importantes para a formação, constituição ou composição de células e hormônios, ou ainda como um importante componente nutricional dos alimentos, que podem conferir sabor e odor aos mesmos. No entanto, são muito mais do que estas interpretações simplistas e merecem ser melhor estudados e compreendidos, pois já temos indicações de sua importância em diversos processos biológicos, em que muitos deles estão associados a doenças metabólicas e qualidade sensorial e nutricional dos alimentos.

Os lipídios são macromoléculas presentes em todos os tipos de células que contribuem para a estrutura celular, o armazenamento de energia e várias funções biológicas, desde a regulação transcricional até os processos fisiológicos (NAKAMURA; NARA, 2003). Nas últimas décadas, foi relatado que o consumo de ácidos graxos (AG) está associado à deposição de gordura e pode ter efeito metabólico, como o conteúdo alterado de lipídios e lipoproteínas no sangue (WOOD et al., 2008). No entanto, ainda existem opiniões contrastantes sobre o papel dos ácidos graxos na saúde animal e humana, o que pode ser observado em avaliações anteriores e estudos de meta-análise realizados nos últimos anos (SCHWINGSHACKL; HOFFMANN, 2014).

Uma importante fonte de ácidos graxos na dieta humana é a carne, que é rica em ácidos graxos saturados (do inglês, *Saturated Fatty Acid*, SFA), monoinsaturados (do inglês, *Monounsaturated Fatty Acid*, MUFA) e poliinsaturados (do inglês, *Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA). Esses ácidos graxos contribuem para o valor nutricional da carne, e sua deposição e composição no tecido esquelético e adiposo são diretamente influenciados pela dieta animal (WOOD et al., 2008). Devido ao aumento na preocupação dos consumidores em relação à segurança alimentar e à qualidade dos alimentos consumidos, o interesse na produção de carne com alto valor nutricional também vem aumentando significativamente (MOREL et al., 2013; DOKMANOVIC et al., 2015).

Embora a carne seja uma das principais fontes de gordura na dieta humana, contém alto teor de gordura saturada associada à algumas doenças metabólicas, como obesidade, diabetes tipo 2, câncer e doença cardíaca coronária (LICHTENSTEIN et al., 1998; LIN et al., 2004). Por outro lado, a carne tem alto valor nutricional. É uma

importante fonte de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico (AO, C18:1 cis 9) e ácido linoleico (AL, C18: 2 cis9, 12), os quais apresentam efeitos benéficos sobre a saúde humana (LAAKSONEN et al., 2005).

Estudos anteriores mostraram que AO, bem como outros ácidos graxos, como o AL, o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) estão associados à regulação da transcrição de genes em tecidos como músculo, fígado, adiposo, monócitos e células mononucleares do sangue (PARK et al., 2012; LOPEZ et al., 2014). Além disso, os ácidos graxos desempenham papéis importantes nas respostas de citocinas, reações inflamatórias e respostas imunológicas específicas e inespecíficas em seres humanos e animais. Os ácidos graxos podem, portanto, exercer importantes funções imunológicas específicas. Nos últimos dez anos, nossas pesquisas têm contribuído de maneira relevante para uma melhor compreensão dos processos biológicos associados à deposição e composição da gordura intramuscular (GIM) do músculo esquelético (CESAR et al., 2014 (Apêndice A); CESAR et al., 2015 (Apêndice B); CESAR et al., 2016 (Apêndice C)).

De acordo com a World Population Review (2021), a cada dia temos um aumento de cerca de 219.000 pessoas na população mundial, o que limita cada vez mais a disponibilidade de alimentos para população do planeta. Desta forma, há uma necessidade emergencial de se identificar novas estratégias de produção na agricultura e pecuária que aumentem a eficiência da produção de alimentos (DANIEL et al., 2011). O aumento estimado do consumo de alimentos aumentará, conseqüentemente, a demanda por proteína animal de 200 milhões para 470 milhões de toneladas por ano, o que representa um aumento de 70% na eficiência da produção até o ano 2050 (OECD-FAO, 2021). Assim, no setor de produção animal, além da exigência de maior eficiência e sustentabilidade na produção, a qualidade nutricional tornou-se um fator relevante para o consumidor (OCDE-FAO, 2021).

O potencial econômico e a qualidade nutricional têm colocado a carne suína como destaque mundial. A carne suína é a segunda fonte de proteína animal mais consumida no mundo, respondendo por 33% da produção e 34% do consumo global de carne (OCDE-FAO, 2021). Além disso, a carne suína possui um perfil nutricional que pode garantir uma alimentação saudável, equilibrada e segura para a população em crescimento (PARK et al., 2012; DUGAN et al., 2015). A carne suína magra possui uma composição rica em proteínas, pobre em gordura, sendo rica em SFA e é considerada uma importante

fonte de ácidos graxos insaturados (UFA) (DUGAN et al., 2015; MOGHADASIAN; SHAHIDI, 2017).

Mudanças na estratégia alimentar são utilizadas para complementar a dieta animal com componentes específicos para obter vantagens nutricionais e de saúde, como o uso de componentes dietéticos que contribuem para o teor e composição de lipídios em relação ao valor nutricional da carne (ANDERSEN et al., 2005; WOOD et al., 2008). Um exemplo disso é um estudo de Øverland et al. (1996), onde foram utilizados diferentes tipos e níveis de inclusão de óleo de soja e óleo de peixe. A adição de óleo de peixe foi associada a um aumento no teor de PUFA ômega-3 (n-3) no tecido muscular e adiposo e uma diminuição na relação ômega-6:ômega-3 (n-6:n-3). Alimentos fortificados com óleos vegetais, especialmente girassol, soja e canola, contêm altos níveis de AL, AO, e ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3 n-3). Por esse motivo, a demanda por alimentos com maior teor de PUFA e MUFA têm aumentado entre os consumidores, que demandam alimentos mais saudáveis (BAKER et al., 2016).

A carne suína tem uma alta relação n-6/n-3 devido às dietas utilizadas na produção de suínos. Essas práticas são baseadas no uso de óleos vegetais de milho, girassol e soja, que são ricos em PUFA da família n-6, principalmente AL (DUGAN et al., 2015). Além disso, a seleção genética de suínos destinados ao crescimento magro aumentou a concentração de AL na carne suína (WOOD et al., 2008). No entanto, o teor de gordura tem efeito direto no sabor e suculência, bem como na maciez e firmeza da carne suína. Por exemplo, AO é o ácido graxo predominante no tecido suíno (cerca de 40%), enquanto o teor de AL está altamente correlacionado com a firmeza da gordura (ŚWIATKIEWICZ et al., 2016).

Outros benefícios da inclusão de lipídios nas dietas de suínos incluem a redução do desgaste dos equipamentos de processamento de ração. Além disso, em condições climáticas quentes, dietas enriquecidas com lipídios reduziram o ganho de calor (digestão e metabolismo de gordura) em comparação com dietas enriquecidas com carboidratos e proteínas, bem como aumentaram a ingestão de ração e o ganho de peso corporal (KYRIAZAKIS; WHITTEMORE, 2006). Assim, a fortificação da carne suína é uma estratégia viável para aumentar a ingestão de n-3 AG, especialmente em populações que consomem menos peixes ou outros produtos marinhos. Também ajuda a reduzir o consumo de SFA, o que conseqüentemente ajuda a reduzir os efeitos negativos para a saúde e o risco de desenvolver algumas doenças (DUGAN et al., 2015; CESAR et al., 2016).

Além de apresentarem grande importância econômica e alimentar, os suínos domésticos (*Sus scrofa*) são considerados modelos animais para pesquisas nutrigenômicas e para investigação de doenças metabólicas em humanos (DOREAU; CHILLIARD, 1997; LUNNEY, 2007; PAN et al., 2021). Uma vez que compartilham semelhanças anatômicas, morfológicas, fisiológicas e metabólicas com os humanos (BASSOLS et al., 2014; PAN et al., 2021). Os suínos também têm alta homologia e estrutura cromossômica com o genoma humano em comparação com outras espécies animais (SCHOOK et al., 2015; PAN et al., 2021). Quando os genomas de 48 suínos individuais foram sequenciados, 32.548 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) não sinônimos foram observados, seis dos quais estavam ligados a doenças humanas e 11 dos quais estavam associados a fenótipos de doenças humanas (SCHOOK et al., 2015). Há também evidências de que os processos revelados pelo transcriptoma do suíno são semelhantes aos dos humanos (SZOSTAK et al., 2016).

Vários estudos têm sido realizados para verificar os efeitos desses AG na nutrição animal e processos biológicos relevantes. Como exemplo, a influência da nutrição materna no fenótipo da prole tem sido amplamente estudada em diversas espécies. Estudos têm demonstrado que a inclusão de diferentes níveis e tipos de gordura na dieta de porcas prenhes afeta o número de leitões nascidos, peso ao nascer, sobrevivência de leitões neonatos, peso corporal, composição de ácidos graxos do leite, plasma de porcas em lactação e seus leitões. Essa inclusão também demonstrou afetar o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e o desenvolvimento cognitivo (AMUSQUIVAR et al., 2010; CLOUARD et al., 2016; LUO et al., 2019). Estudos recentes também relataram o importante papel dos lipídios na resposta imune e suscetibilidade a doenças metabólicas (RAMAYO-CALDAS et al., 2012; DUAN et al., 2014; VODOLAZSKA; LAURIDSEN, 2020).

Como avanços tecnológicos, a nutrição molecular animal se destaca como um campo de estudo que combina nutrição com biologia molecular em seu nível básico (HASAN; FEUGANG; LIAO, 2019). Este ramo estuda os processos biológicos envolvidos ao nível da expressão gênica e da interação entre genes e nutrientes com o auxílio de técnicas e tecnologias modernas de biologia molecular (ZEMPLINI; DANIEL, 2003). Seguindo o avanço da biologia molecular, as ciências ômicas, incluindo genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, fornecem as ferramentas para desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos fenótipos de interesse e doenças

metabólicas que afetam os seres humanos, como obesidade, diabetes tipo 2 e nível de aterosclerose (HASAN; FEUGANG; LIAO, 2019).

As ferramentas da biologia molecular têm cada vez mais contribuído para a melhor compreensão do papel das moléculas, por exemplo, carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos nos mais diversos mecanismos biológicos responsáveis pela homeostase dos processos metabólicos nos animais e humanos, permitindo desta forma aplicarmos estes conhecimentos nas áreas da saúde e bem-estar animal e humano.

Uma das ferramentas da biologia molecular amplamente utilizada são a genotipagem em larga escala que vem contribuindo para o entendimento da variação genética entre os organismos e sua associação com características de interesse econômico (produção animal e vegetal) e características de saúde e bem-estar. Os estudos que utilizam essa ferramenta são principalmente os chamados estudos de associação ampla (GWAS, do inglês, *Genome-Wide Association Study*), a partir da genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*). Outra ferramenta muito aplicada atualmente, é o sequenciamento de nova geração (NGS), que inclui o sequenciamento do genoma completo (DNA-Seq) e estudo do nível de expressão gênica (RNA-Seq), bem como de RNA regulador, como miRNA (micro RNA), lncRNA (*long non coding RNA*), snRNA (*small nuclear RNA*) e piRNA (*piwi-interacting RNA*).

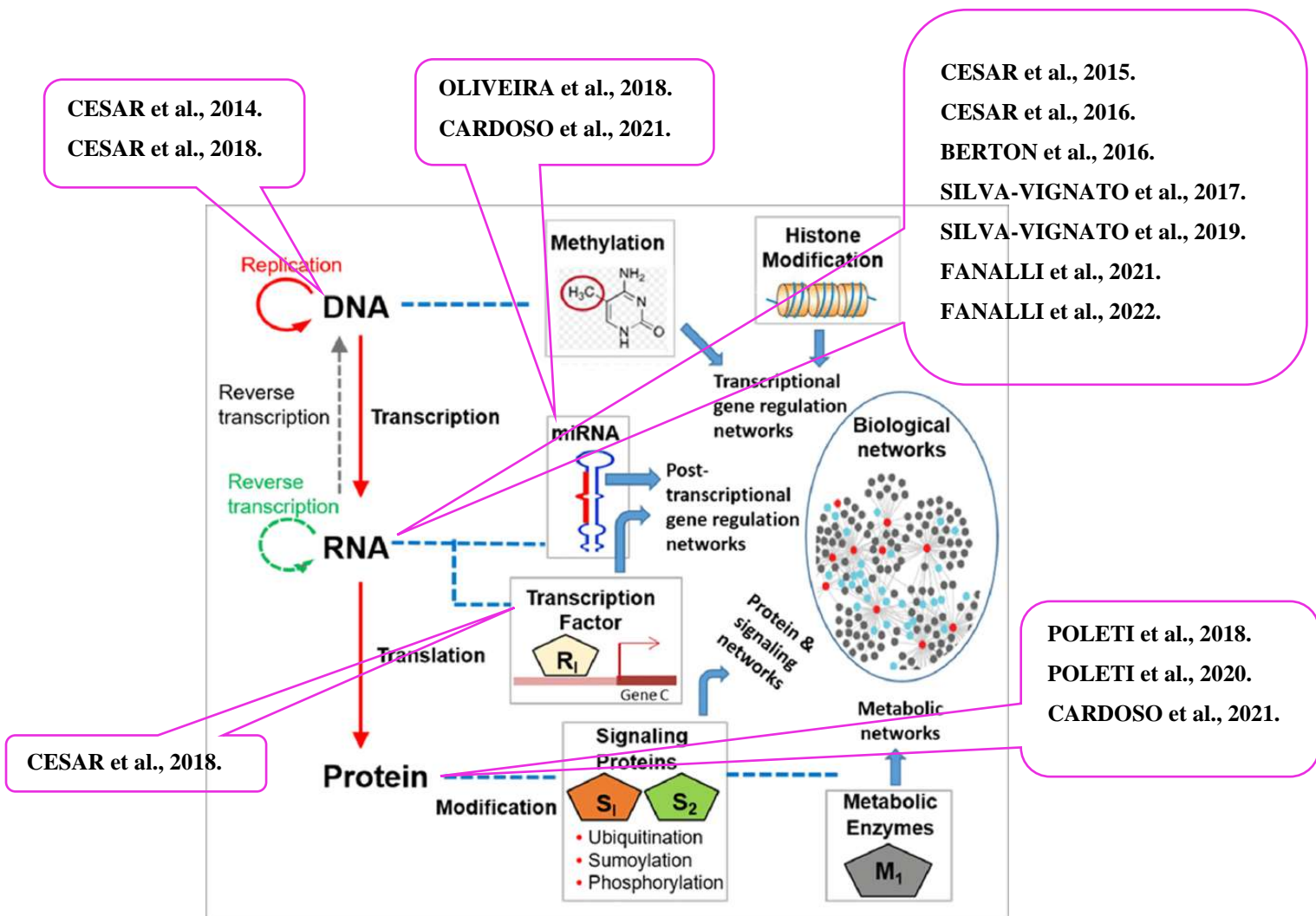
Ainda podemos citar diversas outras ferramentas da biologia molecular que são aplicadas a cada molécula integrante do Dogma Central da Biologia Molecular (CRICK, 1970) e aos mecanismos de regulação, hoje melhor interpretados, como metilação, proteínas e metabólitos. Essas abordagens combinam tecnologias de sequenciamento de alto rendimento e/ou espectrometria de massa com componentes de alimentos e buscam entender como um nutriente pode afetar a abundância genética, proteica e metabólica. Esses tipos de estudos podem elucidar os mecanismos moleculares básicos nos quais os nutrientes podem interagir para regular a expressão gênica, processos fisiológicos, respostas bioquímicas celulares, bem como a expressão do fenótipo (NORHEIM et al., 2012).

Assim, todo meu conhecimento e treinamento intelectual na área da biologia molecular aplicada a Ciências dos Alimentos têm sido aplicados para o papel de docência, cujos principais objetivos são na educação, formação ética-profissional dos alunos da instituição que trabalho e para colaborar com a comunidade científica e a sociedade como um todo no preenchimento das lacunas do conhecimento sobre os lipídios como um

componente de importância funcional e nutricional. Esta tese traz o desenvolvimento da minha contribuição, assim como, da equipe de pesquisadores de instituições de ensino e pesquisa nacionais e internacionais, dos alunos de graduação e pós-graduação que tenho ou tive sob minha orientação.

A aplicação e conhecimento das ferramentas de biologia molecular permitiu a realização de diferentes estudos, os quais contribuíram de forma relevante com a comunidade científica mundial, e nos quais colaborei de forma integral. Esses estudos compõem esta Tese de Livre Docência, os quais mostram a minha contribuição até o momento para a melhor compreensão do papel dos ácidos graxos como componente dietético funcional e de importância nutricional a partir de uma abordagem genômica, seguindo as premissas do Dogma Central da Biologia Molecular (Figura 1).

Figura 1 – Dogma Central da Biologia Molecular e os estudos publicados segundo a molécula alvo estudada



Fonte: adaptada de Liu; Li; Cheng, 2018.

Os estudos que compõem essa tese tiveram como objetivos principais: identificação de regiões genômicas e genes candidatos por posição associadas à quantidade e composição de lipídios da carne de bovinos por meio da ferramenta de genotipagem em larga escala (CESAR et al., 2014); identificação de genes e miRNA diferencialmente expressos entre grupo de animais com valores genômicos extremos de espessura de gordura, área de olho do lombo, gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos no músculo esquelético (CESAR et al., 2015, 2016; BERTON et al., 2016 (Apêndice D); SILVA-VIGNATO et al., 2017 (Apêndice E), 2019 (Apêndice F); OLIVEIRA et al., 2018a (Apêndice G), 2019 (Apêndice H)); estudo da abundância diferencial de proteínas entre grupo de animais com valores genômicos extremos do perfil de ácidos graxos músculo esquelético (POLETI et al., 2018 (Apêndice I), 2020 (Apêndice J)); integração de dados de expressão gênica, abundância de proteínas e de miRNA de animais com valores genômicos extremos do perfil de ácidos graxos no músculo esquelético e eficiência alimentar (OLIVEIRA et al., 2018b (Apêndice L), 2019; CARDOSO et al., 2021 (Apêndice M)); identificação de regiões de eQTL (*expression quantitative trait loci*) que integram dados de chip de SNP e RNA-Seq (CESAR et al., 2018); verificação do efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticas nas características de interesse econômico na produção de suínos (ALMEIDA et al., 2021 (Apêndice N); GOMES et al., 2021 (Apêndice O)); efeito de diferentes fontes e níveis de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de diferentes tecidos de animal modelo, aqui especificamente o suíno (FANALLI et al., 2021 (Apêndice P); FANALLI, 2022; FANALLI et al., 2022 (Apêndice Q)).

2 DESENVOLVIMENTO

Cada vez mais os consumidores têm associado o consumo de gordura da carne com doenças metabólicas como aterosclerose, diabetes do tipo 2 e obesidade, devido principalmente à presença de colesterol, alta concentração de ácidos graxos (SFA), e baixa concentração de PUFA. No entanto, o que muitos não compreendem é que o consumo de ácidos graxos é muito importante para diversos mecanismos biológicos do corpo humano (LABORDE et al., 2001). A carne é um dos alimentos mais completos da dieta humana, justamente por ser uma fonte de proteína (aminoácidos essenciais), ferro, zinco, vitaminas do complexo B e ácidos graxos poliinsaturados essenciais, como ácido linoleico e linolênico (MCNEILL; VAN ELSWYK, 2012), os quais são altamente

biodisponíveis para os humanos. A gordura da carne também tem uma alta proporção de MUFA, cujo ponto de fusão é baixo e pode reduzir a concentração do chamado mal colesterol (LDL) na circulação sanguínea (JACOBSON, 2008). A quantidade de ácidos graxos e sua composição na carne bovina variam de acordo com a raça, nutrição, sexo, idade e nível de acabamento da carcaça (RULE; MACNEIL; SHORT, 1997).

A quantidade e a composição da gordura encontrada na carne são característica de interesse econômico e nutricional, sendo alvo em programas de seleção genética animal. Devido a sua dependência do abate dos animais e do uso de tecnologias como cromatografia gasosa e extração com solventes orgânicos são características ainda pouco estudadas no âmbito de seleção genética e entendimento dos mecanismos genéticos e biológicos associados. Mas com os avanços nas áreas da genética, biologia molecular, bioestatística e bioinformática, ferramentas como a genotipagem em larga escala por meio de chips de SNP de alta densidade tem permitido a identificação de marcadores moleculares do tipo SNP, os quais têm trazido significativos ganhos em programas de seleção genômica.

Para melhor contribuir com os avanços nessa área da ciência e com posse do conhecimento e da infraestrutura necessária para o uso de ferramentas da biologia molecular de nova geração (contando, com suporte financeiro), como o sequenciamento de nova geração (NGS), nosso grupo realizou também estudos do transcriptoma, com o sequenciamento global do RNAm de animais com valores genéticos estimados (GEBV, do inglês, *Genetic Estimated Breeding Value*) extremos para deposição e composição de ácidos graxos na carne de bovinos da raça Nelore.

Para melhor entender os níveis do Dogma Central da Biologia Molecular outros níveis e moléculas foram estudadas como os miRNA, proteínas e fatores de transcrição (FT). Dessa forma, o grupo se tornou também autossuficiente e com competência nas áreas da bioinformática e bioestatística. Esses estudos foram desenvolvidos em conjunto com uma equipe multidisciplinar com pesquisadores de instituições nacionais e internacionais e com suporte financeiro das agências de fomento federais e do Estado de São Paulo.

2.1 Aplicação da ferramenta de genotipagem de SNP em larga escala para identificação de regiões genômicas e genes candidatos por posição

O início dos nossos estudos, pioneiro na identificação de marcadores moleculares do tipo SNP associados à deposição de gordura intramuscular e ao perfil de ácidos graxos desta gordura, revelou regiões genômicas no bovino Nelore (raça amplamente produzida no Brasil) associadas e responsáveis pela variação genética desta raça. E dentro destas regiões genômicas estão genes candidatos por posição como possíveis responsáveis pela variação nas características estudadas (CESAR et al., 2014). Para esse estudo foi utilizada a técnica de genotipagem em larga escala por meio da tecnologia Illumina com o chip *High Density* (HD) bovino (*Bovine HD bead chip array*).

Vinte e três regiões genômicas (janelas de 1 megabase (Mb) SNP) associadas à deposição de gordura intramuscular (GIM) e composição de ácidos graxos no músculo esquelético *Longissimus dorsi*, que explicaram $\geq 1\%$ da variância genética foram identificados nos cromossomos BTA2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 26 e 27 (Tabela 1). Muitas dessas regiões não foram identificadas anteriormente em outras raças. Os genes presentes nestas regiões foram identificados e alguns podem ajudar a explicar a base genética da deposição e composição da gordura no músculo esquelético em bovinos.

Para os MUFA foram identificadas dez regiões genômicas (região de 1 Mb) que explicaram mais do que 1% de variação genotípica para ácidos. As regiões associadas para C14:1 cis-9, C16:1 cis-9, C18:1 cis-9, e C18:1 trans-16, se sobrepõem ao QTL reportado para peso de carcaça, score de marmoreio em Angus (MCCLURE et al., 2010), teor de DHA em Charolês x Holandês gado mestiço (GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009) e ácido palmitoleico em gado leiteiro (MORRIS et al., 2007).

Os estudos de associação genômica aplicada ao conhecimento da variação genética associada à deposição e composição de ácidos graxos na carne bovina bem como dos genes candidatos por posição no genoma (MORRIS et al., 2007; GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009; MCCLURE et al., 2010; CESAR et al., 2014) mostram que diferenças nas frequências alélicas do SNP e desequilíbrio de ligação perfil (DL entre SNP e variantes causais) podem explicar os diferentes efeitos de marcadores entre *Bos indicus* e *Bos taurus*. Esta explicação também foi apresentada por Bolormaa et al. (2013), que compararam efeitos de marcadores usando GWAS para animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, que demonstraram que um efeito SNP depende da origem dos alelos e da segregação de QTL. A segregação de QTL pode resultar na perda de mutação ou fixação de alelos em

uma das raças, e que as mutações ocorreram após divergência dessas raças (BOLORMAA et al., 2013). Além disso, é possível que as diferenças fisiológicas e metabólicas possam contribuir para as diferenças observadas entre diferentes raças. Assim o nosso estudo (CESAR et al., 2014) usando a abordagem da genotipagem em larga escala com chip de SNP de alta densidade (800 K) identificou regiões genômicas associadas com características de interesse econômico como deposição e composição de ácidos graxos na carne bovina, bem como, genes candidatos por posição que podem ser melhor estudados em estudos futuros. Esses resultados contribuem para o melhor conhecimento da base genética envolvida com deposição e composição de ácidos graxos na carne bovina, os quais podem ser considerados e aplicados em programas de seleção genômica de animais para a produção de carne que atenda às exigências dos consumidores tanto para os atributos de qualidade sensorial quanto de qualidade nutricional.

2.2 Uso da ferramenta de sequenciamento de RNAm total para análise de expressão gênica diferencial e identificação de genes reguladores candidatos

Na primeira abordagem dos nossos estudos, na qual foi utilizada a ferramenta da biologia molecular de genotipagem em larga escala, foi possível avançar nos entendimentos sobre a base genética das características de deposição e composição de ácidos graxos na carne bovina. Foram identificadas regiões genômicas associadas a essas características de interesse econômico e nutricional, assim como, genes candidatos por posição no genoma. No entanto, este estudo (CESAR et al., 2014), ainda não consegue revelar o nível de expressão destes genes candidatos por posição, o que não nos permite apresentá-los como possíveis reguladores de processos biológicos associados com metabolismo de lipídios.

A GIM, também conhecida como marmoreio, representa a quantidade de gordura acumulada entre fibras musculares ou dentro das células musculares, que é a soma dos fosfolipídios (presentes nas células membranas) e triglicerídeos (gotículas lipídicas). Entender os mecanismos biológico e funcional que regulam o conteúdo da GIM é uma questão interessante na ciência da carne e na medicina humana. O conteúdo de gordura intramuscular é uma característica poligênica regulada por muitos genes envolvidos diretamente, ou indiretamente na adipogênese e no metabolismo da gordura, a qual é influenciada por muitos fatores como sexo, idade, raça, nutrição e genética (RULE; MACNEIL; SHORT, 1997).

A alta quantidade de GIM depositada tem sido associada à maciez, suculência e satisfação do consumidor (LABORDE et al., 2001). Ao mesmo tempo, que tem sido associada às doenças metabólicas humanas como obesidade, diabetes do tipo 2 e câncer de cólon (JAKOBSEN et al., 2008). Essas associações criaram uma demanda por carne bovina com baixo teor de gordura e alta qualidade nutricional pelos consumidores. Mas os mecanismos biológicos associados à diferença fenotípica e aos processos metabólicos relacionados ao metabolismo de lipídios são ainda desconhecidos. Com o objetivo de melhor compreender esses mecanismos biológicos o nosso grupo realizou um estudo de expressão diferencial por meio do sequenciamento global do RNA mensageiro (RNAm) de amostras do músculo esquelético de bovinos, o qual dará origem a carne demandada pelos consumidores.

A tecnologia de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) tem sido aplicada com êxito para fornecer informações sobre os mecanismos biológicos e moleculares de características de interesse econômico, nutricional e saúde animal e humana. Aliadas a essa tecnologia as abordagens matemáticas, estatísticas e de bioinformática tem ajudado os pesquisadores a entenderem as relações entre os milhares de genes expressos nos mais diversos tecidos. Uma destas abordagens é o estudo das interações entre os componentes de um sistema biológico, por exemplo, RNAm, miRNA, proteínas e metabólitos, e como essas interações nos ajudam a compreender a função e o comportamento do sistema que está sendo estudado. Esse estudo é conhecido como Biologia de Sistemas, o qual envolve a medida quantitativa de processos biológicos e moléculas, modelagem matemática e recursos computacionais, o qual tem apresentado muitos avanços na prevenção de muitas doenças.

Dessa forma, ao aplicarmos esta abordagem para melhor compreender a biologia de sistema do metabolismo lipídico, mais especificamente na deposição e composição de ácidos graxos no músculo esquelético identificamos genes regulatórios candidatos e o comportamento do nível de expressão destes genes entre os grupos de animais com alto e baixo GEBV (extremos) para GIM (CESAR et al., 2015). Neste estudo foram utilizadas as medidas quantitativas do nível de expressão gênica global (perfil do transcriptoma) do músculo esquelético e as metodologias de PCIT (do inglês, *partial correlation coefficient with information theory*, RIF (do inglês, *regulatory impact factor* e PIF (do inglês) *phenotypic impact factor* como proposto por Hudson; Reverter; Dalrymple (2009) seguindo o *pipeline* de análise de Koesterke et al. (2013).

Neste estudo, foram identificados e analisados 16.101 genes expressos no músculo esquelético dos animais que apresentaram de GIM, separados em grupo com alto (A) e grupo com baixo (B) GEBV para GIM. Dos 77 genes diferencialmente expressos e codificadores de proteínas, 37 apresentaram-se menos abundantes nos animais com maior GIM e 40 mais abundantes (CESAR et al., 2015). A partir destes dados vias metabólicas associadas a estes genes foram pesquisadas utilizando o programa Pathway Studio após o enriquecimento da notação dos genes feita pelos bancos de dados DAVID [<https://david.ncifcrf.gov>] e Ensembl [http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index]. Para a utilização do programa Pathway Studio as identificações dos genes a partir das informações do genoma bovino UMD 3.1 foram combinadas com as identificações de humanos. Este procedimento foi necessário uma vez que o programa reconhece apenas identificações de genes humanos. Na busca por vias metabólicas foram utilizados os genes (154 genes) que apresentaram p-valor ajustado ≤ 0.25 , no entanto 45 genes não apresentaram correspondência entre Ensembl ID de bovino e Entrez ID de genes humanos. Esta correspondência é necessária, uma vez que, o *software* Genome Studio apresenta no banco de dados apenas informações das espécies humano, camundongo e drosófila. Por conseguinte, 103 genes bovinos foram elegíveis para a construção de vias metabólicas.

Foram identificadas 13 diferentes vias metabólicas a partir dos resultados das análises de expressão gênica diferencial como apresentado na Tabela 1. Estas vias metabólicas apresentam estreita associação com metabolismo de lipídios em animais fornecendo importantes informações para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na deposição e composição de gordura intramuscular em bovinos.

Tabela 1 – Descrição das vias metabólicas construídas identificadas a partir dos genes diferencialmente expressos entre o grupo de maior e menor GEBV para gordura intramuscular (GIM) com p-valor $\leq 0,10$

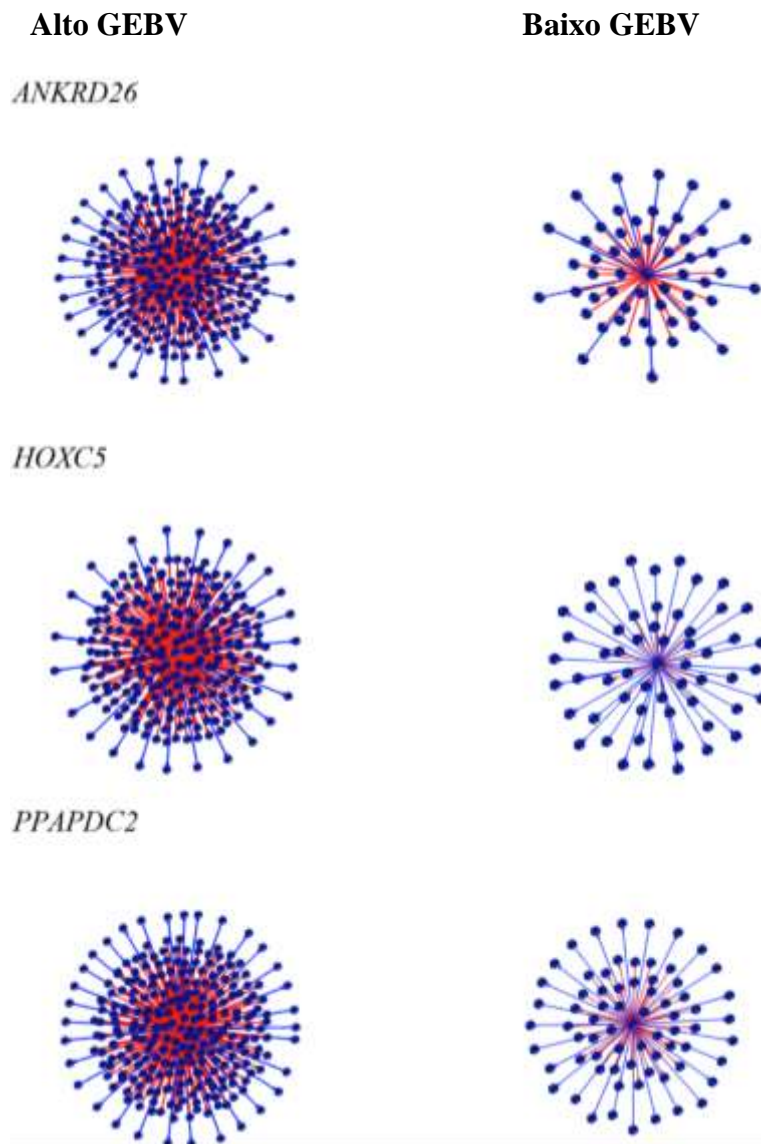
NOME DA VIA	TIPO	NÚMERO TOTAL DE VIZINHOS	NÚMERO DE VIZINHOS MEDIDOS	P-VALOR CORRIGIDO*
L-CISTEINA	Via metabólica	366	5	0.011281
ZN₂₊	Via metabólica	905	6	0.020769
LDL OXIDADO	Via metabólica	424	5	0.023486
CITOCINA INFLAMATÓRIA	Via metabólica	774	9	0.025206
H₂O₂	Via metabólica	1142	8	0.030214
MG₂₊	Via metabólica	562	5	0.033419
ATP	Via metabólica	1167	9	0.060752
IL1B	Via metabólica	1191	12	0.063459
ÁCIDO RETINÓICO	Via metabólica	1605	12	0.074493
NF-KB	Via metabólica	1125	9	0.084637
TIROSINA PROTEINA KINASE	Via metabólica	823	7	0.092395
NO	Via metabólica	862	8	0.096722
ROS	Via metabólica	787	8	0.098109

*Benjamini; Hochbergh, 1995.

Fonte: CESAR et al., 2014.

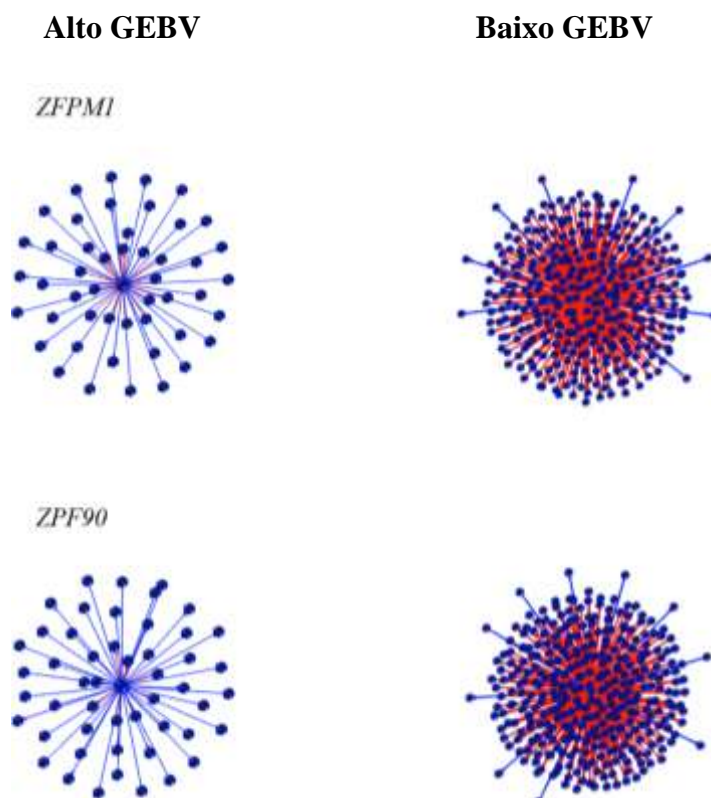
Os resultados das análises pelo método PCIT identificou conexões diferenciais (DH, do inglês, *differential hubs*), ou seja, diferença no número de ligações significativas para cada gene regulador no grupo A e B para valores de GEBV para GIM. Nas Figuras 1 e 2, podemos ver diferença nas conexões entre os grupos de genes entre os grupos A e B mostrando existir uma interação (correlação) diferenciada, ou seja, uma biologia de sistema diferente entre os grupos. Os genes representados nestas figuras representam os três genes com maior número de conexões, genes correlacionados positivamente, e os dois com maior número de conexões, genes correlacionados negativamente. A Figura 2 mostra a representação gráfica do DH dos genes *ANKRD26*, *HOXC5* e *PPAPDC2* e a Figura 3 dos genes *ZFPM1* e *ZFP90*.

Figura 2 – Conexões diferenciais negativas (DH) entre os genes expressos do grupo Alto e Baixo valor genético estimado para gordura intramuscular (GIM)



O ponto central representa o gene mais conectado, os pontos vermelhos representam as conexões positivas e as azuis as conexões negativas.

Figura 3 – Conexões diferenciais negativas (DH) entre os genes expressos do grupo Alto e Baixo valor genético estimado para gordura intramuscular (GIM)



O ponto central representa o gene mais conectado, os pontos vermelhos representam as conexões positivas e as azuis as conexões negativas.

Na análise RIF e PIF identificamos vários genes regulatórios candidatos: *GLI2* e *IGF2* (RIF1), *MPC1* e *UBL5* (RIF2) e uma série de pequenos RNAs, incluindo miR-1281 (PIF). Os genes identificados neste estudo são candidatos como reguladores da variação de GIM em bovinos, em que a maioria deles são relacionados a adipogênese, metabolismo lipídico e resposta inflamatória. Observamos também que as vias de sinalização do ácido retinóico, *IGF2* e *ANKRD26* são importantes reguladores de mecanismos moleculares relacionados ao conteúdo de GIM e adipogênese.

Com esta nova abordagem, nossos resultados mostraram-se importantes e inovadores para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com a deposição de GIM bem como do equilíbrio energético no músculo, contribuindo para as áreas de produção animal e saúde animal e humana em relação às doenças metabólicas que são diretamente ligadas à deposição e metabolismo lipídico. No entanto ainda tínhamos como alvo dos nossos estudos a composição diferencial dos ácidos graxos e a expressão diferencial entre os animais que apresentaram diferente perfil de ácidos graxos no músculo esquelético.

Assim, um novo estudo foi desenhado e realizado, tendo como objetivo entender a expressão gênica diferencial entre grupos de animais com valores de GEBV extremos para perfil de ácidos graxos (CESAR et al., 2016). Foram selecionados sete ácidos graxos com base na importância biológica e sensorial dos mesmos, são eles: AL, ácido esteárico (AE), EPA, ácido DHA, ácido palmítico (AP), AO e ácido linoleico conjugado cis9 trans11 (CLA-c9t11).

A análise diferencial do transcriptoma do músculo esquelético não revelou genes diferencialmente expressos (GDE, FDR 10%) para amostras com valores extremos para AL e AE e ácido esteárico, para EPA foram identificados cinco GDE, para DHA quatro GDE, para AP 123 GDE, para AO 1.134 GDE e para CLA-c9t11 872 GDE.

A anotação funcional e o enriquecimento funcional a partir da lista de GDE para extremos de AO identificou genes importantes, vias canônicas e reguladores a montante, como *SCD*, *PLIN5*, *UCP3*, *CPT1*, *CPT1B*, fosforilação oxidativa, disfunção mitocondrial, *PPARGC1A* e *FOXO1*. E a partir da lista de GDE para CLA-c9t11 dois genes importantes associados ao metabolismo lipídico, o gene expressão e câncer, especificamente, o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e *RNPS* responsável por modificação pós-transcricional de RNA que contém ribonucleoproteínas.

Nesse estudo foi possível verificar o envolvimento efetivo do AO e CLA-c9t11 em processos de regulação da transcrição, isso foi verificado justamente pelo grande número de GDE entre os grupos extremos para estes dois ácidos graxos e o enriquecimento funcional revelando vias metabólicas com a participação de fatores de transcrição. No entanto, sabe-se que existem as regulações pós-transcricionais que afetam diretamente a síntese e abundância das proteínas responsáveis pela homeostase e funcionamento do organismo vivo. Outro estudo com a mesma abordagem (BERTON et al., 2016) mostraram resultados semelhantes aos resultados de Cesar et al. (2016), confirmando o importante papel dos ácidos graxos na regulação da expressão gênica, doenças metabólicas e nos processos de inflamação e resposta inflamatória.

O grupo realizou ainda estudos de expressão gênica diferencial para outras características de interesse econômico como área de olho do lombo, eficiência alimentar e espessura de gordura em animais da raça Nelore (SILVA-VIGNATO et al., 2017, 2019; OLIVEIRA et al., 2018b). E estes estudos contribuíram para o melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos com metabolismo de lipídios e o quanto são complexas e relacionadas com processos pleiotrópicos, uma vez que estas características se revelarem correlacionadas a partir dos resultados das análises de enriquecimento

funcional de cada uma delas e das análises de co-expressão (SILVA-VIGNATO et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018b).

Pensando nesta correlação e na regulação pós-transcricional, mais uma etapa do Dogma Central da Biologia Molecular, nosso grupo realizou mais alguns estudos com foco no nível de expressão dos miRNA e integração de dados seguindo ainda abordagem de biologia de sistemas. Os miRNA são altamente conservados entre as espécies e um dos grupos dos pequenos RNA com papel de regulação pós-transcricional. Assim os próximos estudos serão de expressão diferencial de miRNA em animais com valores extremos de GIM e ácidos graxos bem como a integração dos dados de RNAm e miRNA.

2.3 Uso da ferramenta de sequenciamento de miRNA total e integração de dados genômicos para identificação de biomarcadores candidatos

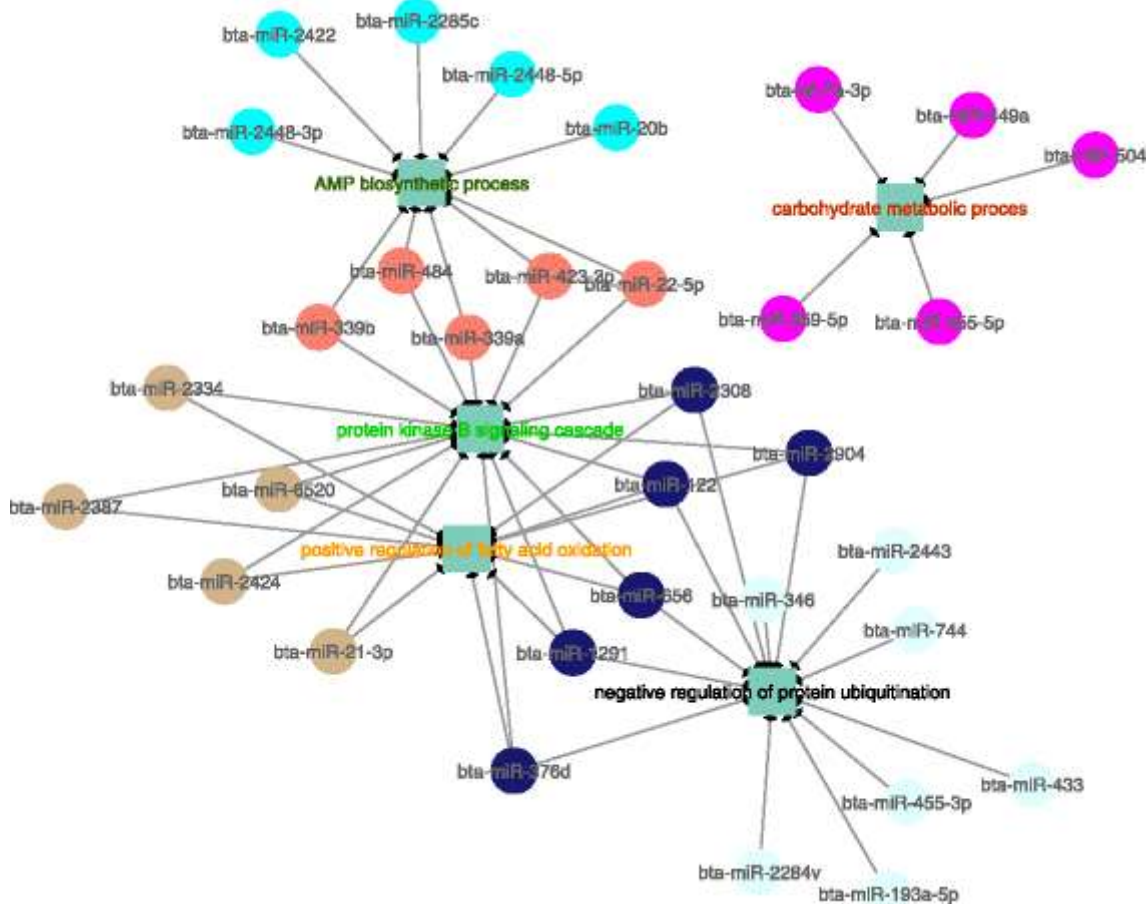
Nos estudos de expressão diferencial e integração de dados foram utilizados dados de sequenciamento de miRNA e RNAm dos animais com valores extremos de GEBV para GIM (alto (A) e baixo (B)). Sabendo-se que os miRNA são RNA endógenos não codificantes (ncRNA) com um tamanho aproximado de 22 nucleotídeos (BARTEL, 2004), e capazes de modularem a expressão de genes no nível pós-transcricional, procuramos neste estudo entender a relação miRNA e RNAm associando-se à deposição de GIM no músculo esquelético de bovinos da raça Nelore. Uma vez que a deposição de GIM interfere nas preferências sensoriais e de saúde dos consumidores e que pode estar relacionada com doenças metabólicas.

Os miRNA desempenham um papel importante na regulação gênica pós-transcricional em muitos tecidos e estão associados ao controle de vários processos biológicos importantes relacionados ao metabolismo lipídico (COUTINHO et al., 2007). Apesar do seu papel bem conhecido como regulador pós-transcricional, ainda não se conhece o seu impacto nos processos biológicos como a lipogênese e adipogênese. Se identificados miRNA reguladores candidatos relacionados com esses processos biológicos, os mesmos podem ser considerados potenciais biomarcadores para variações na deposição de GIM, por exemplo.

Assim, nossa primeira abordagem científica foi utilizar duas metodologias de biologia de sistemas, *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA) e *Partial Correlation with Information Theory* (PCIT) para identificar possíveis miRNA biomarcadores e vias metabólicas impactadas pelos mesmos. A partir dessa abordagem

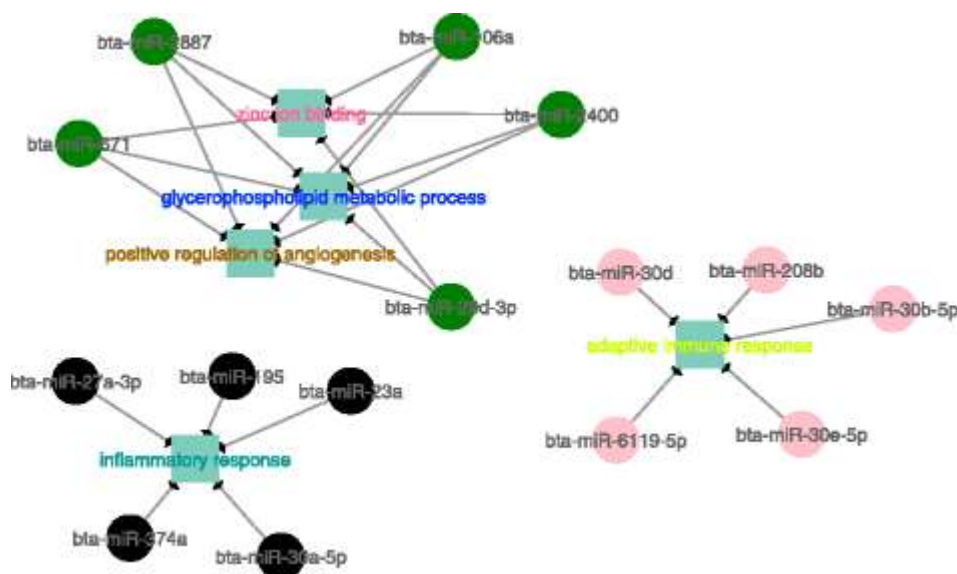
foram identificados miRNA reguladores candidatos associados à deposição de GIM. Os resultados encontrados por meio das análises de co-expressão contribuíram para a compreensão de potenciais mecanismos regulatórios de redes de sinalização gênica envolvidas nos processos de deposição de gordura medidos no músculo esquelético. E o enriquecimento funcional a partir dos resultados revelaram o metabolismo da glicose e os processos inflamatórios como as principais vias enriquecidas (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – As redes de co-expressão mostram a correlação negativa entre miRNAs e processos biológicos enriquecidos em módulos de RNAm no grupo GEBV de baixo IMF



Os círculos coloridos representam os miRNA hub, com maior conectividade, dentro de cada módulo e os quadrados representam os termos GO associados a cada módulo de RNAm, representados por letras de cores diferentes.

Figura 5 – Redes de co-expressão mostrando a correlação negativa entre miRNA e processos biológicos enriquecidos em módulos de RNAm no grupo GEBV de alto IMF



Os círculos coloridos representam os miRNA hub, com maior conectividade, dentro de cada módulo e os quadrados representam os termos GO associados a cada módulo de RNAm, representados por letras de cores diferentes.

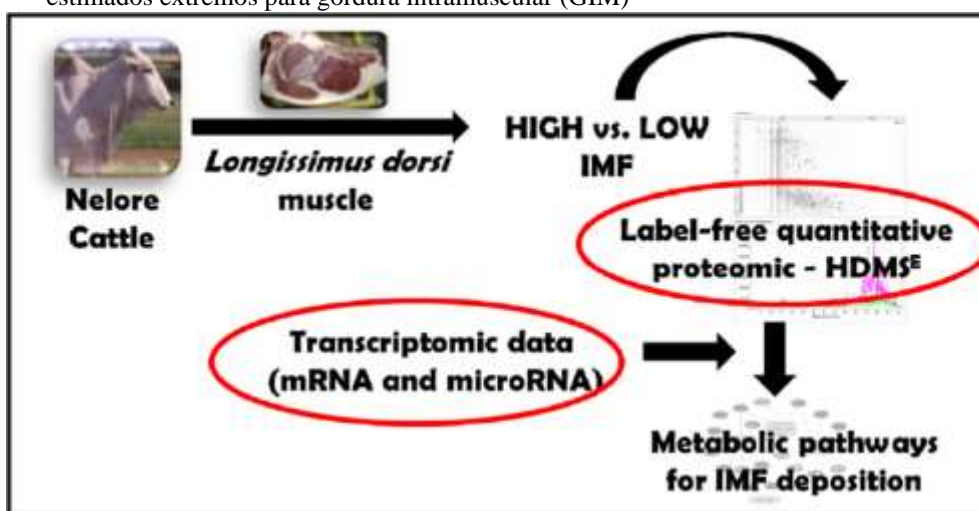
Outra análise de integração de dados genômicos foi realizada, no entanto, desta vez incluindo informações de SNP e abundância de proteínas (POLETI et al., 2018) associando-as ao perfil de ácidos graxos do músculo esquelético (CARDOSO et al., 2021). Este estudo por sua vez, trouxe resultados importantes e que foram verificados também em relação à síntese proteica. Foi verificada de forma sistemática a associação de miR-SNP com o perfil de ácidos graxos e foram identificados três miR-SNP candidatos, localizados no bta-miR-2419-3p, bta-miR-193a-2 e bta-miR-1291. Estes miRNA foram associados ao conteúdo de C12:0 e C18:1 cis-11, C18:3 n-6 e a razão n-6:n-3, PUFA e razão PUFA:SFA. Além disso, foi observado uma regulação candidata desses miR-SNP nas interações miRNA-RNAm com conseqüente efeito na expressão dos RNAm e na abundância das proteínas.

2.4 Aplicação da abordagem de proteômica para o estudo da abundância diferencial de proteínas e identificação de biomarcadores candidatos

Seguindo o Dogma Central da Biologia Molecular mais uma das moléculas apresentadas nesta proposta do dogma foi estudada, a proteína. Neste estudo, o objetivo principal foi caracterizar as mudanças no perfil proteômico do músculo esquelético em relação à deposição e composição da GIM em animais com GEBV extremos para GIM e

perfil de ácidos graxos, seguindo a mesma ideia experimental dos estudos anteriores. Nesse estudo foi utilizada a abordagem de integração de dados do transcriptoma e de quantificação da abundância de proteínas sem o uso de marcadores (do inglês, *label-free quantitative proteomic*) obtidos por meio da técnica de espectrometria de massas de alta definição (HDMS, do inglês, *High Definition Mass Spectrometry*). Na Figura 6 está representado o resumo gráfico desse estudo.

Figura 6 – Resumo gráfico do estudo de identificação de proteínas diferencialmente abundantes no músculo esquelético (*Longissimus dorsi*) entre os grupos de animais da raça Nelore com valores genéticos estimados extremos para gordura intramuscular (GIM)



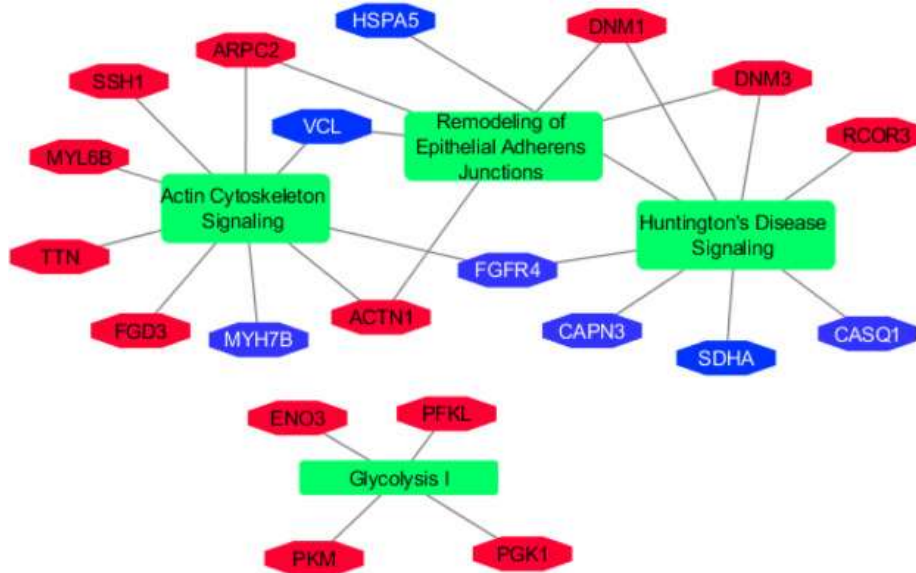
Fonte: POLETI et al., 2018.

No presente estudo foram identificados 19.922 peptídeos com erro < 5ppm, dos quais 9.110 eram peptídeos únicos. A partir dos peptídeos únicos foram identificadas 2.529 com uma média de 7 peptídeos por proteína, e por fim a partir desses dados 1.582 proteínas foram utilizadas na análise de abundância diferencial, apenas o filtro, proteínas presentes em pelo menos oito réplicas biológicas e identificadas com pelo menos dois peptídeos. Destas 1.582 proteínas quantificadas, 164 foram identificadas como proteínas diferencialmente abundantes (PDA, $p < 0,05$) entre os dois grupos de alto e baixo GEBV para GIM. Destas 83 proteínas foram reguladas negativamente e 81 reguladas positivamente no grupo de alto GEBV para GIM.

A análise de enriquecimento funcional a partir da lista de PDA identificou (p-valor ajustado < 0,05) quatro vias canônicas: Sinalização do citoesqueleto de actina; Remodelação da sinalização de junção de aderentes epiteliais; sinalização da doença se Huntington; e glicólise I (Figura 7). Mais uma vez os estudos com a abordagem da utilização das ferramentas da biologia molecular seguindo os princípios do Dogma

Central da Biologia Molecular mostraram vias metabólicas importantes do metabolismo lipídico e sua relação com doenças metabólicas, aqui em destaque para a doença neurodegenerativa Huntington e a via da glicólise.

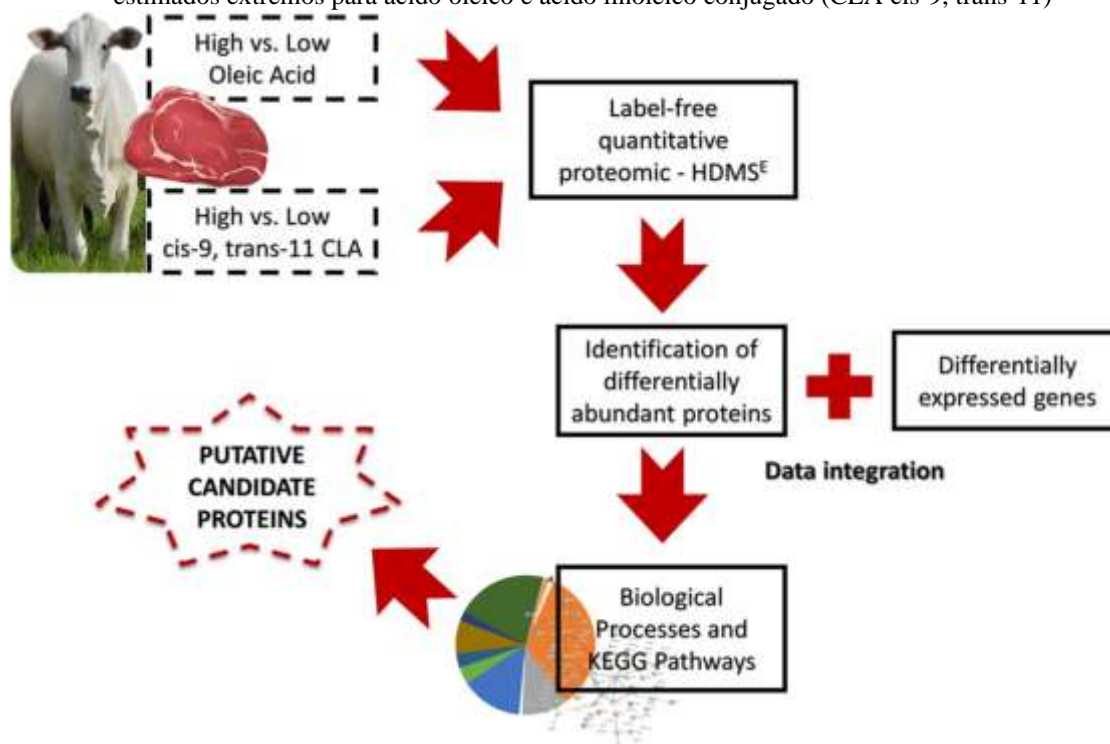
Figura 7 – Vias canônicas enriquecidas a partir da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos Alto vs. Baixo com base em valores genéticos estimados para gordura intramuscular



As formas verdes representam as vias enriquecidas, as formas azuis representam as proteínas mais abundantes no grupo Alto e as formas vermelhas representam as proteínas reguladas menos abundantes no grupo Alto.

No segundo estudo de Poletti et al. (2020) foram identificadas proteínas e sua relação com o perfil transcriptômico do músculo esquelético de animais com valores extremos de GEBV para perfil de ácidos graxos, especificamente para o AO e o CLA-c9t11. Na Figura 8, está representado o resumo gráfico do estudo.

Figura 8 – Resumo gráfico do estudo de identificação de proteínas diferencialmente abundantes no músculo esquelético (*Longissimus dorsi*) entre os grupos de animais da raça Nelore com valores genéticos estimados extremos para ácido oleico e ácido linoléico conjugado (CLA cis-9, trans-11)



Fonte: POLETI et al., 2020.

Neste estudo foram identificados para os grupos de animais com Alto e Baixo valores de AO e CLA cis-9, trans-11, 103 e 133 PDA, respectivamente. Destes 64 e 45 proteínas se apresentaram mais abundantes e 39 e 68 menos abundante para AO e CLA-c9t11, para o grupo Alto, respectivamente. A análise comparativa entre os dados proteômicos e transcriptômicos revelou oito e dez genes com consistência entre os níveis de expressão de RNAm e abundância de proteínas para AO e CLA-c9t11, respectivamente. As proteínas Miosina 1D não convencional (MYO1D), receptor de mineralocorticóide (NR3C2), subunidade alfa de geranylgeranyl transferase tipo 2 (RABGGTA) e autoantígeno uveal com domínios *coiled-coil* e repetições de anquirina (UACA) foram encontradas como proteínas candidatas para a deposição de AO. E as proteínas ácido graxo sintase (FASN), cadeia de tubulina alfa-4A (TUBA4A), vinculina (VCL), NADH desidrogenase 1 alfa sub-complexo 5 (NDUFA5) e subunidade pré-foldina 6 (PFDN6) foram encontradas como proteínas candidatas para a deposição CLA-c9t11.

Este estudo nos permitiu mais uma vez colaborar com a comunidade científica com achados importantes para o melhor entendimento do papel dos ácidos graxos, sejam eles como componentes nutricionais conferindo um perfil de lipídios com caráter mais

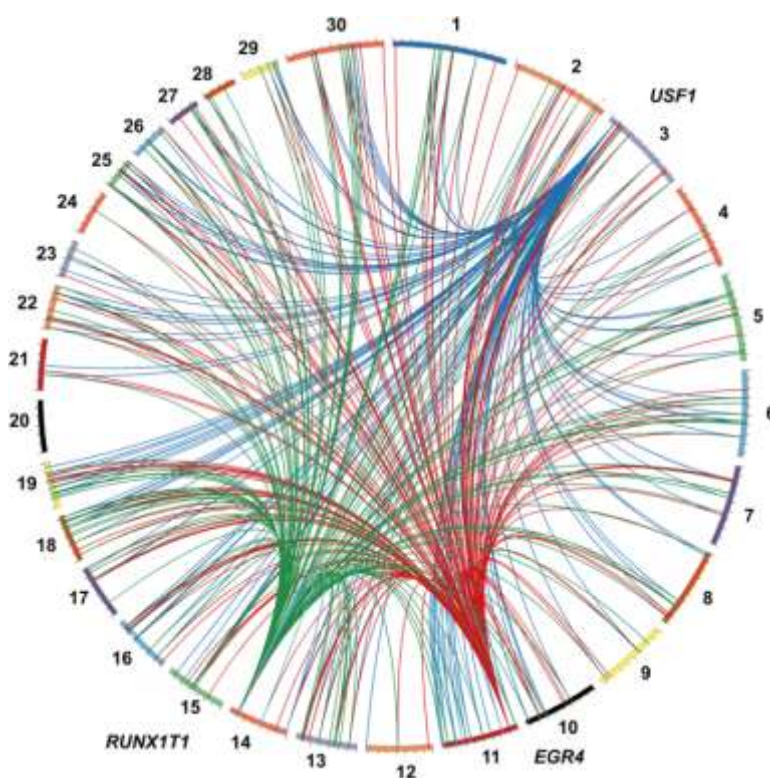
saudável ou como moléculas importantes e com funcionalidade em diversos processos biológicos envolvidos com metabolismos de lipídios, conseqüentemente com doenças metabólicas.

2.5 Aplicação de ferramentas da bioinformática e bioestatística para identificação de eQTL (*expression quantitative trait loci*)

Uma outra abordagem inovadora aplicada aos dados obtidos pelos estudos anteriores foi a identificação de locos quantitativos (*expression quantitative trait loci*, eQTL) distribuídos em todo o genoma associados ao transcriptoma ou nível de expressão gênica do conjunto total de genes expressos (nível detectável) no músculo esquelético. Para isso foi realizada a análise de associação entre os dados de genotipagem em larga escala (chip de SNP) e de expressão gênica (RNA-Seq). A partir dos resultados obtidos foram identificados os *hotspot* eQTL, ou seja, os marcadores do tipo SNP que afetaram a expressão do maior número de genes. Foram identificados nove hotspots eQTL localizados nos cromossomos BTA3 (8 Mb), BTA4 (108 Mb), BTA11 (11 Mb), BTA14 (73 Mb), BTA16 (59 Mb), BTA17 (55 Mb) e BTA28 (20 Mb, 32 Mb). Entre esses, três deles apresentam fatores de transcrição com sítios de ligação para os genes com nível de expressão afetada pelo genótipo do eQTL (BTA3 - rs110242967, BTA11 - rs135914685 e BTA14 - rs134095631). Estes FT foram pesquisados dentro de uma região de quatro megabases da sua localização, dois megabases antes e depois da localização de cada um destes eQTL (Figura 9). Esses três FT foram identificados nos cromossomos BTA 3, 11 e 14, e são eles respectivamente, *USF1* (Upstream Transcription Factor 1), *EGR4* (Early Growth Response Protein 4) e *RUNX1T1* (RUNX1 partner transcriptional co-repressor 1).

Figura 9. Gráfico Circos de regiões de hotspot eQTL que contêm os fatores de transcrição (FT) *EGR4* (rs110242967), *RUNX1T1* (rs134095631) e *USF1* (rs135914685). Os traços coloridos do círculo representam cada cromossomo, enquanto as linhas coloridas mostram a associação entre as regiões que contêm os FT e os genes que foram associados a essas regiões de *hotspot* eQTL. As conexões da região *USF1* são mostradas em azul, as conexões da região *EGR4* são mostradas em vermelho e as conexões da região *RUNX1T1* são mostradas em verde.

Figura 9 – Gráfico Circos de regiões de hotspot eQTL que contêm os fatores de transcrição (FT) *EGR4* (rs110242967), *RUNX1T1* (rs134095631) e *USF1* (rs135914685)



Os traços coloridos do círculo representam cada cromossomo, enquanto as linhas coloridas mostram a associação entre as regiões que contêm os FT e os genes que foram associados a essas regiões de *hotspot* eQTL. As conexões da região *USF1* são mostradas em azul, as conexões da região *EGR4* são mostradas em vermelho e as conexões da região *RUNX1T1* são mostradas em verde.

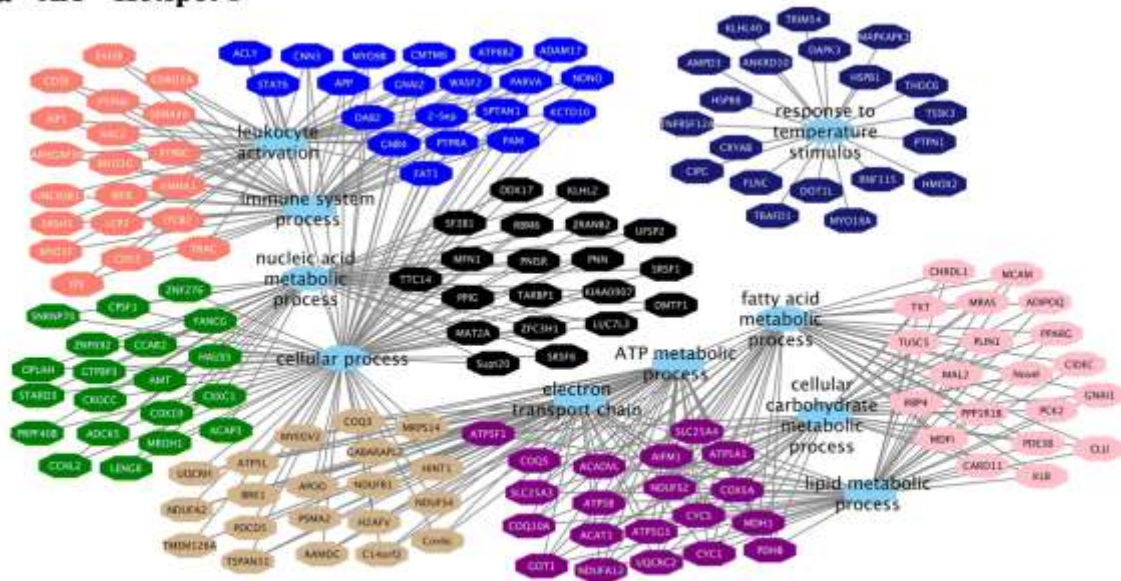
Com o interesse de entender o perfil de expressão dos genes entre os diferentes genótipos destes eQTL, foi realizada ainda nesse estudo a análise de co-expressão gênica e correlação com as características de deposição e composição de ácidos graxos do músculo esquelético, a partir da abordagem do WGCNA apresentada anteriormente no item 2.3 desta tese. O enriquecimento funcional dos *clusters* (conjunto de genes co-expressos) associados a estas características para cada genótipo dos três eQTL, mostrou

processos biológicos relacionados a metabolismo e biossíntese de lipídios, assim como regulação de sinais de tradução, diferenciação celular, resposta imune e metabolismo da glicose (Figuras 10, 11 e 12). Devido ao baixo número de animais com o genótipo recessivo ou de menor frequência na população (BB), neste estudo foram analisadas as diferenças entre o homocigoto de maior frequência e o heterocigoto (AA e AB).

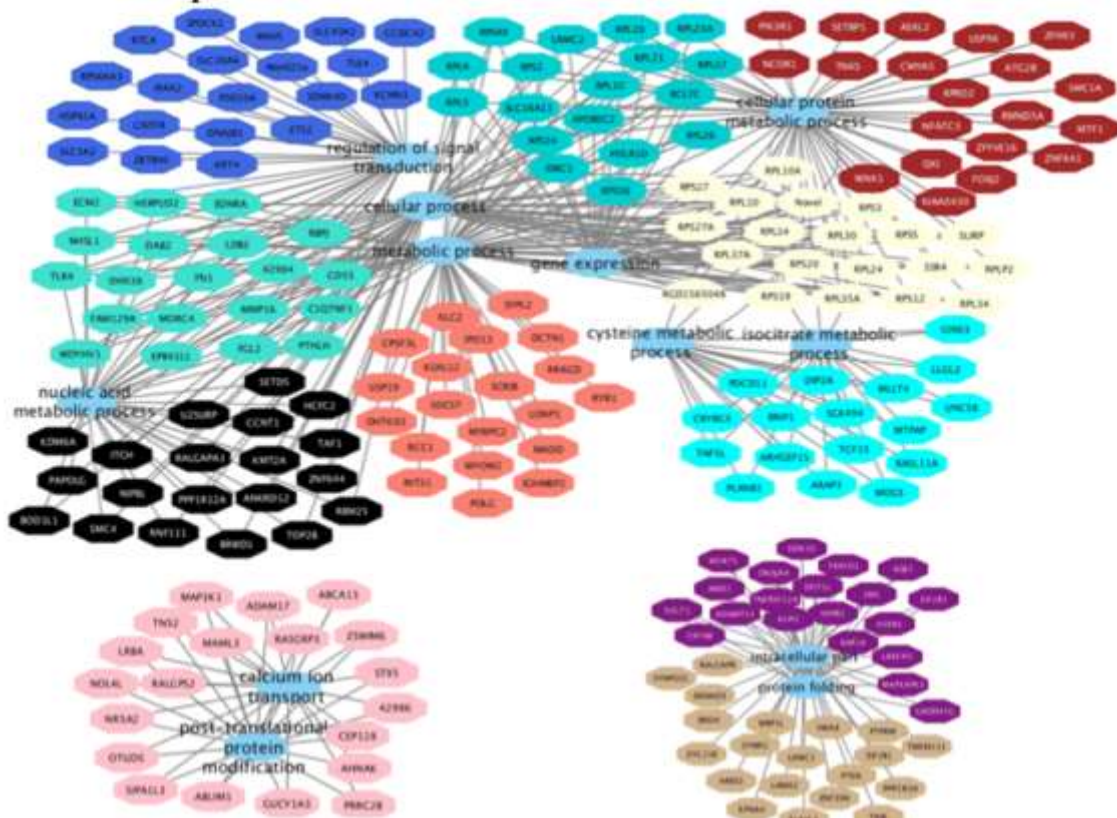
Neste estudo, foi possível a identificação de diferentes regiões ao longo do genoma que afetam o nível de expressão gênica (expressão de loci de características quantitativas, eQTL) e que se sobrepõem às regiões de QTL associadas à deposição e composição de GIM. Algumas dessas regiões abrigam fatores de transcrição e controlam a expressão de vários genes (*hotspots*). Assim, os resultados obtidos suportam a hipótese de que a análise de eQTL pode ser usada para identificar regiões reguladoras candidatas assim como de fatores de transcrição associados a importantes características fenotípicas que são controladas pela modulação do perfil de expressão gênica.

Figura 10 – Redes de co-expressão e principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA3 (rs110242967)

a - AA – Hotspot 1



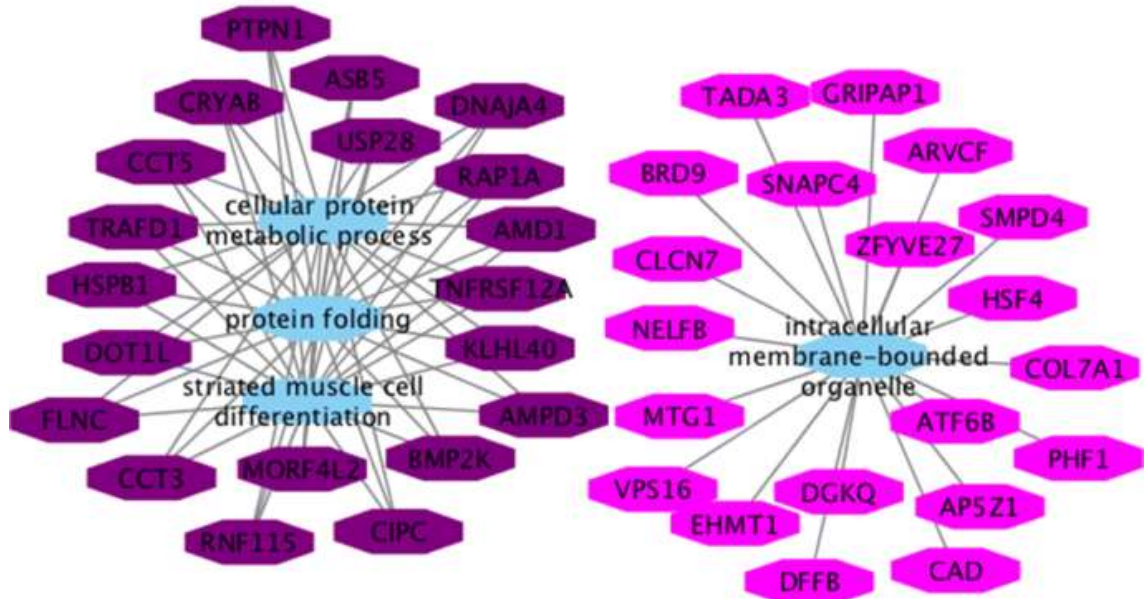
b - AB – Hotspot 1



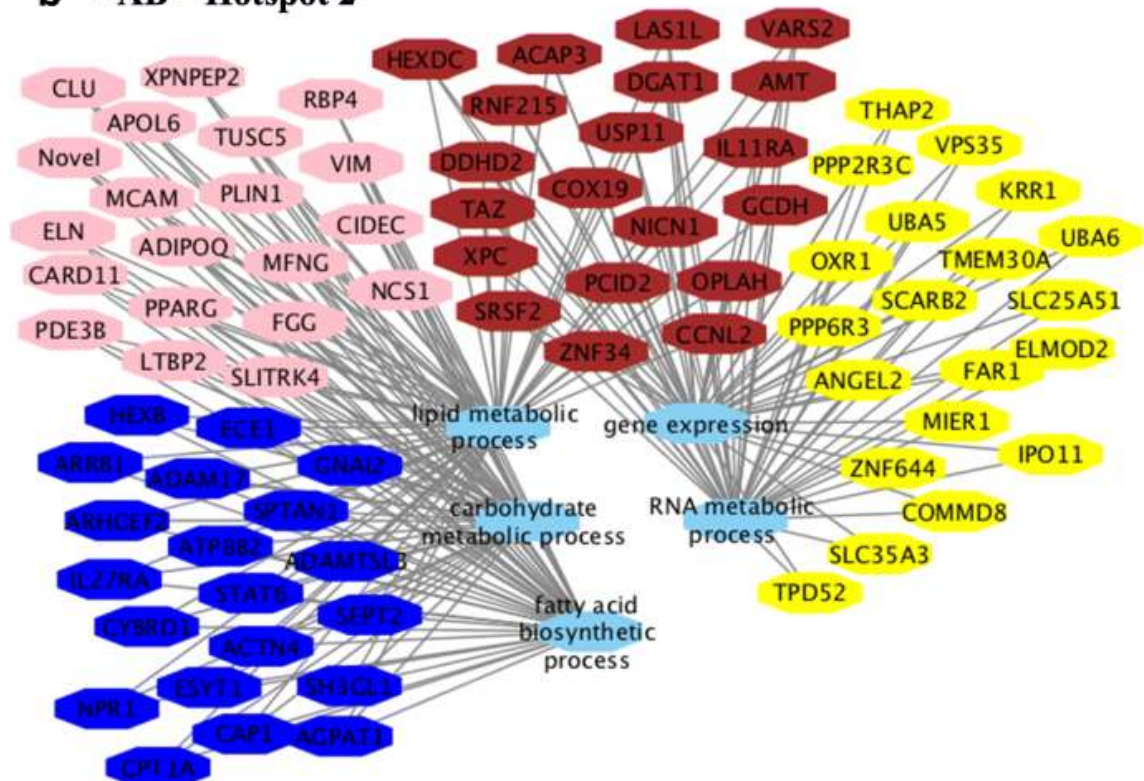
As redes de co-expressão mostram os 20 principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA3 (rs110242967) correlacionados (p -valor $< 0,10$) com pelo menos três características diferentes associadas à deposição e composição lipídica no músculo esquelético de animais da raça Nelore. Os octógonos coloridos representam os genes *hub* dentro de cada módulo e os octógonos azuis representam os processos biológicos associados (FDR 5%) aos genes.

Figura 11 – Redes de co-expressão dos principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA11 (rs135914685)

a - AA – Hotspot 2

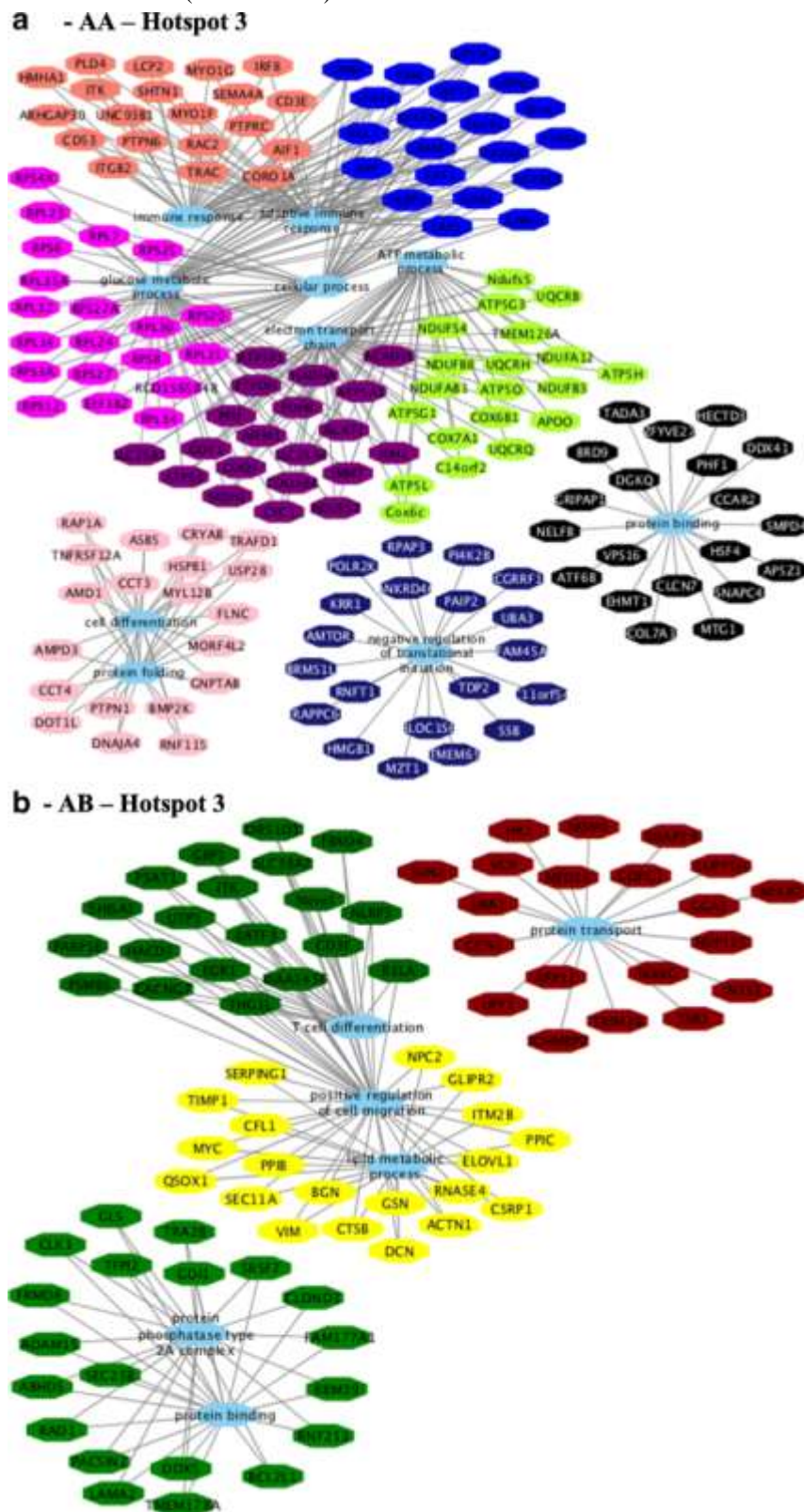


b - AB – Hotspot 2



As redes de co-expressão mostram os 20 principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA11 (rs135914685) correlacionados (p -valor $< 0,10$) com pelo menos três características diferentes associadas à deposição e composição lipídica no músculo esquelético de animais da raça Nelore. Os octógonos coloridos representam os genes *hub* dentro de cada módulo e os octógonos azuis representam os processos biológicos associados (FDR 5%) aos genes.

Figura 12 – Redes de co-expressão dos principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA14 (rs134095631)



As redes de co-expressão mostram os 20 principais genes hub dos módulos AA (a) e AB (b) do *hotspot* localizado no BTA14 (rs134095631) correlacionados (p -valor $< 0,10$) com pelo menos três características diferentes associadas à deposição e composição lipídica no músculo esquelético de animais da raça Nelore. Os octógonos coloridos representam os genes *hub* dentro de cada módulo e os octógonos azuis representam os processos biológicos associados (FDR 5%) aos genes.

Assim, as questões sobre a associação entre a ingestão de carne e a incidência de doenças em humanos continuam estimulando os cientistas a buscarem uma melhor compreensão dos processos biológicos associados às diferenças na deposição e composição da gordura intramuscular. Diante de todos os trabalhos desenvolvidos e apresentados até esse momento, os resultados contribuirão para o melhor entendimento do papel dos ácidos graxos, no entanto, diante de novas descobertas mais questões são levantadas (o que impulsiona a pesquisa). Foi possível ver uma associação dos ácidos graxos com vias metabólicas e de biossíntese dos ácidos graxos, com resposta imune, inflamação e doenças metabólicas principalmente neurodegenerativas. Então, a próxima questão levantada por nós foi: como será o comportamento dos processos biológicos envolvidos com a deposição e composição dos ácidos graxos em uma situação de dieta com diferentes fontes de ácidos graxos, em diferentes tecidos em animais modelo para doenças metabólicas em humanos e ao mesmo tempo animais de produção, em que temos interesse na qualidade sensorial e nutricional da sua carne?

2.6 Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticas nas características de interesse econômico na produção de suínos

Partindo da questão levantada pela equipe de pesquisa, surge a proposta de um novo projeto científico que daria o início da minha carreira como Jovem Pesquisadora, Jovem Docente e Investigador Principal (PI, do inglês, *Principal Investigator*). No ano de 2018, aprovei um projeto dentro do programa Jovem Pesquisador da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no mesmo ano em que aprovei um projeto Universal do CNPq e bolsa de produtividade na pesquisa do CNPq.

Nesta proposta, o objetivo principal foi identificar alterações no desempenho e consumo, no perfil do transcriptoma e dos ácidos graxos no músculo esquelético, fígado e cérebro; na qualidade da carcaça e carne; e no perfil imunológico de animais modelo para doenças metabólicas e de produção (suínos) alimentados com diferentes fontes de ácidos graxos dietéticas.

Esta pesquisa apresentou uma oportunidade para entender melhor as mudanças no perfil do transcriptoma de diferentes tecidos animais modelo para doenças metabólicas e de produção alimentados com diferentes fontes de ácidos graxos. Como os suínos são considerados animal modelo em diferentes estudos de doenças metabólicas humanas, este estudo se tornou de grande importância tanto para a produção animal quanto para a saúde

humana. Devido ao aumento da ocorrência de transtornos metabólicos, neurológicos e cardiovasculares em humanos, estudos para identificar nutrientes moleculares como imunorreguladores se tornaram prioritários. Este estudo tem proporcionado um avanço em nosso conhecimento sobre como diferentes nutrientes contribuem para a saúde animal e humana por meio das seguintes abordagens:

- 1) A análise dos níveis de expressão de RNAm em diferentes tecidos gerou conhecimento significativo sobre o papel das moléculas nutricionais, como os ácidos graxos, em vários processos biológicos;
- 2) Contribuiu para a quantificação das diferenças nos níveis de expressão de RNAm entre diferentes tecidos;
- 3) Identificou processos biológicos afetados pelas diferentes fontes de ácidos graxos e diferentes níveis na dieta;
- 4) Contribuirá para um melhor conhecimento sobre o uso dos ácidos graxos como imunonutrientes candidatos (análises ainda em andamento);
- 5) Contribuiu para um melhor conhecimento sobre a influência dos ácidos graxos sobre a qualidade da carcaça e carne, desempenho e eficiência alimentar dos animais;
- 6) Tem contribuído para o preenchimento de uma lacuna na fronteira da pesquisa na área da nutrigenômica no âmbito nacional e internacional.

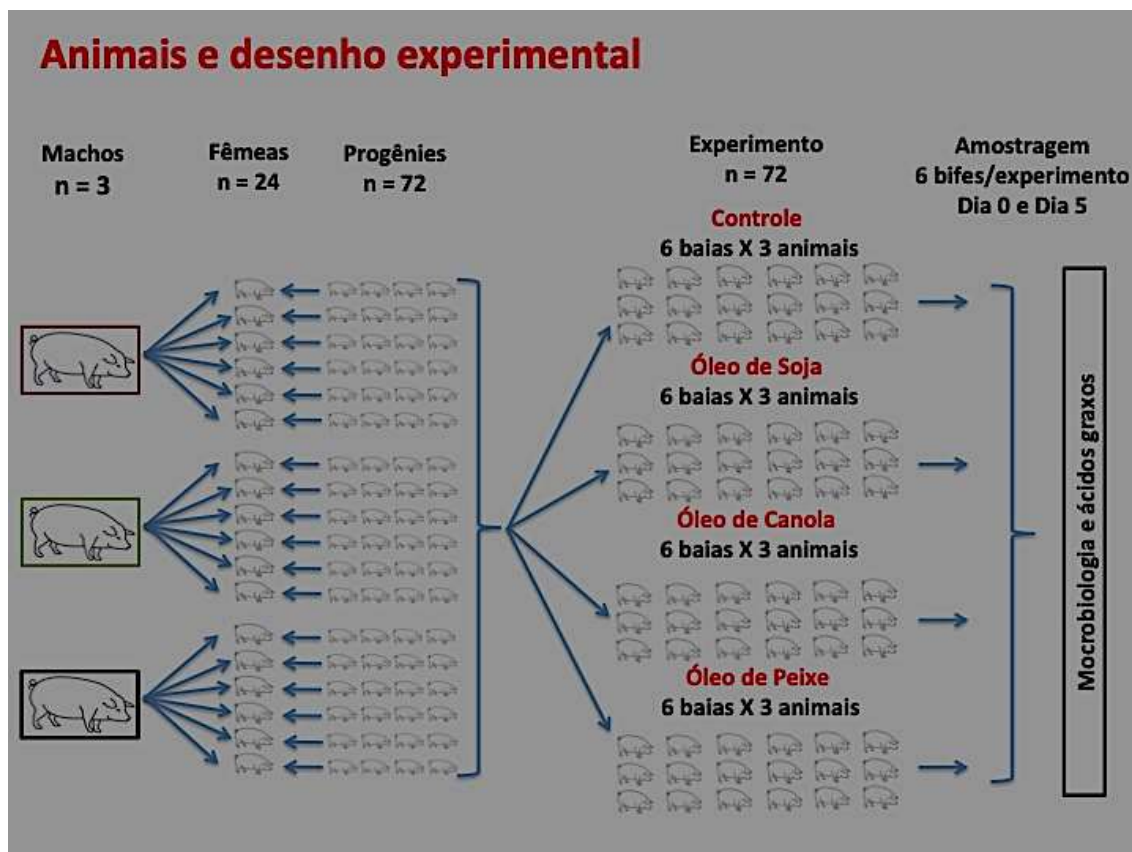
Este é o primeiro estudo que obteve dados de RNA-seq com alta cobertura e em três tecidos diferentes com aplicações na área de nutrigenômica e de produção animal para melhor entender o efeito do uso de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos nos perfis de expressão gênica e na resposta imunológica dos animais modelo. Novos conhecimentos estão sendo apresentados à comunidade científica. Até o momento, já foram realizados estudos para melhor compreender os efeitos do uso dos ácidos graxos nas características da carcaça e do perfil de ácido graxos da carne de suíno (MARTINS et al., 2015; ESTANY et al., 2017; LI et al., 2017), mas não em termos de nutrigenômica e doenças metabólicas em animal modelo.

O projeto tem permitido a colaboração entre pesquisadores de diferentes instituições e áreas, ocorrendo a nucleação e formação de um grupo com foco em nutrigenômica. Outro resultado importante deste projeto é a formação de pessoas em uma nova linha de pesquisa, a qual envolve abordagens e conhecimento na área de produção animal, nutrigenômica, biologia molecular, bioinformática e genômica funcional. Outro aspecto de grande potencial deste projeto é a identificação de marcadores moleculares

causais candidatos, marcadores moleculares funcionais, a consolidação da importância dos ácidos graxos como um imunonutriente, bem como, a identificação de vias metabólicas candidatas as quais podem ser foco da atuação de drogas. Dentro deste contexto, os resultados aqui já foram e serão obtidos possuem um perfil tecnológico e de inovação relevante uma vez que possam ser indicados como marcadores moleculares programas de seleção genômica (foco na produção animal e qualidade nutricional da carne), rastreabilidade, e diagnóstico molecular.

O desenho experimental do projeto que vem sendo desenvolvido com apoio financeiro da FAPESP; de infraestrutura pela ESALQ/USP, DB Genética de Suínos, FZEA/USP; e intelectual por parte dos pesquisadores colaboradores e alunos de graduação e pós-graduação envolvidos, está apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Desenho experimental do projeto



Projeto que vem sendo desenvolvido sob coordenação da Dr^a. Aline Silva Mello Cesar.

Com o objetivo de respondermos as questões levantadas sobre o efeito das diferentes dietas sobre o desempenho, consumo, características de qualidade da carcaça e da carne, sensorial da carne, perfil de ácidos graxos da carne e perfil da qualidade nutricional da carne dos animais modelo para produção de carne, os suínos, foram

realizadas as devidas medidas das características de interesse e os resultados foram apresentados à comunidade científica por meio das publicações de Almeida et al., 2021; Gomes et al., 2021; Silva et al., 2021 (Apêndice R).

A partir dos resultados obtidos, verificamos que as diferentes dietas contendo 3% de óleo de soja (SOY3.0), óleo de canola (CO) e óleo de peixe (FO) nas fases de crescimento e terminação dos suínos da raça *Large White*, não alteraram o desempenho, consumo e as características da carcaça e da carne. No entanto, o perfil de ácidos graxos foi afetado pelas diferentes dietas para a maioria dos ácidos graxos detectados na carne. Embora a adição de 3% de CO ou FO às dietas tenha proporcionado pequenos benefícios nutricionais aos consumidores em termos de teores de MUFA e n-3 PUFA de cadeia longa, respectivamente, a formulação de dietas de crescimento-terminação com 1,5% de óleo de soja (SOY1.5) foi adequada o suficiente em termos da composição dos ácidos graxos, apresentando boa qualidade nutricional para os consumidores. Em relação ao teste sensorial de aceitação da carne os participantes sinalizaram maior aceitação para a carne dos animais que foram alimentados com 3% SOY3.0, provavelmente devido à maciez melhorada.

Tabela 2 – Efeito do uso de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre as características de qualidade da carcaça e da carne de suínos em fase de crescimento e terminação¹

Item	Dietary treatment				Pooled SEM ²	P-value
	SOY1.5	SOY3.0	CO	FO		
Slaughter weight, kg	129.60	131.16	136.61	132.44	1.61	0.51
Hot carcass weight, kg	98.21	99.72	102.70	99.53	1.20	0.54
Cold carcass weight, kg	91.03	92.53	95.42	92.37	1.17	0.55
Hot dressing percent, ³ %	75.18 ^b	76.03 ^a	75.20 ^b	75.23 ^b	0.14	0.07
Cold dressing percent, ⁴ %	69.65 ^b	70.53 ^a	69.86 ^b	69.74 ^b	0.14	0.04
Shrink loss, ⁵ %	7.35	7.24	7.11	7.30	0.06	0.48
10th-rib backfat, mm	18.95	19.17	18.31	19.95	0.61	0.80
Lean percentage, ⁶ %	56.42	55.32	56.02	55.09	0.25	0.16
LL						
Area, cm ²	56.72	53.74	56.68	53.60	0.86	0.40
Intramuscular fat, %	1.94	2.63	2.19	2.65	0.19	0.34
pH at 45 minutes	6.24	6.33	6.24	6.27	0.02	0.39
pH at 24 hours	5.72	5.78	5.79	5.69	0.02	0.42
Drip loss, %	5.59	4.94	5.82	4.88	0.24	0.46
Cooking loss, %	18.71	17.89	19.09	17.74	0.46	0.47
Warner-Bratzler shear force, N	46.34 ^a	34.73 ^b	35.66 ^b	40.81 ^{ab}	0.18	0.05

¹Pigs ($n = 96$) were fed either a corn-soybean meal diet containing 1.5% soybean oil (SOY1.5; control) or diets containing 3% SOY3.0, canola oil (CO), or fish oil (FO). Values represent the least square means from a subset of pigs ($n = 72$; 18 pigs/treatment).

²Standard error of the least square means.

³Hot dressing percent = $\{(\text{hot carcass weight}/\text{slaughter weight})\} \times 100$.

⁴Cold dressing percent = $\{(\text{cold carcass weight}/\text{slaughter weight})\} \times 100$.

⁵Shrink loss = $\{1 - (\text{cold carcass weight}/\text{hot carcass weight})\} \times 100$ (James et al., 2013).

⁶Lean percentage = $\{[7.231 + (0.437 \times \text{hot carcass weight, lb.}) - (18.746 \times \text{10th-rib backfat, in.}) + (3.877 \times \text{LL area, sq. in.})]/\text{hot carcass weight, lb.}\} \times 100$ (Groesbeck et al., 2007).

^{a,b}Within a row, values without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tended to differ ($0.05 < P \leq 0.10$) using Tukey's method.

Fonte: ALMEIDA et al., 2021.

Tabela 3 – Efeito do uso de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos no perfil de ácidos graxos da carne de suínos em fase de crescimento e terminação¹

Item	Dietary treatment				Pooled SEM ²	P-value
	SOY1.5	SOY3.0	CO	FO		
Saturated fatty acid (SFA)						
Myristic acid (C14:0)	1.14	1.19	1.21	1.24	0.01	0.11
Palmitic acid (C16:0)	25.50 ^b	25.01 ^b	24.70 ^b	26.43 ^a	0.21	<0.01
Stearic acid (C18:0)	12.02 ^b	11.89 ^b	11.04 ^c	12.63 ^a	0.15	<0.01
Monounsaturated fatty acid (MUFA)						
Palmitoleic acid (C16:1)	2.86 ^b	3.17 ^a	3.05 ^{ab}	3.26 ^a	0.05	0.04
Oleic acid (C18:1 n-9)	38.92 ^b	44.60 ^a	44.95 ^a	40.33 ^b	0.64	<0.01
Eicosenoic acid (C20:1 n-9)	0.51	0.56	0.58	0.56	0.01	0.21
Polyunsaturated fatty acid (PUFA)						
Linoleic acid (C18:2 n-6)	17.90 ^a	12.96 ^b	13.33 ^b	13.83 ^b	0.50	<0.01
Alpha-linolenic acid (C18:3 n-3)	0.80 ^a	0.54 ^b	0.53 ^b	0.59 ^b	0.03	<0.01
Eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3, EPA)	0.29 ^b	0.11 ^c	0.08 ^c	0.46 ^a	0.04	<0.01
Docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA)	0.36 ^b	0.14 ^c	0.09 ^c	0.61 ^a	0.05	<0.01
Total SFA	38.83 ^b	38.09 ^b	37.44 ^b	40.29 ^a	0.33	<0.01
Total MUFA	41.78 ^b	47.32 ^a	48.76 ^a	43.55 ^b	0.68	<0.01
Total PUFA	18.91 ^a	13.74 ^b	13.97 ^b	15.60 ^b	0.54	<0.01
Total n-3 PUFA ³	1.01 ^a	0.70 ^b	0.64 ^b	1.39 ^a	0.08	<0.01
Total n-6 PUFA ⁴	17.90 ^a	12.96 ^b	13.33 ^b	13.83 ^b	0.50	<0.01
PUFA:SFA ratio ⁵	0.46 ^a	0.36 ^b	0.37 ^b	0.38 ^b	0.01	<0.01
n-6:n-3 PUFA ratio ⁶	18.98 ^a	18.93 ^a	21.67 ^a	11.87 ^b	0.92	<0.01
Iodine value ⁷	69.12 ^a	65.41 ^b	66.49 ^b	64.49 ^b	0.59	0.02
Atherogenic index ⁸	0.50 ^b	0.49 ^b	0.48 ^b	0.53 ^a	0.01	0.02

¹Pigs ($n = 96$) were fed either a corn-soybean meal diet containing 1.5% soybean oil (SOY1.5) or diets containing with 3% SOY3.0, canola oil (CO), or fish oil (FO). Values represent the least square means from a subset of pigs ($n = 72$; 18 pigs/treatment).

²SEM = standard error of the least square means.

³Total n-3 PUFA = {[C18:3 n-3] + [C20:5 n-3] + [C22:6 n-3]}.

⁴Total n-6 PUFA = C18:2 n-6.

⁵PUFA:SFA ratio = total PUFA/total SFA.

⁶ Σ n-6/ Σ n-3 PUFA ratio.

⁷Iodine value = $(0.95 \times [C16:1]) + (0.86 \times [C18:1]) + (1.732 \times [C18:2]) + (2.616 \times [C18:3]) + (0.785 \times [C20:1])$, where brackets indicate concentrations (AOCS, 1998; Method Cd 1c-85).

⁸Atherogenic index = $(4 \times [C14:0]) + (C16:0)/(\text{total MUFA} + [\text{total PUFA}])$, where brackets indicate concentrations (Ulbricht and Southgate, 1991).

^{a-c}Within a row, values without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tended to differ ($0.05 < P \leq 0.10$) using Tukey's method.

Fonte: ALMEIDA et al., 2021.

O perfil de ácidos graxos da carne observado de forma geral diferenciado entre as dietas mostra a importância dos programas nutricionais na produção animal,

principalmente de animais monogástricos. Assim, uma melhor compreensão das alterações metabólicas que ocorrem com a inclusão alimentar dessas fontes de ácidos graxos e as vias de sinalização relacionadas podem otimizar esses programas nutricionais de suínos envolvendo fontes ou níveis diferentes para atender às exigências dos consumidores, principalmente nas questões de saúde, o que envolve a incidência de doenças metabólicas como a diabetes do tipo 2, obesidade e aterosclerose.

Os estudos de Gomes et al. (2021) e Silva et al. (2021), utilizando os dados deste mesmo projeto verificaram efeito das dietas com diferentes fontes de ácidos graxos sobre a maciez da carne e perfil de ácidos graxos no fígado e no cérebro, respectivamente.

2.7 Efeito de diferentes fontes e níveis de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de diferentes tecidos de animal modelo como o suíno

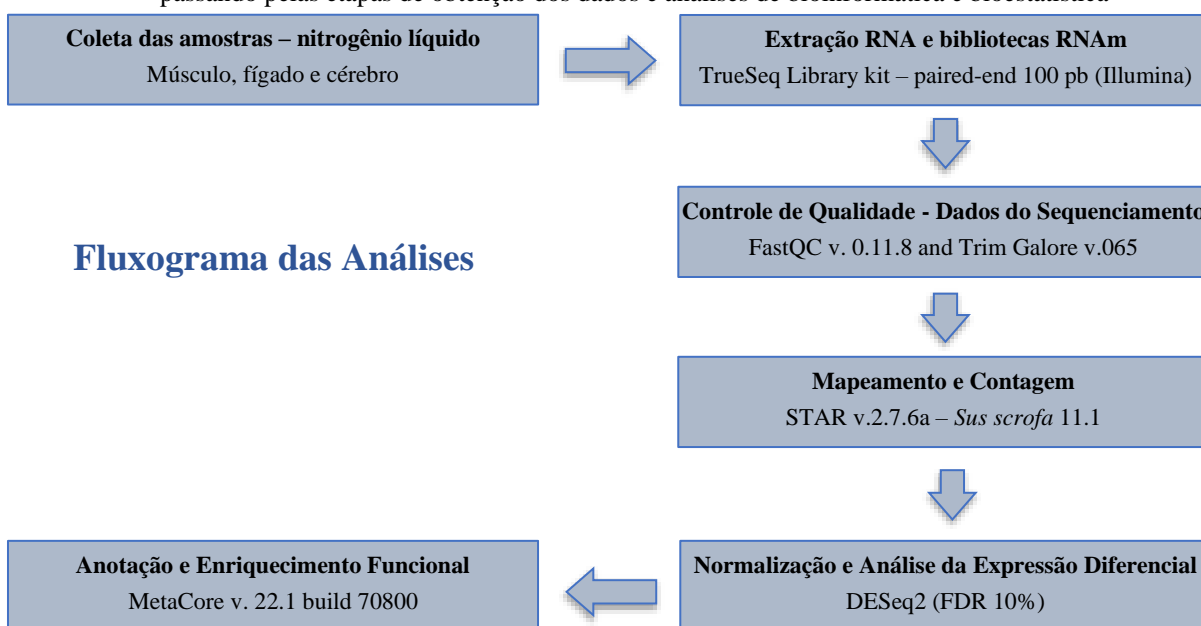
Os primeiros artigos referentes ao projeto Jovem Pesquisador (ALMEIDA et al., 2021, GOMES et al., 2021 e SILVA et al., 2021) confirmaram a hipótese de que a dieta com diferentes fontes de ácidos graxos modularia o perfil de ácidos graxos de diferentes tecidos (aqui especificamente, músculo, cérebro e fígado), mas não afetou a maior parte das características de interesse econômico avaliadas. Essas informações não são inovadoras (TEYE et al., 2006), mas um diferencial do nosso estudo é a utilização de uma população de machos imunocastrados, uma tendência mundial, diante das exigências de bem-estar animal, além da população apresentar a característica de raças magras por seleção genética.

Ainda existe uma lacuna no conhecimento sobre o efeito dos ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica e processos inflamatórios, uma vez que sabemos que são moléculas com importante papel na regulação de vias e processos metabólicos, além de estarem associados à processos inflamatórios e doenças metabólicas como a obesidade, uma doença inflamatória. Assim, para melhor entendermos o efeito dos ácidos graxos sobre o nível de expressão gênica ou do transcriptoma, coletamos no momento do abate amostras do músculo esquelético (*Longissimus dorsi*), do fígado e do cérebro dos animais utilizados no estudo de Almeida et al. (2021). Esses tecidos foram selecionados por serem importantes nos processos metabólicos dos lipídios e doenças metabólicas como obesidade, diabetes do tipo 2, inflamação do fígado e em doenças neurodegenerativas.

O RNA total destes tecidos foi extraído, as bibliotecas de RNAm foram construídas e estas por sua vez foram sequenciadas por meio da tecnologia de

sequenciamento de nova geração. Os detalhes dos procedimentos estão descritos em Fanalli (2022) e o pipeline de análise dos dados está apresentado na Figura 14. Em que a expressão diferencial foi realizada entre os dois níveis de óleo de soja na dieta (1,5 e 3%) e entre as combinações entre os diferentes óleos a 3% na dieta (soja, canola e peixe). Desta forma para cada análise de expressão gênica diferencial foram utilizados 18 animais para cada tratamento/dieta.

Figura 14 – Fluxograma das análises realizadas no estudo, iniciando pela coleta e extração do RNA, passando pelas etapas de obtenção dos dados e análises de bioinformática e bioestatística



2.7.1 Efeito de diferentes níveis de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo)

A primeira hipótese testada por nós foi que diferentes níveis de óleo de soja (1,5% SOY1.5 ou 3,0% SOY3.0) na dieta de suínos machos imunocastrados fornecida durante as fases de crescimento e terminação afetam o perfil do transcriptoma do tecido muscular esquelético e do fígado, o qual afeta os processos biológicos envolvidos com doenças metabólicas e a resposta inflamatória.

O óleo de soja é uma fonte de ácidos graxos insaturados (do inglês, *Unsaturated Fatty Acid*, UFA) muito utilizado na alimentação humana e animal, então os objetivos do nosso primeiro estudo de nutrigenômica foram avaliar as mudanças no nível de expressão gênica dos tecidos muscular esquelético e hepático, e identificar vias metabólicas e redes gênicas impactadas pela composição de ácidos graxos diante dos diferentes níveis de óleo

de soja adicionados na dieta dos suínos (1,5 %, SOY1.5 vs 3,0%, SOY3.0). Para isso, utilizamos os dados de sequenciamento de RNAm (RNA-Seq) de 35 amostras de tecido hepático (SOY1.5, n=17 e SOY3.0, n=18) e 36 amostras de músculo esquelético (SOY1.5, n=18 e SOY3.0, n=18) de suínos da raça *Large White*. O pipeline de análises de bioinformática, bioestatística e de enriquecimento funcional utilizado está representado na Figura 14.

A análise do transcriptoma do músculo esquelético revelou 45 genes diferencialmente expressos (DEG, FDR 10%), e a análise de enriquecimento funcional (FDR < 0,10) identificou mapas de rede relacionados à inflamação, processo imunológico, apoptose, estimulação da degradação lipídica em adipócitos e vias associadas ao metabolismo de triacilglicerol e ao estresse oxidativo na síndrome dos adipócitos na diabetes tipo 2 e disfunção metabólica da via X (Tabela 4).

Tabela 4 – Mapas de vias biológicas identificadas pelo *software* MetaCore (valor p nominal < 0,1) a partir da lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no músculo esquelético de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5% e 3,0% de óleo de soja)

Pathway maps	p-value	DEG ¹
Fatty Acid Omega Oxidation	3,33E-02	AL3A2
Leukotriene 4 biosynthesis and metabolism	4,42E-02	AL3A2
<i>TNF-alpha</i> , <i>IL-1</i> beta induces dyslipidemia and inflammation in obesity and type 2 diabetes in adipocytes	4,64E-02	AZGP1
Breakdown of CD4+ T cell peripheral tolerance in type 1 diabetes mellitus	5,39E-02	CD4
Triacylglycerol metabolism p.1	6,56E-02	AL3A2
Oxidative stress in adipocyte dysfunction in type 2 diabetes and metabolic syndrome X	6,99E-02	AL3A2
Peroxisomal branched chain fatty acid oxidation	9,08E-02	AL3A2

¹ Genes diferencialmente expressos (do inglês, *Differentially Expressed Genes*, DEG).

Fonte: FANALLI et al., 2022.

O gene *AL3A2* codifica para a enzima AL3A2, a qual auxilia na desintoxicação de aldeídos produzidos pelo metabolismo do álcool e peroxidação lipídica, no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico e na oxidação de aldeídos alifáticos de cadeia longa em ácido graxo (STELZER et al., 2016). Este gene participa da oxidação do ácido 12-oxo-dodecanóico a ácido dodecanodióico pela ativação de um mecanismo de catálise (KELSON; SECOR MCVOY; RIZZO, 1997). Este gene também participa da via “biossíntese e metabolismo do leucotrieno 4”, onde o Leucotrieno E4 é formado por uma família de mediadores lipídicos inflamatórios e sintetizado a partir do ácido araquidônico (AA) através de uma diversidade de células, como basófilos, mastócitos, eosinófilos, e macrófagos, sendo a etapa final de inativação no metabolismo

do Leucotrieno B4 (PETERS-GOLDEN; GLEASON; TOGIAS, 2006). O gene *AL3A2* também está envolvido no “metabolismo de triacilglicerol e no estresse oxidativo na disfunção de adipócitos no diabetes tipo 2” e na via da “síndrome metabólica X” (MASLOV et al., 2019).

No nosso estudo o *AL3A2* foi identificado como um GDE no músculo esquelético dos suínos alimentados com diferentes níveis de óleo de soja (1,5% vs 3%), o qual foi menos expresso no grupo SOY1.5 (log2foldchange -0,77). Diante da nossa hipótese de que os diferentes níveis de óleo de soja na dieta podem afetar o nível de expressão de *AL3A2*, o consumo de maiores níveis de óleo de soja pode estar associado a maiores taxas de oxidação lipídica e acúmulo de radicais livres nas células causando danos celulares e, conseqüentemente, um quadro inflamatório que levaria às doenças metabólicas como diabetes tipo 2 e aterosclerose (PAN et al., 2016, Figura 15). Esses resultados confirmam estudos anteriores que identificaram que as isoenzimas da aldeído graxo desidrogenase, como *AL3A2*, têm funções específicas em células associadas à inflamação, diferenciação ou respostas ao estresse oxidativo (BAZEWICZ et al., 2019; CHU et al., 2019)

Para o tecido hepático, a análise do transcriptoma revelou 281 GDE os quais participam de mapas de rede relacionados a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Hyntington (Tabela 5) de acordo com o enriquecimento funcional realizado pelo programa MetaCore (Clarivate analytics). Cinco mapas de vias biológicas diferentes foram detectados (valor p nominal < 0,10), os quais estão ligados a BAG chaperone 1 (*BAG-1*), ST13 Hsp70 Interacting Protein (Hip), Microtubule Associated Protein Tau (*MAPT*), grupo de não-cadeias leves alcalinas fosforiláveis de Miosina II (*MELC*), Proteína Fosfatase 2 Catalítica (*PP2C*), Adenina nucleotídeo translocases Grupo de proteína (ANT), Peptidilprolil Isomerase F (*PPIF*) e genes inibidores de quinase dependentes de ciclina 1A (*CDKN1A* ou *p21*).

Tabela 5 – Mapas de vias biológicas identificadas pelo *software* MetaCore (valor p nominal < 0,1) a partir da lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no músculo hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5% e 3,0% de óleo de soja)

MAPS	pVALUE	DEG ¹
HSP70 and HSP40-dependent folding in Huntington's disease	1.034e-2	<i>BAG-1</i> , <i>ST13 (Hip)</i>
Inhibition of remyelination in multiple sclerosis: regulation of cytoskeleton proteins	3.022e-2	<i>MAPT</i> , <i>MELC</i>
Tau pathology in Alzheimer disease	4.543e-2	<i>MAPT</i> , <i>PP2C</i>
Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases	5.153e-2	<i>ANT</i>
Dual role of <i>p53</i> in transcription deregulation in Huntington's Disease	7.179e-2	<i>p21</i>

¹ Genes diferencialmente expressos (do inglês, *Differentially Expressed Genes*, DEG).

Fonte: FANALLI et al., 2022.

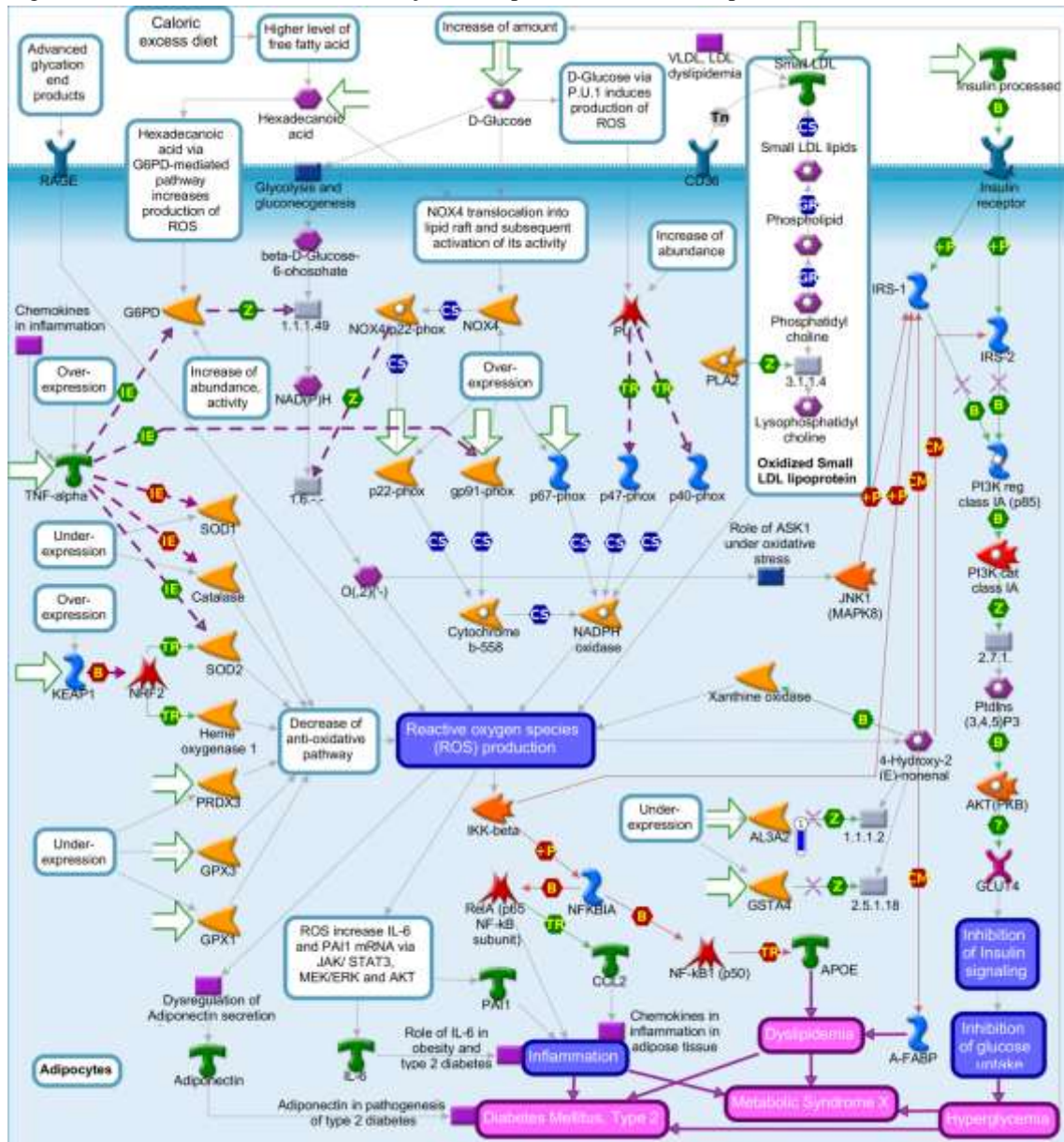
Os nossos achados corroboram com informações já publicadas sobre o papel fundamental do fígado no equilíbrio energético de todo o corpo, o qual remove toxinas como a amônia e é responsável pela desintoxicação da maioria dos compostos tóxicos endógenos e exógenos. Quando algum mecanismo hepático falha, causa problemas que podem atingir outros órgãos, por exemplo, o cérebro, afetando a função cerebral e causando diversas doenças neurodegenerativas, incluindo Huntington e Alzheimer (FELIPO, 2013; CARROLL et al., 2015). Na doença de Huntington (DH), a maioria dos sintomas está relacionada a danos neuronais, embora anormalidades adicionais do tecido periférico, como deficiência do metabolismo energético, atrofia do músculo esquelético e disfunção do tecido adiposo, tenham sido relatadas em humanos e camundongos com DH (CHIANG; CHERN; JUO, 2011). Em camundongos, os agregados da proteína Htt mutante resultante (mHtt) foram encontrados a partir do modelo de camundongo transgênico, mHtt está relacionado com a supressão do fator de transcrição C/EBP α (TF crítico para a homeostase energética) e a função da proteína PPAR γ , há uma evidência de que defeitos na função hepática podem contribuir para anormalidades periféricas em camundongos em HD (CHIANG et al., 2011).

Neste contexto, um dos GDE identificado no fígado de suínos alimentados com diferentes níveis de óleo de soja (1,5 vs 3%) foi o peptidilprolil isomerase F (*PPIF*), membro da família peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase), o qual foi mais expresso (log2foldchange +0,81) no grupo SOY1.5. Na via de disfunção mitocondrial na doença neurodegenerativa (Figura 16), o GDE *PPIF* está ligado ao gene *ANT*. O *PPIF* faz parte do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) da membrana interna da mitocôndria (STELZER et al., 2016). Existem evidências de que essa ativação de poros de transição pode estar relacionada à indução de morte celular por necrose e apoptose. As

PPIases são responsáveis por catalisar a isomerização *cis-trans* de ligações peptídicas imídicas de prolina em oligopeptídeos e com isso auxiliar no enovelamento de proteínas (DAVIS et al., 2010; STELZER et al., 2016).

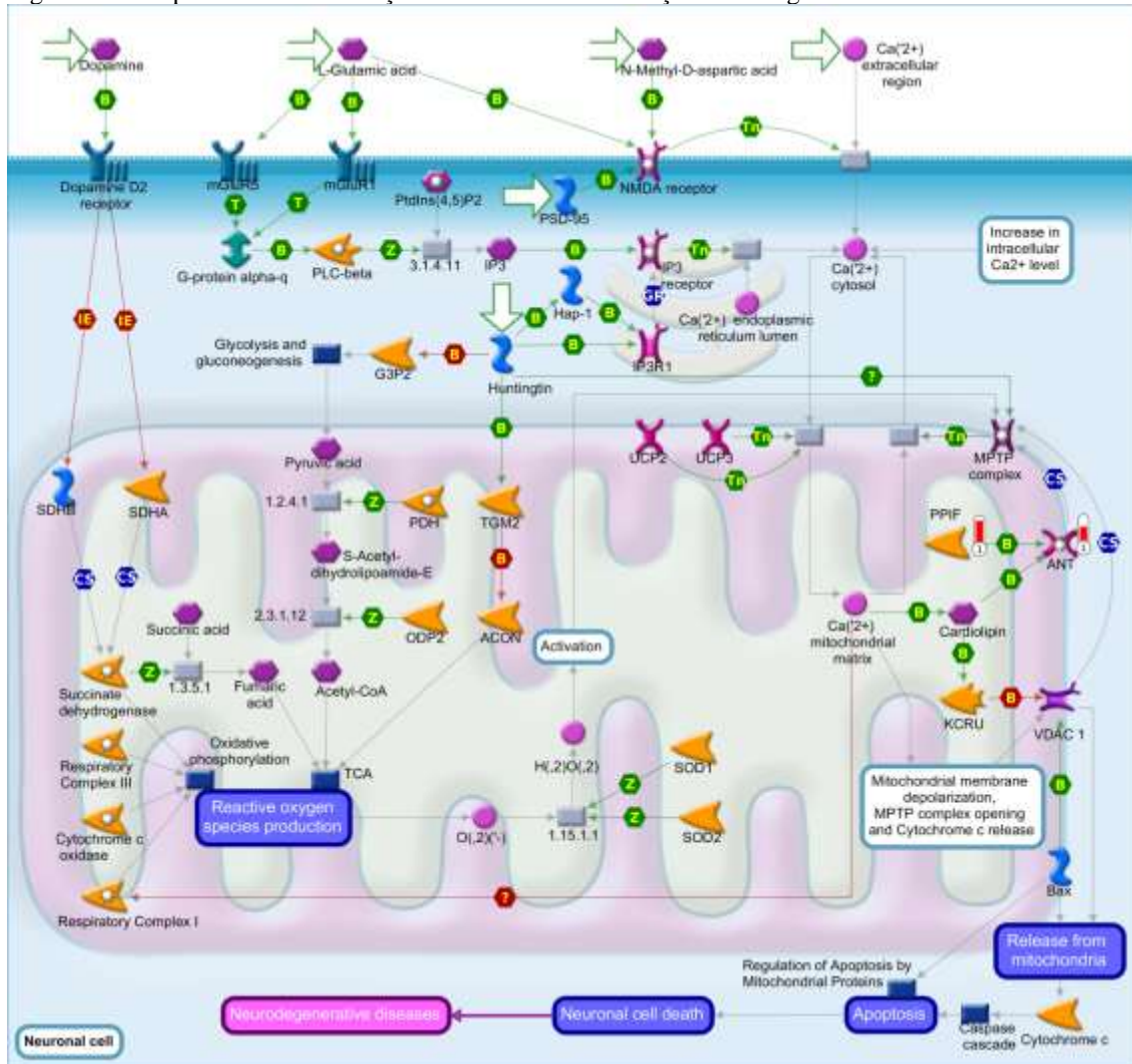
As doenças neurodegenerativas podem estar envolvidas com o canal de Ca^{2+} intracelular tanto pela perda via homeostase quanto pela excitotoxicidade (REGO; OLIVEIRA, 2003). Uma sobrecarga de alta concentração de Ca^{2+} intracelular reflete em uma sobrecarga da via UCP2 e UCP3 no canal de Ca^{2+} mitocondrial, que pode induzir a despolarização da membrana mitocondrial e, como uma das consequências, ativar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) estimulando o complexo MPTP pelas vias Cardiolipina/ANT (BEAL, 1998; BRUSTOVETSKY et al., 2003). A via metabólica deste processo está representada na Figura 17, uma das vias encontradas e escolhida para ser apresentada neste trabalho.

Figura 15 – Estresse oxidativo na disfunção de adipócitos em diabetes tipo 2 e síndrome metabólica



Mapa da via X criado usando o software MetaCore (valor p nominal < 0,1) e a lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no músculo esquelético de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5 % e 3,0 % de óleo de soja). O termômetro azul indica que o DEG está regulado negativamente ($\log_2\text{foldchange} -0,77$) na dieta com 1,5% de óleo de soja (SOY1.5). As setas verdes indicam interações positivas, as setas vermelhas indicam interação negativa e as setas cinza indicam interação não especificada. Para uma definição detalhada, consulte <https://portal.genego.com/legends/MetaCoreQuickReferenceGuide.pdf>.
 Fonte: FANALLI, (2022).

Figura 16 – Mapa de vias de disfunção mitocondrial em doenças neurodegenerativas



Mapa de vias de disfunção mitocondrial em doenças neurodegenerativas criado usando o software MetaCore (valor p nominal < 0,1) e a lista de genes diferencialmente expressos (FDR 10%) no fígado de suínos machos imunocastrados alimentados com dois níveis diferentes de óleo de soja na dieta (1,5% e 3,0% de óleo de soja). O termômetro vermelho indica que o DEG é regulado positivamente (log2foldchange +0,81 e +0,57) na dieta com 1,5% de óleo de soja (SOY1.5). As linhas roxas indicam aumentos nas doenças e as linhas pontilhadas roxas surgem nas doenças. As setas verdes indicam interações positivas, as setas vermelhas indicam interações negativas e as setas cinza indicam interações não especificadas. Para uma definição detalhada, consulte <https://portal.genego.com/legends/MetaCoreQuickReferenceGuide.pdf>.
 Fonte: FANALLI, (2022).

Neste estudo com a abordagem em nutrigenômica, verificamos que diferentes níveis de óleo de soja na dieta de suínos, modelo animal para doenças metabólicas em humanos, afetaram o perfil do transcriptoma do tecido muscular esquelético e hepático. Os genes diferencialmente expressos aqui identificados participam de mapas de rede associados a doenças metabólicas e neurodegenerativas. Esses achados podem ajudar a entender melhor os mecanismos biológicos que podem ser modulados pela dieta.

2.7.2 *Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo)*

Neste estudo nossa hipótese foi que a variação no perfil de ácidos graxos poderia estar associada à diferença na expressão gênica no tecido muscular esquelético e hepático. Assim, nosso objetivo foi avaliar as alterações na expressão gênica no tecido muscular esquelético e no hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com dieta com diferentes perfis de ácidos graxos (fontes de óleos) e identificar vias metabólicas e redes gênicas impactadas pela dieta. Para isso seguimos nosso desenho experimental, em que foram avaliados os dados de RNA-Seq de 18 animais em cada dieta, em que a dieta basal consistia principalmente de milho e farelo de soja adicionados de 3% de óleo de soja (SOY) ou 3% de óleo de canola (CO) ou 3% de óleo de peixe (FO) por um período experimental de 98 dias que compreendeu as fases de crescimento e terminação.

As análises de expressão diferencial foram realizadas entre os grupos SOY vs CO, SOY vs FO e CO vs FO. Foram identificados 65 e 148 GDE no músculo esquelético e fígado, respectivamente, entre SOY vs CO e identificadas vias biológicas relacionadas à oxidação de AG, regulação do metabolismo lipídico, às doenças diabetes mellitus tipo 2, obesidade e Huntington, resposta imune e regulação do metabolismo. Entre SOY vs FO em músculo esquelético e fígado, foram identificados 531 e 143 GDE respectivamente, com vias associadas às doenças obesidade, Huntington e diabetes do tipo 2, TNF-alfa, metabolismo do colesterol, redes de resposta imune e contração muscular.

Entre CO vs FO foram identificados 32 GDE no músculo esquelético relacionados às vias do metabolismo lipídico, diabetes mellitus 1 e 2, metabolismo de triacilglicerol e redes foram relacionadas à resposta imune e metabolismo de ácidos biliares. No fígado não foi identificado GDE para esta comparação. Quatro GDE (Tabela 6) foram comuns entre as comparações de análise de expressão gênica dentro das dietas no tecido muscular (CO vs SOY; SOY vs FO e CO vs FO) e 20 DEG nas comparações de fígado (CO vs SOY e SOY vs FO) (Tabela 7). Esses resultados foram obtidos usando a ferramenta “comparar experimentos” do software MetaCore (Clarivate Analytics).

Tabela 6 – Genes diferencialmente expressos comuns entre as comparações no músculo esquelético de suínos machos imunocastrados alimentados com diferentes perfis de ácidos graxos

Gene name	CO vs SO ¹	SO vs FO ¹	CO vs FO ¹
Aldehyde dehydrogenase 3 family member A1 (<i>AL3A1</i>)	-2,01	-1,89	-2,07
Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2 (<i>AL3A2</i>)	-0,79	-0,69	-0,60
T-cell surface glycoprotein CD4 (<i>CD4</i>)	-1,55	-1,36	-1,52
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (<i>LRBA</i>)	-0,423	-0,457	-0,471

¹log2foldchange

Fonte: FANALLI, (2022).

Tabela 7 – Genes diferencialmente expressos comuns entre as comparações no tecido hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com diferentes perfis de ácidos graxos

Gene	Gene name	CO vs SO ¹	SO vs FO ¹
ENSSSCG00000001074	Lysine-specific histone demethylase 1B (<i>KDM1B</i>)	-0,4855998	-0,475961
ENSSSCG00000009798	N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4 (<i>B3GNT4</i>)	-1,9173398	-1,392796
ENSSSCG00000007094	Double zinc ribbon and ankyrin repeat-containing protein 1 (<i>DZANK1</i>)	-0,5556057	-0,5548601
ENSSSCG00000016957	CD180 antigen (<i>CD180</i>)	0,7455773	0,8958053
ENSSSCG00000000981	Protein disulfide isomerase CRELD2 (<i>CRELD2</i>)	1,0571841	0,8597076
ENSSSCG00000013270	Cryptochrome-2 (<i>CRY2</i>)	-0,8608731	-0,6707014
ENSSSCG00000003006	Cytochrome P450 2B6 (<i>CYP2B6</i>)	-2,4491783	-2,1859678
ENSSSCG00000006238	Cytochrome P450 7A1(<i>CYP7A1</i>)	-2,3114053	-2,7700322
ENSSSCG00000014170	Subdomains A and C of human calpastatin domain I (<i>CAST</i>)	-0,4855452	-0,5212565
ENSSSCG00000003148	D site-binding protein (DBP)	-1,574868	-1,2723083
ENSSSCG00000016295	Ephexin-1 (<i>NGEF</i>)	-0,6023513	-0,6488463
ENSSSCG00000017203	Galactokinase (<i>GALK1</i>)	0,6886798	0,6483007
ENSSSCG00000016129	G-protein coupled receptor 1 (<i>CMKLR2</i>)	-1,2068807	-0,952109
ENSSSCG00000014903	Coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial (<i>CCDC90B</i>)	-0,4203927	-0,5027945
ENSSSCG00000018092	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 (<i>ND6</i>)	-0,9286857	-0,9243504
ENSSSCG00000017781	Peroxisomal sarcosine oxidase (<i>PIPOX</i>)	-1,1236401	-0,9819005
ENSSSCG00000015243	PR domain zinc finger protein 10 (<i>PRDM10</i>)	-0,9946819	-0,8690498
ENSSSCG00000004952	Mothers against decapentaplegic homolog 3 (<i>SMAD3</i>)	-0,3173857	-0,3779015

¹log2foldchange

Fonte: FANALLI, (2022).

Nesse estudo foram identificados importantes vias biológicas associadas ao metabolismo lipídico, resposta à inflamação e doenças metabólicas. Comprovando o efeito das diferentes fontes de óleo na dieta dos suínos sobre o perfil transcriptômico do músculo esquelético e do fígado (FANALLI, 2022).

2.7.3 *Efeito de diferentes fontes de ácidos graxos dietéticos sobre a expressão gênica de tecido muscular esquelético e hepático de suínos (animal modelo)*

Diante dos achados em nossos estudos anteriores foi realizado um novo estudo cujo objetivo foi identificar os principais fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico e na resposta imune relacionados aos genes diferencialmente expressos (FANALLI et al., 2022). Para este estudo foram utilizados os dados de RNA-Seq das amostras de fígado dos animais alimentados com dietas contendo 1,5 ou 3,0% de óleo de soja (SOY1.5 ou SOY3.0). Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros bioquímicos do soro sanguíneos destes animais. Foi identificado um total de 281 GDE entre as dietas SOY1.5 e SOY3.0 ($\log_2\text{foldchange} \geq 1$ ou ≤ -1 ; valor de p corrigido para $\text{FDR} < 0,1$), em que 129 foram regulados negativamente e 152 foram regulados positivamente no grupo SOY1.5. A análise de anotação funcional detectou fatores de transcrição ligados à homeostase lipídica e resposta imune, como RXRA, EGFR e SREBP2. Esses achados demonstraram que fatores de transcrição relacionados ao metabolismo lipídico podem ser modulados pelo nível de inclusão de óleo de soja na dieta.

Os parâmetros bioquímicos do soro sanguíneos estão apresentados na Tabela 8, e observamos que a albumina (g/dL), triglicerídeos (mg/dL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL mg/dL) foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dois grupos de dieta, onde os animais da SOY1.5 apresentaram maiores valores desses parâmetros. Os SFA, MUFA, PUFA e suas proporções foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos, onde podemos observar maior proporção da soma de MUFA e PUFA e ômega 3 (n-3) no grupo de dieta SOY3.0. O mesmo grupo que apresenta triglicerídeos e VLDL mais baixos no sangue. No entanto, de acordo com nosso estudo anterior (ALMEIDA et al., 2021), os animais não apresentaram diferenças no peso corporal, gordura subcutânea e deposição de gordura intramuscular entre as dietas.

Tabela 8 – Efeito das dietas sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos e perfil de ácidos graxos do fígado de suínos machos imunocastrados alimentados com dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja (SOY1.5: 1,5% e SOY3.0: 3,0% óleo de soja)

Variable	Treatments		Pooled SEM ¹	P-value
	SOY1.5	SOY3.0		
Glucose(mg/dL)	81.85	82.85	4.17	0.81
Aspartataminotransferase (U/L)	40.35	38.13	2.42	0.37
TotalProteins (g/dL)	6.69	6.47	0.13	0.11
Albumin(g/dL)	3.70a	3.46b	0.11	<0.05
Globulin(g/dL)	2.996	2.999	0.12	0.98
Triglycerides(mg/dL)	44.48a	35.70b	4	<0.05
Cholesterol(mg/dL)	99.34	96.55	4.58	0.55
HDL(mg/dL)	44.34	43.72	2.06	0.77
LDL(mg/dL)	45.99	45.71	2.91	0.92
VLDL(mg/dL)	9.00a	7.13b	0.81	<0.05
Body weight (kg)	130.61	131.17	3.0430	0.86
Intramuscular fat (%)	1.94	2.63	0.35	0.06
Liver fat (%)	2.6750	3.1878	0.6520	0.44
Total SFA (%)	46.69	45.24	1.03	0.31
Total MUFA (%)	22.01a	28.78b	1.04	<0.01
Total PUFA (%)	30.79a	26.06b	0.55	<0.01
Total n-3 PUFA (%) ²	3.75a	2.42b	0.37	<0.01
Total n-6 PUFA (%) ³	27.02a	23.64b	0.67	<0.01
PUFA:SFA ratio (%) ⁴	0.67a	0.58b	0.02	<0.01
n-6:n-3 PUFA ratio ⁵	8.51a	9.9b	0.5	<0.05
Atherogenic index ⁶	0,45a	0.49b	0.18	<0.01

¹ SEM = standard error of the least square means.

² Total n-3 PUFA = {[C18:3 n-3] + [C20:5 n-3] + [C22:6 n-3]}.

³ Total n-6 PUFA = C18:2 n-6.

⁴ PUFA:SFA ratio = total PUFA/total SFA.

⁵ Σ n-6/ Σ n-3 PUFA ratio.

⁶ Atherogenic index = $(4 \times [C14:0]) + (C16:0)/(\text{total MUFA}) + [\text{total PUFA}]$, where brackets indicate concentrations (Ulbricht and Southgate, 1991).

a-b Within a row, values without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tended to differ ($0.05 < P \leq 0.10$) using Student's t test.

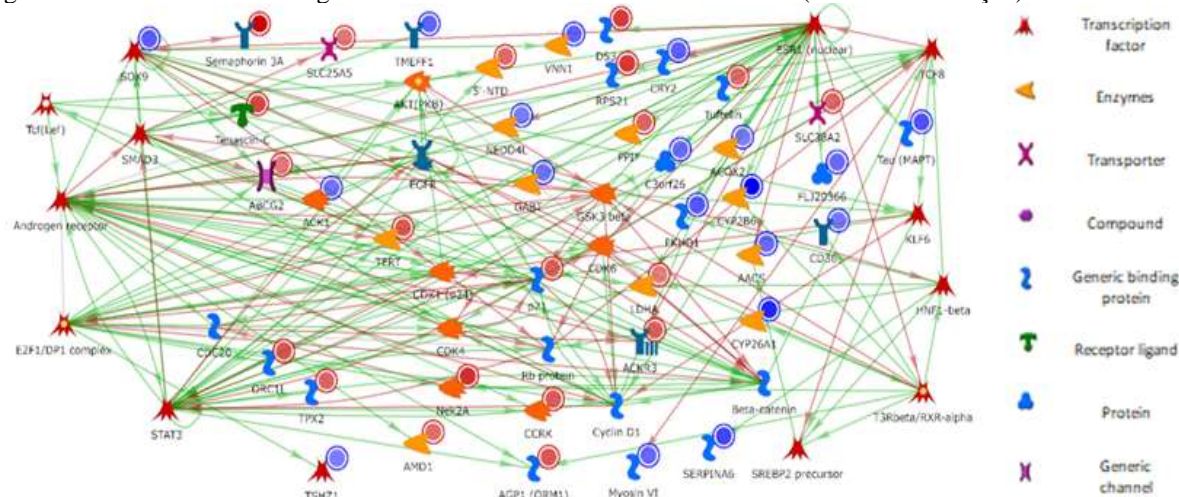
Fonte: FANALLI et al. (2022).

Um total de 281 GDE ($\log_2\text{foldchange} \geq 1$ ou ≤ -1 ; valor de p corrigido para FDR $< 0,1$) foram identificados, em que 129 foram mais expressos ($\log_2\text{FC}$ variando de -3,0 a -0,20) e 152 menos expressos ($\log_2\text{FC}$ variando de 4,8 a 0,24) no grupo SOY1.5 (FANALLI e t al., 2022). A análise funcional detectou importantes FT associados ao metabolismo lipídico, como lipogênese e adipogênese, homeostase lipídica e resposta imune, como Beta-catenina, *EGFR* e *ESRI*, levam principalmente à ativação da

transcrição; *ACK1*, *AKT*, *CDK1* e *CDK4*, causam efeito de fosforilação com mecanismos de ativação e inibição. Destes, os FT, como *TSHZ1* e *SOX9*, também foram DEG com -0,45 log₂FC e -1,02 log₂FC, respectivamente.

Na Figura 17 podemos observar a interação dos GDE identificados e os FT detectados por meio da análise de enriquecimento funcional. Todos os GDE identificados na rede têm funções e relações relevantes com mecanismos essenciais no fígado. O colesterol é crucial para a membrana celular, contribuindo assim para a fluidez e permeabilidade, participando tanto do tráfego de membrana quanto da sinalização transmembrana (BHATTARAI et al., 2021). Além disso, o colesterol está indiretamente relacionado ao controle da maioria das funções biológicas que ocorrem e são facilitadas na membrana. Distúrbios do metabolismo de lipídios e colesterol na célula estão relacionados a doenças, incluindo distúrbios cardiovasculares e metabólicos (BHATTARAI et al., 2021).

Figura 17 – Rede criada com algoritmo de redes de análise básica MetaCore (fator de transcrição)



Rede criada com algoritmo de redes de análise básica MetaCore (fator de transcrição) usando lista DEG (FDR<0,1) de tecido hepático de suínos machos imunocastrados alimentados com dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja (SOY1.5: 1,5% e SOY3.0: 3,0% óleo de soja). As linhas verdes representam uma ativação de outros genes, enquanto as linhas vermelhas representam uma inativação. Nos círculos azuis, os genes regulados negativamente e regulados positivamente são destacados com círculos vermelhos. Imagem criada por MetaCore (Clarivate Analytics) [https://portal.genego.com/].

Fonte: FANALLI et al. (2022).

Desta forma, podemos ressaltar que o fígado, como órgão regulador e central, controla a homeostase lipídica por meio de vias bioquímicas, celulares e de sinalização, atividade endócrina, desintoxicação e imunomodulação (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2018; ZHANG et al., 2018).

Nossa pesquisa e descobertas ainda têm muito a contribuir para a comunidade científica uma vez que estamos em andamento com os estudos do efeito da dieta com diferentes níveis e fontes de ácidos graxos sobre o cérebro dos suínos e também sobre a abundância de algumas das citocinas que foram identificadas como diferencialmente expressas em nossos resultados. Assim como a descoberta de polimorfismos do tipo SNP funcionais candidatos (eQTL), co-expressão gênica e correlação com as características aqui estudadas e efeito sobre as características sensoriais da carne e da linguiça fabricada com a carne dos animais produzidos neste estudo. Estes resultados podem contribuir para o campo de pesquisa da nutrigenômica que visa elucidar intervenções dietéticas na saúde animal e humana, bem como impulsionar a tecnologia e a ciência de alimentos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação das ferramentas da biologia molecular na Ciência dos Alimentos retrata a complexidade e multidisciplinaridade dos achados, uma vez que envolve áreas básicas e aplicadas da ciência. Podemos citar entre estas áreas a genética, o melhoramento genético, a bioestatística, a produção animal, a ciência e tecnologia dos alimentos, a ciência da carne, a bioquímica e disciplinas afins.

Os ácidos graxos são moléculas de grande e vasta relevância e aplicação na saúde animal e humana, e também, na ciência e tecnologia dos alimentos. Esta tese conseguiu mostrar uma pequena parte desta relevância com uma abordagem na área da genômica que segue os princípios do Dogma Central da Biologia Molecular apresentada por Francis Crick em 1958, em que tínhamos uma visão bastante simplista para os dias de hoje, mas não para a época em foi apresentada: DNA → RNA → Proteína. Após mais de cinquenta décadas este Dogma foi sendo moldado de forma a serem incluídas as novas descobertas (Figura 1), mas sem alterar o alicerce apresentado por Francis Crick.

Os estudos aqui apresentados têm uma grande importância científica e envolveram muitas ações de pesquisa, ensino, formação de recursos humanos de alto grau de conhecimento, gestão e principalmente de enfrentamento de desafios tecnológicos. Esses estudos sempre estiveram e ainda estão sendo desenvolvidos na fronteira do conhecimento, e têm trazido resultados que geram novas perguntas e nos estimulam cada vez mais nos mantermos na pesquisa.

Assim, a compreensão a nível molecular do papel dos ácidos graxos ainda é bastante limitada e existe uma lacuna no conhecimento entre o efeito e a importância

destes na regulação da expressão génica e consequentemente nas vias biológicas envolvidas com características de interesse económico e de saúde animal e humana. Essa compreensão pode nos levar ao entendimento e até mesmo à prevenção de doenças metabólicas, uma vez que os ácidos graxos são componentes funcionais dos alimentos e estão presentes de forma significativa nas dietas dos animais e do homem.

Isso é observado na medida em que foi possível a identificação de biomarcadores candidatos associados à deposição e composição dos ácidos graxos no músculo esquelético. Biomarcadores candidatos como SNP, genes e proteínas que em estudos futuros podem ser alvos de edição génica ou drogas, por exemplo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. V. et al. Effects of increasing dietary oil inclusion from different sources on growth performance, carcass and meat quality traits, and fatty acid profile in genetically lean immunocastrated male pigs. **Livestock Science**, v. 248, p. 104515, 1 jun. 2021.

ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E. Triglyceride metabolism in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 1, 2018.

AMUSQUIVAR, E. et al. Fatty Acid Composition of the Maternal Diet During the First or the Second Half of Gestation Influences the Fatty Acid Composition of Sows' Milk and Plasma, and Plasma of Their Piglets. **Lipids** **2010 45:5**, v. 45, n. 5, p. 409–418, abr. 2010.

ANDERSEN, H. J. et al. Feeding and meat quality - A future approach. In: Meat Science, 3 SPEC. ISS., **Anais**. 2005.

BAKER, E. J. et al. **Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans**. **Progress in Lipid Research**, 2016.

BARTEL, D. P. **MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function** **Cell**, 2004.

BASSOLS, A. et al. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective **Proteomics - Clinical Applications**, 2014.

BAZEWICZ, C. G. et al. **Aldehyde dehydrogenase in regulatory T-cell development, immunity and cancer** **Immunology**, 2019.

BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1366, n. 1–2, p. 211–223, 10 ago. 1998.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, 1995.

BERTON, M. P. et al. Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 25 nov. 2016.

BHATTARAI, A. et al. Regulation of cholesterol biosynthesis and lipid metabolism: A microRNA management perspective. **Steroids**, v. 173, p. 108878, 1 set. 2021.

BOLORMAA, S. et al. Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using genome-wide association studies. **Genetics Selection Evolution**, v. 45, n. 1, 2013.

BRUSTOVETSKY, N. et al. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 12, 2003.

CARDOSO, T. F. et al. Multi-omics approach reveals mir-snp's affecting muscle fatty acids profile in nelore cattle. **Genes**, v. 12, n. 1, 2021.

CARROLL, J. B. et al. Treating the whole body in Huntington's disease. **The Lancet Neurology**, 2015.

CESAR, A. S. M. et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle. **BMC Genetics**, 2014.

CESAR, A. S. M. et al. Putative regulatory factors associated with intramuscular fat content. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0128350, 4 jun. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128350>>.

CESAR, A. S. M. et al. Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 22 nov. 2016.

CESAR, A. S. M. et al. Identification of putative regulatory regions and transcription factors associated with intramuscular fat content traits. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 27 jun. 2018.

CHIANG, M. C.; CHERN, Y.; JUO, C. G. The dysfunction of hepatic transcriptional factors in mice with Huntington's Disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 9, 2011.

CHU, A. et al. Aldehyde dehydrogenase isoforms and inflammatory cell populations are differentially expressed in term human placentas affected by intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 81, 2019.

CLOUARD, C. et al. Prenatal, but not early postnatal, exposure to a Western diet improves spatial memory of pigs later in life and is paired with changes in maternal prepartum blood lipid levels. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 7, p. 2466–2475, jul. 2016.

COUTINHO, L. L. et al. Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. **Physiological Genomics**, v. 29, n. 1, 2007.

CRICK, F. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, 1970.

DANIEL, C. R. et al. Trends in meat consumption in the USA. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 575–583, abr. 2011.

DAVIS, T. L. et al. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. **PLoS Biology**, v. 8, n. 7, 2010.

DOKMANOVIC, M. et al. Correlations among stress parameters, meat and carcass quality parameters in pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 3, 2015.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 1, 1997.

DUAN, Y. et al. N-6:n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 3, 2014.

DUGAN, M. et al. Pork as a Source of Omega-3 (n-3) Fatty Acids. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 12, 2015.

ESTANY, J. et al. Triennial growth and development symposium: Genetics and breeding for intramuscular fat and oleic acid content in pigs. **Journal of Animal Science**, 2017.

FANALLI, S. L. et al. Effects of Dietary Fatty Acids on Gene Expression and Biological Processes in Different Tissues of Pigs: A Review. 16 nov. 2021.

FANALLI, S. L. Effect of the addition of different sources of fatty acids in the pig diet on the transcriptomic profile of different tissues / Simara Larissa Fanalli ; orientadora Aline Silva Mello Cesar, Pirassununga, 2022. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.**, p. 276, 2022.

FANALLI, S. L. et al. Effect of Dietary Soybean Oil Inclusion on Liver-Related Transcription Factors in a Pig Model for Metabolic Diseases. **Preprints**, , 2022.

FELIPO, V. Hepatic encephalopathy: Effects of liver failure on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, 2013.

GOMES, J. D. et al. Effects of dietary oil inclusion on meat quality of immunocastrated male pigs. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, 2021.

GUTIÉRREZ-GIL, B. et al. Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, 2009.

HASAN, M. S.; FEUGANG, J. M.; LIAO, S. F. A Nutrigenomics Approach Using RNA Sequencing Technology to Study Nutrient–Gene Interactions in Agricultural Animals. **Current Developments in Nutrition**, v. 3, n. 8, ago. 2019.

HUDSON, N. J.; REVERTER, A.; DALRYMPLE, B. P. A differential wiring analysis of expression data correctly identifies the gene containing the causal mutation. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 5, 2009.

JACOBSON, T. A. Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. In: American Journal of Clinical Nutrition, 6, **Anais...**2008.

KELSON, T. L.; SECOR MCVOY, J. R.; RIZZO, W. B. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: Microsomal localization, purification, and biochemical characterization. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1335, n. 1–2, 1997.

KOESTERKE, L. et al. Optimizing the PCIT algorithm on stampede's xeon and xeon phi processors for faster discovery of biological networks. In: ACM International Conference Proceeding Series, **Anais...**2013.

KYRIAZAKIS, I.; WHITTEMORE, C. T. **Whittemore's Science and Practice of Pig Production**. 3rd. ed. [s.l: s.n.].

LAAKSONEN, D. E. et al. Prediction of cardiovascular mortality in middle-aged men by dietary and serum linoleic and polyunsaturated fatty acids. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 2, 2005.

LABORDE, F. L. et al. Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 2, 2001.

LI, Z. C. et al. Effects of lipid form and source on digestibility of fat and fatty acids in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 7, 2017.

LICHTENSTEIN, A. H. et al. Dietary fat consumption and health. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 5 II, p. 3–19, 1998.

LIN, J. et al. Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 10, 2004.

LIU, E.; LI, L.; CHENG, L. Gene regulatory network review. In: **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics**. [s.l.: s.n.]1–3.

LOPEZ, S. et al. Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2014. .

LUNNEY, J. K. Advances in swine biomedical model genomicsInternational. **Journal of Biological Sciences**, 2007.

LUO, W. L. et al. The effect of maternal diet with fish oil on oxidative stress and inflammatory response in sow and new-born piglets. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

MARTINS, J. M. et al. Rearing system and oleic acid supplementation effect on carcass and lipid characteristics of two muscles from an obese pig breed. **Animal**, v. 9, n. 10, 2015.

MASLOV, L. N. et al. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? **Journal of Clinical and Translational Endocrinology**, 2019.

MCCLURE, M. C. et al. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 6, 2010.

MCNEILL, S.; VAN ELSWYK, M. E. **Red meat in global nutrition** *Meat Science*, 2012.

MOGHADASIAN, M. H.; SHAHIDI, F. Fatty Acids. **International Encyclopedia of Public Health**, p. 114–122, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128036785001570?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 nov. 2021.

MOREL, P. C. H. et al. Effect of lipid type on growth performance, meat quality and the content of long chain n-3 fatty acids in pork meat. **Meat Science**, v. 95, n. 2, 2013.

MORRIS, C. A. et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 1, 2007.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 2, 2003.

NORHEIM, F. et al. Molecular Nutrition Research—The Modern Way Of Performing Nutritional Science. **Nutrients 2012, Vol. 4, Pages 1898-1944**, v. 4, n. 12, p. 1898–1944, dez. 2012.

OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030**, p. 163–177, 2021.

OLIVEIRA, G. B. et al. Integrative analysis of microRNAs and mRNAs revealed regulation of composition and metabolism in Nelore cattle. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 2018a.

OLIVEIRA, P. S. . de. et al. An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018b.

OLIVEIRA, P. S. N. et al. Co-expression networks reveal potential regulatory roles of miRNAs in fatty acid composition of Nelore cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. JUL, 2019.

ØVERLAND, M. et al. Effect of fish oil on growth performance, carcass characteristics, sensory parameters, and fatty acid composition in pigs. **Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences**, v. 46, n. 1, 1996.

PAN, C. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 inhibits inflammatory response and regulates atherosclerotic plaque. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, 2016.

PAN, Z. et al. Pig genome functional annotation enhances the biological interpretation of complex traits and human disease. **Nat Commun**, v. 12, 2021.

PARK, J. C. et al. Effects of dietary fat types on growth performance, pork quality, and gene expression in growing-finishing pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 12, 2012.

PETERS-GOLDEN, M.; GLEASON, M. M.; TOGIAS, A. **Cysteinyl leukotrienes: Multi-functional mediators in allergic rhinitis** *Clinical and Experimental Allergy*, 2006.

POLETI, M. D. et al. Data from proteomic analysis of bovine Longissimus dorsi muscle associated with intramuscular fat content. **Data in Brief**, v. 19, 2018.

POLETI, M. D. et al. Proteome alterations associated with the oleic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in bovine skeletal muscle. **Journal of Proteomics**, v. 222, 2020.

RAMAYO-CALDAS, Y. et al. Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, 2012.

REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Neurochemical Research**, 2003.

RULE, D. C.; MACNEIL, M. D.; SHORT, R. E. Influence of Sire Growth Potential, Time on Feed, and Growing-Finishing Strategy on Cholesterol and Fatty Acids of the Ground Carcass and Longissimus Muscle of Beef Steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, 1997.

SCHOOK, L. B. et al. Unraveling the swine genome: Implications for human health. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 3, 2015.

SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk. **Ann Intern Med**, , 2014.

SILVA-VIGNATO, B. et al. Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nelore cattle. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 2017.

SILVA-VIGNATO, B. et al. Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle 06 Biological Sciences 0604 Genetics. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 2019.

SILVA, J. P. M. da et al. Fatty acid profile in brain and hepatic tissues from pigs supplemented with canola oil. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, 2021.

STELZER, G. et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, 2016.

ŚWIATKIEWICZ, M. et al. The effect of dietary fatty acid composition on adipose tissue quality and expression of genes related to lipid metabolism in porcine livers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 204–215, 2016.

SZOSTAK, A. et al. Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome. **Genes and Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2016.

TEYE, G. A. et al. Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality. **Meat Science**, v. 73, n. 1, p. 157–165, 1 maio 2006.

VODOLAZSKA, D.; LAURIDSEN, C. Effects of dietary hemp seed oil to sows on fatty acid profiles, nutritional and immune status of piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 2020 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–18, mar. 2020.

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

WORLD POPULATION REVIEW. World Population Review. p. 68–70, 2021.

ZEMPLINI, J.; DANIEL, H. Molecular nutrition. 2003.

ZHANG, L. et al. Medium-chain triglycerides attenuate liver injury in lipopolysaccharide-challenged pigs by inhibiting necroptotic and inflammatory signaling pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

APÊNDICE

Apêndice A – “Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle”

Cesar et al. *BMC Genetics* 2014, **15**:39
<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/39>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle

Aline SM Cesar¹, Luciana CA Regitano², Gerson B Mourão¹, Rymer R Tullio², Dante PD Lanna¹, Renata T Nassu², Maurício A Mudado², Priscila SN Oliveira³, Michele L do Nascimento¹, Amália S Chaves¹, Maurício M Alencar², Tad S Sonstegard⁴, Dorian J Garrick⁵, James M Reecy⁵ and Luiz L Coutinho^{1*}

Abstract

Background: Meat from *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds are an important source of nutrients for humans and intramuscular fat (IMF) influences its flavor, nutritional value and impacts human health. Human consumption of fat that contains high levels of monounsaturated fatty acids (MUFA) can reduce the concentration of undesirable cholesterol (LDL) in circulating blood. Different feeding practices and genetic variation within and between breeds influences the amount of IMF and fatty acid (FA) composition in meat. However, it is difficult and costly to determine fatty acid composition, which has precluded beef cattle breeding programs from selecting for a healthier fatty acid profile. In this study, we employed a high-density single nucleotide polymorphism (SNP) chip to genotype 386 Nelore steers, a *Bos indicus* breed and, a Bayesian approach to identify genomic regions and putative candidate genes that could be involved with deposition and composition of IMF.

Results: Twenty-three genomic regions (1-Mb SNP windows) associated with IMF deposition and FA composition that each explain $\geq 1\%$ of the genetic variance were identified on chromosomes 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 26 and 27. Many of these regions were not previously detected in other breeds. The genes present in these regions were identified and some can help explain the genetic basis of deposition and composition of fat in cattle.

Conclusions: The genomic regions and genes identified contribute to a better understanding of the genetic control of fatty acid deposition and can lead to DNA-based selection strategies to improve meat quality for human consumption.

Keywords: Fatty acid, GWAS, *Bos indicus*, Beef, Positional candidate gene

Background

Many consumers associate consumption of fat from beef with coronary heart disease, diabetes and obesity, due to the presence of cholesterol, high concentration of saturated fatty acids (SFA), and low concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFA). However, consumption of fatty acids is necessary for human nutrition [1]. Beef has high nutritional value from children to seniors, is a rich source of protein (essential amino acids), iron, zinc, B vitamins and essential polyunsaturated fatty acids such as linoleic and linolenic acid [2]. Beef fat also has a high concentration of monounsaturated fatty acids (MUFA),

whose melting point is low and can reduce the concentration of bad cholesterol (LDL) in blood circulation [3].

The amount of fatty acid and its composition in beef varies by breed, nutrition, sex, age and carcass finishing level [4]. The difficulties associated with determining intramuscular fat (IMF) deposition and composition as well as the limited knowledge on the genetic mechanisms that control these traits has limited genetic progress in the production of healthier beef.

The development of high-density bovine genotyping [5] and their use in genome-wide association studies (GWAS) have allowed identification of genomic regions associated with phenotypes of interest. The technique of GWAS exploits differences in allele frequencies of thousands of polymorphic markers available in unrelated individuals who possess different phenotypes (for example,

* Correspondence: lcoutinho@usp.br

¹Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba

SP 13418-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Cesar et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

RESEARCH ARTICLE

Putative Regulatory Factors Associated with Intramuscular Fat Content

Aline S. M. Cesar¹, Luciana C. A. Regitano², James E. Koltes³, Eric R. Fritz-Waters³, Dante P. D. Lanna¹, Gustavo Gasparin¹, Gerson B. Mourão¹, Priscila S. N. Oliveira⁴, James M. Reecy³, Luiz L. Coutinho^{1*}

1 Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13416-900, Brazil, **2** Embrapa Southeast-Cattle Research Center, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil, **3** Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA, 50011, United States of America, **4** Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

* lcoutinho@usp.br



 OPEN ACCESS

Citation: Cesar ASM, Regitano LCA, Koltes JE, Fritz-Waters ER, Lanna DPD, Gasparin G, et al. (2015) Putative Regulatory Factors Associated with Intramuscular Fat Content. PLoS ONE 10(6): e0128350. doi:10.1371/journal.pone.0128350

Academic Editor: Roberta Davoli, University of Bologna, ITALY

Received: August 22, 2014

Accepted: April 26, 2015

Published: June 4, 2015

Copyright: © 2015 Cesar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequencing data are available from the European Nucleotide Archive (ENA) of European Bioinformatics Institute (EBI) (accession number PRJEB6732).

Funding: Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) – <https://www.embrapa.br> – process number: (Macroprograma 1, 01/2005). Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) – <https://www.fapesp.br> – process number: 2011/03005-7, 2012/02363-1 and 2012/23638-8. LCAR, GBM and LLC were granted CNPq fellowships. The funders had no role in study design,

Abstract

Intramuscular fat (IMF) content is related to insulin resistance, which is an important prediction factor for disorders, such as cardiovascular disease, obesity and type 2 diabetes in human. At the same time, it is an economically important trait, which influences the sensorial and nutritional value of meat. The deposition of IMF is influenced by many factors such as sex, age, nutrition, and genetics. In this study Nellore steers (*Bos taurus indicus* subspecies) were used to better understand the molecular mechanisms involved in IMF content. This was accomplished by identifying differentially expressed genes (DEG), biological pathways and putative regulatory factors. Animals included in this study had extreme genomic estimated breeding value (GEBV) for IMF. RNA-seq analysis, gene set enrichment analysis (GSEA) and co-expression network methods, such as partial correlation coefficient with information theory (PCIT), regulatory impact factor (RIF) and phenotypic impact factor (PIF) were utilized to better understand intramuscular adipogenesis. A total of 16,101 genes were analyzed in both groups (high (H) and low (L) GEBV) and 77 DEG (FDR 10%) were identified between the two groups. Pathway Studio software identified 13 significantly over-represented pathways, functional classes and small molecule signaling pathways within the DEG list. PCIT analyses identified genes with a difference in the number of gene-gene correlations between H and L group and detected putative regulatory factors involved in IMF content. Candidate genes identified by PCIT include: *ANKRD26*, *HOXC5* and *PPAPDC2*. RIF and PIF analyses identified several candidate genes: *GLI2* and *IGF2* (RIF1), *MPC1* and *UBL5* (RIF2) and a host of small RNAs, including miR-1281 (PIF). These findings contribute to a better understanding of the molecular mechanisms that underlie fat content and energy balance in muscle and provide important information for the production of healthier beef for human consumption.

Apêndice C: “Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content”

Cesar et al. *BMC Genomics* (2016) 17:961
DOI 10.1186/s12864-016-3306-x

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content

Aline S. M. Cesar^{1,2}, Luciana C. A. Regitano³, Mirele D. Poleti¹, Sônia C. S. Andrade^{1,4}, Polyana C. Tizioto³, Priscila S. N. Oliveira³, Andrezza M. Felício¹, Michele L. do Nascimento¹, Amália S. Chaves¹, Dante P. D. Lanina¹, Rymer R. Tullio³, Renata T. Nassu³, James E. Koltes⁵, Eric Fritz-Waters², Gerson B. Mourão¹, Adhemar Zerlotini-Neto⁶, James M. Reecy² and Luiz L. Coutinho^{1*}

Abstract

Background: Lipids are a class of molecules that play an important role in cellular structure and metabolism in all cell types. In the last few decades, it has been reported that long-chain fatty acids (FAs) are involved in several biological functions from transcriptional regulation to physiological processes. Several fatty acids have been both positively and negatively implicated in different biological processes in skeletal muscle and other tissues. To gain insight into biological processes associated with fatty acid content in skeletal muscle, the aim of the present study was to identify differentially expressed genes (DEGs) and functional pathways related to gene expression regulation associated with FA content in cattle.

Results: Skeletal muscle transcriptome analysis of 164 Nelore steers revealed no differentially expressed genes (DEGs, FDR 10%) for samples with extreme values for linoleic acid (LA) or stearic acid (SA), and only a few DEGs for eicosapentaenoic acid (EPA, 5 DEGs), docosahexaenoic acid (DHA, 4 DEGs) and palmitic acid (PA, 123 DEGs), while large numbers of DEGs were associated with oleic acid (OA, 1134 DEGs) and conjugated linoleic acid cis9 trans11 (CLA-c9t11, 872 DEGs). Functional annotation and functional enrichment from OA DEGs identified important genes, canonical pathways and upstream regulators such as *SCD*, *PLIN5*, *UCP3*, *CPT1*, *CPT1B*, oxidative phosphorylation mitochondrial dysfunction, *PPARGC1A*, and *FoxO1*. Two important genes associated with lipid metabolism, gene expression and cancer were identified as DEGs between animals with high and low CLA-c9t11, specifically, epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and *RNPS*.

Conclusion: Only two out of seven classes of molecules of FA studied were associated with large changes in the expression profile of skeletal muscle. OA and CLA-c9t11 content had significant effects on the expression level of genes related to important biological processes associated with oxidative phosphorylation, and cell growth, survival, and migration. These results contribute to our understanding of how some FAs modulate metabolism and may have protective health function.

Keywords: Lipids, RNA-Seq, *Bos indicus*, Global Oxidative Metabolism, Human Health

* Correspondence: lcoutinho@usp.br

¹Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice D: “Gene expression profile of intramuscular muscle in Nelore cattle with extreme values of fatty acid”

Berton et al. *BMC Genomics* (2016) 17:972
DOI 10.1186/s12864-016-3232-y

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Gene expression profile of intramuscular muscle in Nelore cattle with extreme values of fatty acid

Mariana P. Berton¹, Larissa F. S. Fonseca¹, Daniela F. J. Gimenez¹, Bruno L. Utembergue², Aline S. M. Cesar³, Luiz L. Coutinho^{3,5}, Marcos Vinicius A. de Lemos¹, Carolyn Aboujaoude¹, Angélica S. C. Pereira², Rafael M. de O Silva¹, Nedenia B. Stafuzza¹, Fabieli L. B. Feitosa¹, Hermenegildo L. J. Chiaia¹, Bianca F. Olivieri¹, Elisa Peripolli¹, Rafael L. Toniussi¹, Daniel M. Gordo¹, Rafael Espigolan¹, Adrielle M. Ferrinho², Lenise F. Mueller⁴, Lucia G. de Albuquerque^{1,5}, Henrique N. de Oliveira^{1,5}, Susan Duckett⁶ and Fernando Baldi^{1,5*}

Abstract

Background: Fatty acid type in beef can be detrimental to human health and has received considerable attention in recent years. The aim of this study was to identify differentially expressed genes in *longissimus thoracis* muscle of 48 Nelore young bulls with extreme phenotypes for fatty acid composition of intramuscular fat by RNA-seq technique.

Results: Differential expression analyses between animals with extreme phenotype for fatty acid composition showed a total of 13 differentially expressed genes for myristic (C14:0), 35 for palmitic (C16:0), 187 for stearic (C18:0), 371 for oleic (C18:1, cis-9), 24 for conjugated linoleic (C18:2 cis-9, trans11, CLA), 89 for linoleic (C18:2 cis-9,12 n6), and 110 genes for α -linolenic (C18:3 n3) fatty acids. For the respective sums of the individual fatty acids, 51 differentially expressed genes for saturated fatty acids (SFA), 336 for monounsaturated (MUFA), 131 for polyunsaturated (PUFA), 92 for PUFA/SFA ratio, 55 for ω 3, 627 for ω 6, and 22 for ω 6/ ω 3 ratio were identified. Functional annotation analyses identified several genes associated with fatty acid metabolism, such as those involved in intra and extra-cellular transport of fatty acid synthesis precursors in intramuscular fat of *longissimus thoracis* muscle. Some of them must be highlighted, such as: *ACSM3* and *ACSS1* genes, which work as a precursor in fatty acid synthesis; *DGAT2* gene that acts in the deposition of saturated fat in the adipose tissue; *GPP* and *LPL* genes that support the synthesis of insulin, stimulating both the glucose synthesis and the amino acids entry into the cells; and the *BDH1* gene, which is responsible for the synthesis and degradation of ketone bodies used in the synthesis of ATP.

Conclusion: Several genes related to lipid metabolism and fatty acid composition were identified. These findings must contribute to the elucidation of the genetic basis to improve Nelore meat quality traits, with emphasis on human health. Additionally, it can also contribute to improve the knowledge of fatty acid biosynthesis and the selection of animals with better nutritional quality.

Keywords: *Bos indicus*, Human health, Lipid composition, RNA-seq, Transcriptome

* Correspondence: fernandobaldiuy@gmail.com

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal 14884-900, SP, Brazil

⁵Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Lago Sul 71605-001, DF, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice E: “Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nellore cattle”

Silva-Vignato et al. *BMC Genomics* (2017) 18:506
DOI 10.1186/s12864-017-3897-x

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nellore cattle

Bárbara Silva-Vignato^{1*}, Luiz L. Coutinho², Aline S. M. Cesar², Mirele D. Poletti², Luciana C. A. Regitano³ and Júlio C. C. Balieiro⁴

Abstract

Background: Commercial cuts yield is an important trait for beef production, which affects the final value of the products, but its direct determination is a challenging procedure to be implemented in practice. The measurement of ribeye area (REA) and backfat thickness (BFT) can be used as indirect measures of meat yield. REA and BFT are important traits studied in beef cattle due to their strong implication in technological (carcass yield) and nutritional characteristics of meat products, like the degree of muscularity and total body fat. Thus, the aim of this work was to study the *Longissimus dorsi* muscle transcriptome of Nellore cattle, associated with REA and BFT, to find differentially expressed (DE) genes, metabolic pathways, and biological processes that may regulate these traits.

Results: By comparing the gene expression level between groups with extreme genomic estimated breeding values (GEBV), 101 DE genes for REA and 18 for BFT (false discovery rate, FDR 10%) were identified. Functional enrichment analysis for REA identified two KEGG pathways, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling pathway and endocytosis pathway, and three biological processes, response to endoplasmic reticulum stress, cellular protein modification process, and macromolecule modification. The MAPK pathway is responsible for fundamental cellular processes, such as growth, differentiation, and hypertrophy. For BFT, 18 biological processes were found to be altered and grouped into 8 clusters of semantically similar terms. The DE genes identified in the biological processes for BFT were *ACHE*, *SRDSA1*, *RSAD2* and *RSPO3*. *RSAD2* has been previously shown to be associated with lipid droplet content and lipid biosynthesis.

Conclusion: In this study, we identified genes, metabolic pathways, and biological processes, involved in differentiation, proliferation, protein turnover, hypertrophy, as well as adipogenesis and lipid biosynthesis related to REA and BFT. These results enlighten some of the molecular processes involved in muscle and fat deposition, which are economically important carcass traits for beef production.

Keywords: Backfat thickness, *Bos taurus indicus*, Ribeye area, RNA-Seq

Background

Meat is the most important source of animal protein for the human diet; it consists mainly of skeletal muscle, and of varying amounts of connective tissue, implicated on its qualitative and quantitative characteristics, as well as small amounts of epithelial and nervous tissues. Meat represents the edible portion of the carcass, in other

words, the part that will be destined for the final consumers and can be represented by the yield of commercial cuts [1, 2].

Commercial cuts yield is economically important since it affects the final value of the products due to the proportion of fat, muscle, and bone in the carcasses. The direct determination of meat yield is difficult in practice, therefore the measures of ribeye area (REA) and backfat thickness (BFT), sections of the *Longissimus dorsi* muscle, are often used as indirect measures of this trait [3–5].

* Correspondence: bsilvavignato@gmail.com

¹College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP 13635-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice F: “Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle”

Silva-Vignato et al. *BMC Genomics* (2019) 20:32
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-5345-y>

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle

Bárbara Silva-Vignato^{1*}, Luiz L. Coutinho¹, Mirele D. Poleti², Aline S. M. Cesar¹, Cristina T. Moncau³, Luciana C. A. Regitano⁴ and Júlio C. C. Balieiro⁵

Abstract

Background: Positively correlated with carcass weight and animal growth, the ribeye area (REA) and the backfat thickness (BFT) are economic important carcass traits, which impact directly on producer's payment. The selection of these traits has not been satisfactory since they are expressed later in the animal's life and multigenic regulated. So, next-generation technologies have been applied in this area to improve animal's selection and better understand the molecular mechanisms involved in the development of these traits. Correlation network analysis, performed by tools like WGCNA (Weighted Correlation Network Analysis), has been used to explore gene-gene interactions and gene-phenotype correlations. Thus, this study aimed to identify putative candidate genes and metabolic pathways that regulate REA and BFT by constructing a gene co-expression network using WGCNA and RNA sequencing data, to better understand genetic and molecular variations behind these complex traits in Nelore cattle.

Results: The gene co-expression network analysis, using WGCNA, were built using RNA-sequencing data normalized by transcript per million (TPM) from 43 Nelore steers. Forty-six gene clusters were constructed, between them, three were positively correlated (p -value < 0.1) to the BFT (Green Yellow, Ivory, and Light Yellow modules) and, one cluster was negatively correlated (p -value < 0.1) with REA (Salmon module). The enrichment analysis performed by DAVID and WebGestalt (FDR 5%) identified eight Gene Ontology (GO) terms and three KEGG pathways in the Green Yellow module, mostly associated with immune response and inflammatory mechanisms. The enrichment of the Salmon module demonstrated 19 GO terms and 21 KEGG pathways, related to muscle energy metabolism, lipid metabolism, muscle degradation, and oxidative stress diseases. The Ivory and Light yellow modules have not shown significant results in the enrichment analysis.

Conclusion: With this study, we verified that inflammation and immune response pathways modulate the BFT trait. Energy and lipid metabolism pathways, highlighting fatty acid metabolism, were the central pathways associated with REA. Some genes, as *RSAD2*, *EIF2AK2*, *ACAT1*, and *ACSL1* were considered as putative candidate related to these traits. Altogether these results allow us to a better comprehension of the molecular mechanisms that lead to muscle and fat deposition in bovine.

Keywords: Backfat thickness, Functional enrichment analysis, Ribeye area, RNA-Seq data, WGCNA

* Correspondence: bsilvavignato@gmail.com

¹College of Agriculture "Luiz de Queiroz", University of São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice G: “Integrative analysis of microRNAs and mRNAs revealed regulation of composition and metabolism in Nelore cattle”

Oliveira et al. *BMC Genomics* (2018) 19:126
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4514-3>

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Integrative analysis of microRNAs and mRNAs revealed regulation of composition and metabolism in Nelore cattle

Gabriella B. Oliveira¹, Luciana C. A. Regitano², Aline S. M. Cesar¹, James M. Reecy³, Karina Y. Degaki¹, Mirele D. Poleti¹, Andrezza M. Felício¹, James E. Koltes⁴ and Luiz L. Coutinho^{1*}

Abstract

Background: The amount of intramuscular fat can influence the sensory characteristics and nutritional value of beef, thus the selection of animals with adequate fat deposition is important to the consumer. There is growing knowledge about the genes and pathways that control the biological processes involved in fat deposition in muscle. MicroRNAs (miRNAs) belong to a well-conserved class of non-coding small RNAs that modulate gene expression across a range of biological functions in animal development and physiology. The aim of this study was to identify differentially expressed (DE) miRNAs, regulatory candidate genes and co-expression networks related to intramuscular fat (IMF) deposition. To achieve this, we used mRNA and miRNA expression data from the *Longissimus dorsi* muscle of 30 Nelore steers with high (H) and low (L) genomic estimated breeding values (GEBV) for IMF deposition.

Results: Differential miRNA expression analysis between animals with extreme GEBV values for IMF identified six DE miRNAs (FDR 10%). Functional annotation of the target genes for these microRNAs indicated that the PPARs signaling pathway is involved with IMF deposition. Candidate regulatory genes such as SDHAF4, FBXO17, ALDOA and PKM were identified by partial correlation with information theory (PCIT), phenotypic impact factor (PIF) and regulatory impact factor (RIF) co-expression approaches from integrated miRNA-mRNA expression data. Two DE miRNAs (FDR 10%), bta-miR-143 and bta-miR-146b, which were upregulated in the Low IMF group, were correlated with regulatory candidate genes, which were functionally enriched for fatty acid oxidation GO terms. Co-expression patterns obtained by weighted correlation network analysis (WGCNA), which showed possible interaction and regulation between mRNAs and miRNAs, identified several modules related to immune system function, protein metabolism, energy metabolism and glucose catabolism according to *in silico* analysis performed herein.

Conclusion: In this study, several genes and miRNAs were identified as candidate regulators of IMF by analyzing DE miRNAs using two different miRNA-mRNA co-expression network methods. This study contributes to the understanding of potential regulatory mechanisms of gene signaling networks involved in fat deposition processes measured in muscle. Glucose metabolism and inflammation processes were the main pathways found *in silico* to influence intramuscular fat deposition in beef cattle in the integrative mRNA-miRNA co-expression analysis.

Keywords: Lipids, RNA-Seq, *Bos indicus*, microRNAs, Co-expression networks

* Correspondence: lcoutinho@usp.br

¹Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Apêndice H: “Co-Expression Networks Reveal Potential Regulatory Roles of miRNAs in Fatty Acid Composition of Nelore Cattle”



Co-Expression Networks Reveal Potential Regulatory Roles of miRNAs in Fatty Acid Composition of Nelore Cattle

Priscila S.N. de Oliveira¹, Luiz L. Coutinho², Aline S.M. Cesar³, Wellison J. da Silva Diniz⁴, Marcela M. de Souza⁵, Bruno G. Andrade¹, James E. Koltes⁶, Gerson B. Mourão³, Adhemar Zerlotini⁶, James M. Reecy⁶ and Luciana C.A. Regitano^{1*}

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, São Carlos, Brazil, ²Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil, ³Department of Agroindustry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil, ⁴Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil, ⁵Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA, United States, ⁶Empresa Informática Agropecuária, Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

David E. MacHugh,
University College Dublin, Ireland

Reviewed by:

Alessandra Cristó,
Council for Agricultural and
Economics Research, Italy
Paul Cormican,
Teagasc Grange Animal and
Biocience Research
Department (ABRC), Ireland

*Correspondence:

Luciana C.A. Regitano
luciana.regitano@embrapa.com

Specialty section:

This article was submitted to
Livestock Genomics,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 08 February 2019

Accepted: 19 June 2019

Published: 11 July 2019

Citation:

de Oliveira PSN, Coutinho LL,
Cesar ASM, Diniz WJS,
de Souza MM, Andrade BG,
Koltes JE, Mourão GB, Zerlotini A,
Reecy JM and Regitano LCA
(2019) Co-Expression Networks
Reveal Potential Regulatory
Roles of miRNAs in Fatty Acid
Composition of Nelore Cattle.
Front. Genet. 10:651.
doi: 10.3389/fgene.2019.00651

Fatty acid (FA) content affects the sensorial and nutritional value of meat and plays a significant role in biological processes such as adipogenesis and immune response. It is well known that, in beef, the main FAs associated with these biological processes are oleic acid (C18:1 cis9, OA) and conjugated linoleic acid (CLA-c9t11), which may have beneficial effects on metabolic diseases such as type 2 diabetes and obesity. Here, we performed differential expression and co-expression analyses, weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and partial correlation with information theory (PCIT), to uncover the complex interactions between miRNAs and mRNAs expressed in skeletal muscle associated with FA content. miRNA and mRNA expression data were obtained from skeletal muscle of Nelore cattle that had extreme genomic breeding values for OA and CLA. Insulin and MAPK signaling pathways were identified by WGCNA as central pathways associated with both of these fatty acids. Co-expression network analysis identified bta-miR-33a/b, bta-miR-100, bta-miR-204, bta-miR-365-5p, bta-miR-660, bta-miR-411a, bta-miR-136, bta-miR-30-5p, bta-miR-146b, bta-let-7a-5p, bta-let-7f, bta-let-7, bta-miR-339, bta-miR-10b, bta-miR-486, and the genes *ACTA1* and *ALDOA* as potential regulators of fatty acid synthesis. This study provides evidence and insights into the molecular mechanisms and potential target genes involved in fatty acid content differences in Nelore beef cattle, revealing new candidate pathways of phenotype modulation that could positively benefit beef production and human consumption.

Keywords: *Bos indicus*, conjugated linoleic acid, integrative genomics, mRNA, miRNA, oleic acid

Abbreviations: CLA, conjugated linoleic acid; DH, differential hubbing; FA, fatty acid; GEHV, genomic estimated breeding value; IMF, intramuscular fat content; ME, module eigengene; MM, module membership; OA, oleic acid; PCIT, partial correlation with information theory; PIF, phenotypic impact factor; RIF1, regulatory impact factor 1; RIF2, regulatory impact factor 2; WGCNA, weighted gene co-expression network analysis.

Apêndice I: “Data from proteomic analysis of bovine Longissimus dorsi muscle associated with intramuscular fat content”

Data in Brief 19 (2018) 1314–1317



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Data from proteomic analysis of bovine Longissimus dorsi muscle associated with intramuscular fat content

Mirele D. Poleti^a, Luciana C.A. Regitano^b, Gustavo H.M.F. Souza^c, Aline S.M. Cesar^a, Rosineide C. Simas^a, Bárbara Silva-Vignato^d, Gabriella B. Oliveira^a, Sônia C.S. Andrade^a, Luiz C. Cameron^{e,f}, Luiz L. Coutinho^{a,*}

^a Department of Animal Science, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo/ESALQ, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

^b Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

^c MS Applications and Development Laboratory Waters Corporation, São Paulo, SP 06455-020, Brazil

^d Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo/FZEA, Pirassununga, SP 13625-900, Brazil

^e Laboratory of Protein Biochemistry - Federal University of State of Rio de Janeiro/UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ 22290-255, Brazil

^f Department of Biochemistry and Sportomics - Olympic Laboratory - Brazil Olympic Committee, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2018

Received in revised form

23 May 2018

Accepted 5 June 2018

Available online 9 June 2018

ABSTRACT

The proteomic data presented in this article are associated with the research article entitled “Longissimus dorsi muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition” published in Journal of Proteomics [1]. In this article, we characterized the proteomic profile of bovine Longissimus dorsi muscle from Nelore steers and identified differentially abundant proteins associated with the intramuscular fat (IMF) content. An integrated transcriptome-assisted label-free quantitative proteomic approach by High Definition Mass Spectrometry (HDMS²) was employed to identify and quantify the proteins. A functional enrichment analysis using the differentially abundant proteins list was performed to understand the biological processes involved in IMF deposition. Moreover, to explore and clarify the biological mechanisms that influence IMF content, the mRNA data for the same trait from Cesar and

* Corresponding author.

E-mail address: lccoutinho@usp.br (L.L. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.004>

2352-3409/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Apêndice J: “Proteome alterations associated with the oleic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in bovine skeletal muscle”

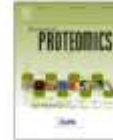
Journal of Proteomics 222 (2020) 103792



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot



Proteome alterations associated with the oleic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in bovine skeletal muscle



Mirele D. Poleti^a, Luciana C.A. Regitano^b, Gustavo H.M.F. Souza^c, Aline S.M. Cesar^d, Rosineide C. Simas^d, Bárbara Silva-Vignato^d, Horácio Montenegro^d, Fábio Pértille^d, Júlio C.C. Balieiro^e, Luiz C. Cameron^{f,g}, Joaíir P. Eler^g, Luiz L. Coutinho^{h,*}

^a College of Animal Science and Food Engineering (FZEA), University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP 13635-900, Brazil

^b Estação Precária Sudeste, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

^c MS Applications and Development Laboratory Waters Corporation, São Paulo, SP 06455-020, Brazil

^d “Luz de Queiroz” College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo (USP), Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

^e School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP 13635-900, Brazil

^f Laboratory of Protein Biochemistry, Federal University of State of Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ 22290-255, Brazil

^g Department of Biochemistry and Sportscis, Olympic Laboratory - Brazil Olympic Committee, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Beef

For infura

Fatty acids

Label-free proteomics

Nelson

Transcriptome

ABSTRACT

Oleic acid (OA) and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (c9t11-CLA) are fatty acids found in beef with beneficial effects in human health. This study investigated differentially abundant proteins (DAPs) in skeletal muscle of bovines with extreme values of OA, and c9t11-CLA. For each one of the fatty acids, twenty muscle samples were divided into two groups ($N = 10$, High; $N = 10$, Low) and analyzed by high definition mass spectrometry. We identified 103 and 133 DAPs between the groups for each fatty acid. We found 64 and 45 up-regulated and 39 and 68 down-regulated proteins for OA and c9t11-CLA, respectively. Comparative analysis between proteomic and transcriptomic data revealed eight and ten genes with a consistent between mRNA expression levels and protein abundance for OA and c9t11-CLA, respectively. Unconventional myosin-1d (MYO1D), mineralocorticoid receptor (NR3C2), geranylgeranyl transferase type-2 subunit-alpha (HABGGTA), and uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats (UACA) were found as putative candidate proteins for OA content. Fatty acid synthase (FASN), tubulin alpha-4A chain (TUBA4A), vinculin (VCL), NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 5 (NDUFAS), and prefoldin subunit 6 (PFDN6) for c9t11-CLA. Our findings contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms behind the regulation of the OA and c9t11-CLA content in cattle skeletal muscle.

Significance: Questions about the association between meat intake and disease incidence in humans has driven animal scientist to pursue a better understanding of the biological processes associated with differences in the intramuscular fat composition. The beneficial effects of oleic acid and conjugated linoleic acid in human health have been demonstrated by improving the immune system and preventing atherosclerosis, different types of cancers, hypertension, and diabetes. Previous genome-wide association and gene expression studies identified genomic regions and differentially expressed genes associated with the fatty acid profile in skeletal muscle. In this work, differences were evaluated at the protein level. The use of a label-free quantitative proteomic approach, compared with muscle transcriptome results obtained by RNA-sequencing, allowed us to earn new insights into the variability in fatty acid deposition in skeletal muscle of farm animals. This study opens new avenues to explore the effect of the fatty acids in the skeletal muscle of livestock animals, which is associated with nutritional values of the meat, and perhaps to understand the mechanisms correlated with metabolic diseases in other species.

Abbreviations: IMF, intramuscular fat; OA, oleic acid; c9t11-CLA, cis-9 trans-11 conjugated linoleic acid; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; HDMS², high definition mass spectrometry; GEBV, genomic estimated breeding values; LD, *Longissimus dorsi*; BFT, backfat thickness; REA, ribeye area; GBLUP, genomic best linear unbiased prediction; DAP, differentially abundant proteins; DEG, differentially expressed genes

* Corresponding author at: “Luz de Queiroz” College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo (USP), Av. Pádua Dias, 11, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil.

E-mail address: lrcoutinho@usp.br (L.L. Coutinho).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103792>

Received 18 January 2020; Received in revised form 9 April 2020; Accepted 19 April 2020

Available online 23 April 2020

1874-3919/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle

Received: 4 May 2018
Accepted: 30 October 2018
Published online: 20 November 2018

Priscila S. N. De Oliveira¹, Luiz L. Coutinho², Polyana C. Tizioto³, Aline S. M. Cesar², Gabriella B. de Oliveira², Wellison J. da S. Diniz⁴, Andressa O. De Lima⁵, James M. Reecy⁶, Gerson B. Mourão¹, Adhemar Zerlotini⁴ & Luciana C. A. Regitano³

Residual Feed Intake (RFI) is an economically relevant trait in beef cattle. Among the molecular regulatory mechanisms, microRNAs (miRNAs) are an important dimension in post-transcriptional regulation and have been associated with different biological pathways. Here, we performed differential miRNAs expression and weighted gene co-expression network analyses (WGCNA) to better understand the complex interactions between miRNAs and mRNAs expressed in bovine skeletal muscle and liver. MiRNA and mRNA expression data were obtained from Nelore steers that were genetically divergent for RFI (N = 10 [low RFI or feed efficient]; N = 10 [high RFI or feed inefficient]). Differentially expressed and hub miRNAs such as bta-miR-486, bta-miR-7, bta-miR15a, bta-miR-21, bta-miR 29, bta-miR-30b, bta-miR-106b, bta-miR-199a-3p, bta-miR-204, and bta-miR 296 may have a potential role in variation of RFI. Functional enrichment analysis of differentially expressed (DE) miRNA's target genes and miRNA-mRNA correlated modules revealed that insulin, lipid, immune system, oxidative stress and muscle development signaling pathways might potentially be involved in RFI in this population. Our study identified DE miRNAs, miRNA - mRNA regulatory networks and hub miRNAs related to RFI. These findings suggest a possible role of miRNAs in regulation of RFI, providing new insights into the potential molecular mechanisms that control feed efficiency in Nelore cattle.

Feed efficiency (FE) and residual feed intake (RFI) have been explored as a mean to improve the efficiency of beef production¹. Feed efficient animals produce fewer pollutants e.g., methane and consume less feed, thereby reducing the cost of beef production, making feed efficiency an economically relevant trait.

Recent functional genomics studies have identified roles for microRNAs (miRNAs) in the regulation of feed efficiency and related-traits^{2,3}. MiRNAs are small non-coding RNAs that are highly conserved between species⁴ and are associated with many important biological processes. Among the regulatory mechanisms, miRNAs have emerged as a new dimension in post-transcriptional regulation in mammals, usually suppressing the translation of their target mRNAs by base-pairing to the 3' untranslated region (UTR)⁵.

In domestic animals, miRNAs have been reported to be key regulators of development of skeletal muscle, fat and mammary tissues, immune response and fertility^{6,7}. Expression-profiling studies of miRNAs in domestic livestock have revealed their tissue-specific and temporal expression pattern, with associations with economic traits, highlighting the potential use of miRNAs in future genomic selection programs⁸. Differences in beef cattle miRNA expression patterns have been identified in animals with divergent RFI, which indicates a potential regulatory role of these molecules on this phenotype¹.

Previous studies using the same Nelore population have identified markers⁹ and differentially expressed genes related to RFI in skeletal muscle⁸ and liver¹⁰. Biological processes such as immune response, lipid and fatty

¹Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil. ²Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil. ³NGS Genomic Solutions, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil. ⁴Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil. ⁵Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, IA, 50011, USA. ⁶Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP, 770901, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.C.A.R. (email: luciana.regitano@embrapa.br)

Apêndice M: “Multi-Omics Approach Reveals miR-SNPs Affecting Muscle Fatty Acids Profile in Nelore Cattle”



Article

Multi-Omics Approach Reveals miR-SNPs Affecting Muscle Fatty Acids Profile in Nelore Cattle

Tainã Figueiredo Cardoso ¹, Luiz Lehmann Coutinho ², Jennifer Jessica Bruscadin ³, Wellison Jarles da Silva Diniz ⁴, Juliana Petrini ², Bruno Gabriel Nascimento Andrade ¹, Priscila Silva Neubern de Oliveira ³, Mirele Daiana Poleti ⁵, Aline Silva Mello Cesar ⁶, Juliano Coelho da Silveira ³, Marcos Roberto Chiaratti ³, Adhemar Zerlotini ⁷, Gerson Barreto Mourão ² and Luciana Correia de Almeida Regitano ^{1,*}

¹ Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, Km 234, s/n, Fazenda Cachim, São Carlos, SP 339, Brazil

² Department of Animal Science, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo/ESALQ, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

³ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP 13565-905, Brazil

⁴ Department of Animal Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58105, USA

⁵ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (USP), Pirassumunga, SP 13635-900, Brazil

⁶ Department of Agri-Food Industry, Food and Nutrition, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo/ESALQ, Piracicaba, SP 13418-900, Brazil

⁷ Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP 13083-886, Brazil

* Correspondence: luciana.regitano@embrapa.br



Citation: Cardoso, T.F.; Coutinho, L.L.; Bruscadin, J.J.; da Silva Diniz, W.J.; Petrini, J.; Andrade, B.G.N.; de Oliveira, P.S.N.; Poleti, M.D.; Cesar, A.S.M.; da Silveira, J.C.; et al. Multi-Omics Approach Reveals miR-SNPs Affecting Muscle Fatty Acids Profile in Nelore Cattle. *Genes* **2021**, *12*, 67. <https://doi.org/10.3390/genes12010067>

Received: 2 December 2020

Accepted: 31 December 2020

Published: 6 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of gene expression, potentially affecting several biological processes, whose function can be altered by sequence variation. Hence, the integration of single nucleotide polymorphisms (SNP) and miRNAs can explain individual differences in economic traits. To provide new insights into the effects of SNPs on miRNAs and their related target genes, we carried out a multi-omic analysis to identify SNPs in miRNA mature sequences (miR-SNPs) associated with fatty acid (FA) composition in the Nelore cattle. As a result, we identified 3 miR-SNPs in different miRNAs (bta-miR-2419-3p, bta-miR-193a-2, and bta-miR-1291) significantly associated with FA traits (p -value < 0.02, Bonferroni corrected). Among these, the rs110817643C>T, located in the seed sequence of the bta-miR-1291, was associated with different ω 6 FAs, polyunsaturated FA, and polyunsaturated:saturated FA ratios. Concerning the other two miR-SNPs, the rs43400521T>C (located in the bta-miR-2419-3p) was associated with C12:0 and C18:1 cis-11 FA, whereas the rs516857374A>G (located in the bta-miR-193a-2) was associated with C18:3 ω 6 and ratio of ω 6/ ω 3 traits. Additionally, to identify potential biomarkers for FA composition, we described target genes affected by these miR-SNPs at the mRNA or protein level. Our multi-omics analysis outlines the effects of genetic polymorphism on miRNA, and it highlights miR-SNPs and target candidate genes that control beef fatty acid composition.

Keywords: polymorphism; association analysis; miRNAs; *Bos indicus*; beef quality

1. Introduction

Fatty acid (FA) composition is an important trait that is largely related to beef's sensorial and nutritional properties. FA biosynthesis processes are complex and dependent on several regulatory mechanisms, such as post-transcriptional gene expression regulation [1]. However, limited knowledge of the genetic mechanisms controlling FA content and the difficulties associated with determining FA composition are restricting genetic progress related to this trait. In this context, Guo et al. [2] and De Oliveira et al. [3] have provided evidence in support of a key regulatory role of miRNAs on adipogenesis and FA composition in cattle.

Apêndice N: “Effects of increasing dietary oil inclusion from different sources on growth performance, carcass and meat quality traits, and fatty acid profile in genetically lean immunocastrated male pigs”

Livestock Science 248 (2021) 104515



Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/livsci



Effects of increasing dietary oil inclusion from different sources on growth performance, carcass and meat quality traits, and fatty acid profile in genetically lean immunocastrated male pigs

V.V. Almeida^a, J.P.M. Silva^b, A.P. Schinckel^c, A.N. Meira^d, G.C.M. Moreira^e, J.D. Gomes^b, M. D. Poleti^f, M.D.B. Dargelio^b, I. Patinho^b, C.J. Contreras-Castillo^b, L.L. Coutinho^d, G. B. Mourão^g, J.M. Reecy^h, D. Koltes^h, N.V.L. Serão^h, L.C.A. Regitano^h, H. Fukumasu^f, A.P. L. Brustoliniⁱ, S.M. Alencar^b, A. Luchiaro Filho^{b,j}, A.S.M. Cesar^{b,k,l,m}

- ^a Department of Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil
- ^b Department of Agri-Food Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil
- ^c Department of Animal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA
- ^d Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil
- ^e Unit of Animal Genetics, University of Liège, Liège, 4000, Belgium
- ^f Department of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Pirassununga, SP, 13635-900, Brazil
- ^g Department of Animal Science, Iowa State University, IA 50011, USA
- ^h Empresa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 13560-970, Brazil
- ⁱ DR Genética Sulina, Povo de Minas, MG, 38706-000, Brazil
- ^j Lindtje, Piracicaba, SP, 13416-030, Brazil

HIGHLIGHTS

- Dietary oil inclusion did not affect growth performance and carcass traits.
- Including 3% soybean (SO) or canola oil (CO) to pig diets reduced loin shear force.
- Diets with 3% SO or CO increased oleic acid content in the intramuscular fat.
- Diets with 3% fish oil decreased n-6:n-3 polyunsaturated fatty acid ratio of fat.
- Greater consumer overall liking score was observed in loins from pigs fed 3% SO.

ARTICLE INFO

Keywords:
Dietary oil sources
Fatty acid composition
Intramuscular fat
Lean growth
Pig
Pork quality

ABSTRACT

A total of 96 genetically lean immunocastrated male pigs were used in a 98-day study to evaluate the effects of including 3% soybean oil (SO), canola oil (CO), or fish oil (FO) in the diets vs. feeding a standard commercial diet with 1.5% SO (control) on growth performance, carcass and meat quality traits, consumer acceptability, and intramuscular fatty acid composition of the *longissimus lumborum* (LL) muscle. Pigs were blocked by initial body weight (BW; 28.44 ± 2.95 kg) and assigned to one of four treatments, with six replicate pens per treatment and four pigs per pen. Pig BW and pen feed disappearance were recorded weekly. At the conclusion of the study, pigs were slaughtered, carcass characteristics were measured, and a sample of the LL was removed for meat quality assessment, fatty acid composition analysis, and overall liking evaluation. Dietary treatments had no effect on overall growth performance and pig carcasses. Although loins from pigs fed diets containing either 3% SO or CO had decreased ($P = 0.05$) Warner-Bratzler shear force, only the addition of 3% SO to pig diets resulted in loin chops that were rated higher ($P < 0.001$) for consumer overall liking. Adding either 3% SO or CO increased ($P < 0.01$) the percentages of oleic acid and total monounsaturated fatty acids in the LL intramuscular fat compared to control- or FO-fed pigs. However, intramuscular fat from 3% SO- or CO-fed pigs had the lowest ($P < 0.01$) proportion of total omega (n)-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) than control- or FO-fed pigs. Including 3% oil, regardless of source, reduced ($P < 0.01$) total PUFA, total n-6 PUFA, and PUFA:saturated fatty acid (SFA)

* Corresponding author
E-mail address: alinescesar@usp.br (A.S.M. Cesar).

<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104515>
Received 22 December 2020; Received in revised form 3 April 2021; Accepted 11 April 2021
Available online 16 April 2021
1871-1413/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apêndice O: “Effects of dietary oil inclusion on meat quality of immunocastrated male pigs”



Revista Brasileira de Agrotecnologia
V. 11, Nº 2, p. 382-385, ANO 2021
Garanhuns, PE, Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas
<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/index>
DOI: 10.18378/REBAGRO.V11I2.8802



EFFECTS OF DIETARY OIL INCLUSION ON MEAT QUALITY OF IMMUNOCASTRATED MALE PIGS

Efeitos da inclusão de óleo dietético na qualidade da carne de suínos machos imunocastrados

Julia D. GOMES¹, Karine A. COSTA², Vivian V. ALMEIDA³, Albino L. FILHO⁴, Simara L. FANALLI⁵, Aline S. M. CESAR^{6*}

ABSTRACT: Diets high in fat have been used in the production of pigs in the growing and finishing stages for the improvement of meat production and quality parameters. Therefore, this study was conducted to evaluate the effect of adding different oil sources to the diet of immunocastrated male pigs on meat quality characteristics. Ninety-six pigs were randomly allotted to one of four dietary treatments, with six replicate pens per treatment and four pigs per pen. Dietary treatments consisted of diets supplemented with 1.5% soybean oil (SO; control) or 3% oil from SO, canola oil (CO), or fish oil (FO). After 98 days on trial, 18 pigs per treatment (n = 72) were slaughtered and samples of the *Longissimus dorsi* muscle were taken for Warner-Bratzler shear force and color (L*, a*, and b*) measurements. Loins from pigs fed diets containing either 3% SO or CO had decreased Warner-Bratzler shear force (P = 0.04) than those from pigs fed the control diet. Dietary treatments had no effect on color components of fresh loin. These results indicate that feeding 3% SO or CO increased pork tenderness, without compromising color meat of immunocastrated male pigs.

Key words: canola oil, fish oil, oleic acid, soybean oil

RESUMO: Dietas ricas em gordura têm sido utilizadas na produção de suínos nas fases de crescimento e terminação para a melhoria dos parâmetros produtivos e de qualidade da carne. Portanto, este estudo foi conduzido para avaliar o efeito da adição de diferentes fontes de óleo à dieta de suínos machos imunocastrados sobre características de qualidade da carne. Noventa e seis animais foram distribuídos aleatoriamente em um de quatro tratamentos dietéticos, com seis baias replicadas por tratamento e quatro suínos por baia. Os tratamentos dietéticos consistiram em dietas suplementadas com 1,5% de óleo de soja (SO; controle) ou 3% de óleo de SO, óleo de canola (CO) ou óleo de peixe (FO). Após 98 dias de experimento, 18 suínos por tratamento (n = 72) foram abatidos e amostras do músculo *Longissimus dorsi* foram coletadas para medidas de força de cisalhamento Warner-Bratzler e cor da carne (L*, a* e b*). O lombo dos animais alimentados com as dietas contendo 3% de SO ou CO diminuíram a força de cisalhamento Warner-Bratzler (P = 0,04) em relação aos alimentados com a dieta controle. Os tratamentos dietéticos não tiveram efeito nos componentes da cor do lombo fresco. Esses resultados indicam que a suplementação com 3% de SO ou CO aumentam a maciez da carne suína, sem comprometer a cor da carne de suínos imunocastrados.

Palavras-chave: óleo de canola, óleo de peixe, óleo de soja, qualidade da carne

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹Undergraduate Student, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, julidezeu@usp.br

²Post-Doctor, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, krynescosta@yahoo.com.br

³Professor, Department of Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil, vivian.almeida@ufg.br

⁴Visiting Researcher, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, Inchiarri@usp.br

⁵Master's Student, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, simaraflanali@usp.br

⁶Professor, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, alinecesar@usp.br

Apêndice P: “Effects of dietary fatty acids on gene expression and biological processes in different tissues of pigs: A Review”

Preprints (www.preprints.org) | NOT PEER-REVIEWED | Posted: 16 November 2021

doi:10.20944/preprints202111.0279.v1

Review

Effects of dietary fatty acids on gene expression and biological processes in different tissues of pigs: A Review

Simara Larissa Fanalli ¹, Bruna Pereira Martins da Silva ¹, Bruna Petry ², Miguel Henrique de Almeida Santana ¹, Guilherme Henrique Gebim Polizel ¹, Robson Carlos Antunes ³, Vivian Vezzoni de Almeida ⁴, Gabriel Costa Monteiro Moreira ⁵, Albino Luchiarri Filho ², Luiz Lehmann Coutinho ², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro ⁶, James Mark Reecy ⁷, James Koltes ⁷, Dawn Koltes ⁷, Aline Silva Mello Cesar ^{1,2*}

¹ Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Campus Fernando Costa, Avenue Duque de Caxias Norte 225, 13635-900, Pirassununga, São Paulo, Brazil; simarafanalli@usp.br; brunamartins@usp.br; mhasantana@usp.br; guilhermo.polizel@usp.br

² Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, Avenue Pádua Dias 11, 13418-900, Piracicaba, São Paulo, Brazil; alinecesar@usp.br; bruna.petry@usp.br; luchiarri@usp.br; lcoutinho@usp.br

³ College of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Avênue Pará 1720, Bloco 2T, 38400902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil; robson.antunes@ufu.br

⁴ Federal University of Goiás, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Science, Highway Goiânia - Nova Veneza, km 8, Campus Samambaia, 74690-900, Goiânia, Goiás, Brazil; vivian.almeida@ufg.br

⁵ University of Liège, GIGA Medical Genomics, Unit of Animal Genomics, Quartier Hôpital, Avenue de l'Hôpital, 11, 4000, Liège, Belgium; gcmmoreira@gmail.com

⁶ College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ/USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, São Paulo, Brazil; balieiro@usp.br

⁷ Iowa State University, College of Agriculture and Life Sciences, Department of Animal Science, 1221, Kildee Hall, 50011-3150, Ames, Iowa, USA; reecy@iastate.edu; delkins@iastate.edu; jkoltes@iastate.edu

* Correspondence: alinecesar@usp.br

Simple Summary: Fatty acids are one of the basic building blocks of lipids. They have a fundamental role in structural and biological functions, e.g. they are an important component of the cell membrane. Studies on the influence of these compounds and their effects on organisms are of great importance. The use of fatty acids in the diet of pigs, an animal model for metabolic diseases that affect humans, brings great advances in several areas and its results have been significant in transcriptomic and nutrigenomic studies. Thus, the objective of this review was to bring together the knowledge about the effects of dietary fatty acids in pigs on biological processes, on product on traits and gene expression.

Abstract: Studies on the influence of dietary components and their effects are fundamental for nutrigenomics, or the study of how nutrients can be cellular sensors, how they affect biological processes and gene expression in different tissues. Lipids are an important source of fatty acids (FA) and energy and are fundamental to biological processes and influence the regulation of transcription. Pigs are excellent model to study nutrigenomics, particularly lipid metabolism because the deposition and composition of FA in their tissues reflect the composition of FA in their diet. Recent studies show that FA supplementation is important in production systems, such as growing and finishing pigs, as it can improve the energy value of the feed, help reduce costs, improve animal welfare, and influence the nutritional value of the meat. Studies show that oleic (OA), linoleic (LA), docosahexaenoic (DHA), and eicosapentaenoic (EPA) acids are associated with the regulation of transcription in tissues such as muscle, liver, adipose tissue, and brain. Other studies indicate that EPA and DHA are associated with changes in specific signaling pathways, altering gene expression and biophysical properties of membranes. This review, therefore, focuses on the current knowledge of the effects of dietary FA on production traits and gene expression.

Keywords: animal model; dietary components; feeding strategy; gene expression; lipid profile; nutrients; nutrigenomic; physiological processes; signaling pathways; transcription.



© 2021 by the author(s). Distributed under a Creative Commons CC BY license.

Apêndice Q: “Effect of the addition of different sources of fatty acids in the pig diet on the transcriptomic profile of different tissues”

Preprints (www.preprints.org) | NOT PEER-REVIEWED | Posted: 10 February 2022

doi:10.20944/preprints202202.0149.v1

Article

Effect of dietary soybean oil inclusion on liver-related transcription factors in a pig model for metabolic diseases

Simara Larissa Fanalli¹, Bruna Pereira Martins da Silva¹, Julia Dezen Gomes², Fernanda Nery Ciconello³, Vivian Vezzoni de Almeida⁴, Felipe André Oliveira Freitas⁵, Gabriel Costa Monteiro Moreira⁴, Bárbara Silva-Vignato⁶, Juliana Afonso⁷, James Reecy⁸, James Koltes⁹, Dawn Koltes⁹, Luciana Correia de Almeida Regitano¹⁰, Julio Cesar de Carvalho Baileiro¹¹, Luciana Freitas¹², Luiz Lehmann Coutinho², Heidge Fukumasu¹, Severino Matias de Alencar², Albino Luchiani Filho², and Aline Silva Mello Cesar^{1,2}

¹Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil; simarafanalli@usp.br; brunamartins@usp.br; fukumasu@usp.br

²Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil; juliadezen@usp.br; fernanda.ciconello@usp.br; felipeoliveira@usp.br; lcoutinho@usp.br;

³malencar@usp.br; luchiani@usp.br; alinecesar@usp.br

⁴Federal University of Goiás, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Goiânia, Goiás, Brazil;

vivian.almeida@ufg.br

⁵University of Liège, GIGA Medical Genomics, Unit of Animal Genomics, Liège, Belgium; gcmmoreira@gmail.com

⁶Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil; julianobio@gmail.com;

luciana.regitano@embrapa.br

⁷Iowa State University, College of Agriculture and Life Sciences, Ames, Iowa, USA; jreecy@astate.edu;

jkoltes@astate.edu; delkin@astate.edu

⁸College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil; baileiro@usp.br

⁹DB Genética de Suínos, Patos de Minas, MG, Brazil; luciana@db.agr.br

Abstract: The objective of this study was to identify key transcription factors involved in lipid metabolism and immune response related to the differentially expressed genes (DEG) from the liver samples of 35 pig model for metabolic diseases fed diets containing either 1.5 or 3.0% soybean oil (SOY1.5 or SOY3.0). A total of 281 DEG between SOY1.5 and SOY3.0 diets (\log_2 fold-change ≥ 1 or ≤ -1 ; FDR-corrected p -value < 0.1) were identified, in which 129 were down-regulated and 152 were up-regulated in SOY1.5 group. The functional annotation analysis detected transcription factors linked to lipid homeostasis and immune response, such as *RXR*, *EGFR*, and *SREBP2* precursor. These findings demonstrated that key transcription factors related to lipid metabolism could be modulated by dietary inclusion of soybean oil. It could contribute to nutrigenomics research field that aims to elucidate dietary interventions in animal and human health, as well as to drive the food technology and science.

Keywords: immune response; fatty acid; lipid metabolism; RNA-Seq; transcriptome.

1. Introduction

Fatty acids (FA) are derived from both animal fats and plant oils, such as soybean, canola, sunflower, corn, and flaxseed [1]. Rich sources of dietary FA have been indicated to be an effective manner of primary prevention health disorders because of their anti-inflammatory effects and cell membrane properties and structure [2]. Essential FA, mainly polyunsaturated fatty acids (PUFA), may modulate gene expression in diverse biological processes thought regulating transcription factors (TF), including peroxisome proliferator receptors (*PPAR*), liver X receptors (*LXR*), and sterol regulatory element binding proteins (*SREBP*) [3].

The soybean oil is considered excellent source of unsaturated FA, such as linoleic acid (LA, C18:2 n-6), alpha-linoleic acid (ALA, C18:3 n-3), oleic acid (OA, C18:1 n-9), and



© 2022 by the author(s). Distributed under a Creative Commons CC BY license.

Apêndice R: “Effect of dietary soybean oil inclusion on liver-related transcription factors in a pig model for metabolic diseases”

Preprints (www.preprints.org) | NOT PEER-REVIEWED | Posted: 10 February 2022

doi:10.20944/preprints202202.0149.v1

Article

Effect of dietary soybean oil inclusion on liver-related transcription factors in a pig model for metabolic diseases

Simara Larissa Fanalli¹, Bruna Pereira Martins da Silva¹, Julia Dezen Gomes², Fernanda Nery Ciconello³, Vivian Vezzoni de Almeida⁴, Felipe André Oliveira Freitas⁵, Gabriel Costa Monteiro Moreira⁴, Bárbara Silva-Vignato⁶, Juliana Afonso⁷, James Reecy⁸, James Koltes⁹, Dawn Koltes⁹, Luciana Correia de Almeida Regitano¹⁰, Julio Cesar de Carvalho Baileiro¹¹, Luciana Freitas¹², Luiz Lehmann Coutinho², Heidge Fukumasu¹, Severino Matias de Alencar², Albino Luchiani Filho², and Aline Silva Mello Cesar^{1,2}

¹Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil; simarafanalli@usp.br; brunamartins@usp.br; fukumasu@usp.br

²Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil; juliadezen@usp.br; fernanda.ciconello@usp.br; felipeoliveira@usp.br; lcoutinho@usp.br;

³malencar@usp.br; luchiani@usp.br; alinecesar@usp.br

⁴Federal University of Goiás, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Goiânia, Goiás, Brazil;

vivian.almeida@ufg.br

⁵University of Liège, GIGA Medical Genomics, Unit of Animal Genomics, Liège, Belgium; gcmmoreira@gmail.com

⁶Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brazil; julianobio@gmail.com;

luciana.regitano@embrapa.br

⁷Iowa State University, College of Agriculture and Life Sciences, Ames, Iowa, USA; jreecy@astate.edu;

jkoltes@astate.edu; delkin@astate.edu

⁸College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil; baileiro@usp.br

⁹DB Genética de Suínos, Patos de Minas, MG, Brazil; luciana@db.agr.br

Abstract: The objective of this study was to identify key transcription factors involved in lipid metabolism and immune response related to the differentially expressed genes (DEG) from the liver samples of 35 pig model for metabolic diseases fed diets containing either 1.5 or 3.0% soybean oil (SOY1.5 or SOY3.0). A total of 281 DEG between SOY1.5 and SOY3.0 diets (\log_2 fold-change ≥ 1 or ≤ -1 ; FDR-corrected p -value < 0.1) were identified, in which 129 were down-regulated and 152 were up-regulated in SOY1.5 group. The functional annotation analysis detected transcription factors linked to lipid homeostasis and immune response, such as *RXR*, *EGFR*, and *SREBP2* precursor. These findings demonstrated that key transcription factors related to lipid metabolism could be modulated by dietary inclusion of soybean oil. It could contribute to nutrigenomics research field that aims to elucidate dietary interventions in animal and human health, as well as to drive the food technology and science.

Keywords: immune response; fatty acid; lipid metabolism; RNA-Seq; transcriptome.

1. Introduction

Fatty acids (FA) are derived from both animal fats and plant oils, such as soybean, canola, sunflower, corn, and flaxseed [1]. Rich sources of dietary FA have been indicated to be an effective manner of primary prevention health disorders because of their anti-inflammatory effects and cell membrane properties and structure [2]. Essential FA, mainly polyunsaturated fatty acids (PUFA), may modulate gene expression in diverse biological processes thought regulating transcription factors (TF), including peroxisome proliferator receptors (*PPAR*), liver X receptors (*LXR*), and sterol regulatory element binding proteins (*SREBP*) [3].

The soybean oil is considered excellent source of unsaturated FA, such as linoleic acid (LA, C18:2 n-6), alpha-linoleic acid (ALA, C18:3 n-3), oleic acid (OA, C18:1 n-9), and



© 2022 by the author(s). Distributed under a Creative Commons CC BY license.

Apêndice S: “Fatty acid profile in brain and hepatic tissues from pigs supplemented with canola oil”



Revista Brasileira de Agrotecnologia
V. 11, Nº 2, p. 414-420, ANO 2021
Garanhuns, PE, Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas
<https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/index>
DOI: 10.18378/REBAGRO.V11I2.8736



FATTY ACID PROFILE IN BRAIN AND HEPATIC TISSUES FROM PIGS SUPPLEMENTED WITH CANOLA OIL

Perfil de ácidos graxos nos tecidos cerebral e hepático de suínos suplementados com óleo de canola

Julia P. M. SILVA, Karine A. COSTA², Vivian V. ALMEIDA³, Luiz L. COUTINHO⁴, Bruna P. M. Silva⁵, Aline S. M. CESAR^{6*}

ABSTRACT: Canola oil is an important source of oleic acid, in addition to being an accessible source for its use in the production of pigs' diets. Oleic acid in turn is a type of unsaturated fatty acid that in pork is beneficial for human health. Therefore, this study was conducted to describe the fatty acid profile in brain and liver tissues from pigs supplemented with canola oil for 98 days, during the growth and finishing phases. For the analysis was used eighteen male pigs that had free access to feed and water throughout the experimental period. Dietary treatment consisted of corn-soybean meal growing-finishing diets supplemented with 3% fat from canola oil (CO). To obtain the fatty acid profile, the lipids from each tissue were cold extracted using the adapted method from Bligh and Dyer, methylated, and posteriorly injected in a gas chromatograph to obtain the fatty acid profile of the tissue. In both tissues there was a greater abundance of saturated fatty acids (stearic acid). The most abundant monounsaturated fatty acid was the oleic acid. Regarding polyunsaturated fatty acids, in the liver the most abundant was linoleic acid and in the brain docosahexaenoic acid. In summary, animals' diet influences the fatty acid profile in different tissues. Such modifications can increase unsaturated fatty acids concentration in relation to saturated, making pork healthier for human consumption.

Key words: human health, liver, healthy pork, oleic acid

RESUMO: O óleo de canola é uma fonte importante de ácido oleico, além de ser uma fonte acessível para utilização nas dietas de suínos. O ácido oleico, por sua vez, é um tipo de ácido graxo insaturado que, na carne suína, é benéfico para a saúde humana. Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo de descrever o perfil de ácidos graxos nos tecidos cerebral e hepático de suínos suplementados com óleo de canola por 98 dias, nas fases de crescimento e terminação. Para análise foram utilizados dezoito machos que tiveram livre acesso a ração e água durante todo o período experimental. O tratamento dietético consistiu em dietas de crescimento e terminação de farelo de milho/soja suplementadas com 3% de óleo de canola (CO). Para obtenção do perfil de ácidos graxos, os lipídios de cada tecido foram extraídos a frio pelo método adaptado de Bligh e Dyer, e posteriormente, as amostras foram inseridas em um cromatógrafo a gás para obtenção do perfil de ácidos graxos do tecido. Em ambos os tecidos houve maior abundância de ácidos graxos saturados (ácido esteárico). O ácido graxo monoinsaturado mais abundante foi o ácido oleico. Em relação aos ácidos graxos poli-insaturados, no fígado o mais abundante foi o ácido linoléico e no cérebro o ácido docosahexaenoico. Em resumo, a dieta dos animais influencia no perfil dos ácidos graxos em diferentes tecidos. Tais modificações podem aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, tornando a carne suína mais saudável para o consumo humano.

Palavras-chave: saúde humana, fígado, carne suína saudável, ácido oleico

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹Undergraduate Student, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, juliamartins@usp.br

²Post-Doctor, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, kryneacosta@yahoo.com.br

³Professor, Department of Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil, vivian.almeida@ufg.br

⁴Professor, Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, lcoutinho@usp.br

⁵Master's Student, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, brunamartins@usp.br

⁶Professor, Department of AgriFood Industry, Food and Nutrition, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900, Brazil, alinecesar@usp.br