

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DE CARNE E PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE
CORDEIROS ALIMENTADOS COM MELAÇO DE SOJA EM
CONFINAMENTO**

**Sérgio Antônio Garcia Pereira Junior
Zootecnista**

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUALIDADE DE CARNE E PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE
CORDEIROS ALIMENTADOS COM MELAÇO DE SOJA EM
CONFINAMENTO**

Sérgio Antônio Garcia Pereira Junior

Orientadora: Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel

Coorientador: Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida

Coorientadora: Dra. Márcia Helena Machado Rocha Fernandes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia (Nutrição e Alimentação Animal).

2023

P436q	Pereira Junior, Sérgio Antonio Garcia Qualidade de carne e perfil transcriptômico de cordeiros alimentados com melaço de soja em confinamento / Sérgio Antonio Garcia Pereira Junior. -- , 2023 120 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Orientadora: Jane Maria Bertocco Ezequiel Coorientador: Marco Túlio Costa Almeida 1. Nutrição Ruminantes. 2. Qualidade de Carne. 3. Transcriptômica. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DE IMPACTO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do subproduto melaço de soja em agregar qualidade à carne de cordeiros, na substituição do milho. Uma vez que o milho é um grão nobre que participa de forma ativa na alimentação de outras espécies não ruminantes e na espécie humana. Portanto, estudos que mostrem vantagens na substituição de ingredientes nobres por subprodutos reduz sua competição. Além do mais, estudos anteriores encontraram vantagens na utilização do melaço de soja na dieta dos cordeiros, que tiveram carne mais macia e mais marmorizada, atributos altamente valorizados pelo mercado de carne gourmet. Por estas razões, o estudo em questão possui contribuição na ciência aplicada na forma de utilidade prática, no campo, como também na ciência básica, ao elucidar os mecanismos metabólicos do músculo esquelético influenciados pela manipulação dietética.

IMPACT RECORD

The present study aims to evaluate the potential of soy molasses by-product to enhance the quality of lamb meat when substituting corn. Given that corn is a valuable grain actively used in the diet of non-ruminant species and humans, studies demonstrating advantages in replacing premium ingredients with by-products reduce their competition. Furthermore, previous research has found benefits in using soy molasses in the lamb's diet, resulting in tender and well-marbled meat, which are highly valued attributes in the gourmet meat market. For these reasons, this study contributes to applied science by providing practical utility in the field and also contributes to basic science by elucidating the metabolic mechanisms of skeletal muscle influenced by dietary manipulation.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: QUALIDADE DE CARNE E PERFIL TRANSCRITÔMICO DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM MELAÇO DE SOJA EM CONFINAMENTO

AUTOR: SÉRGIO ANTONIO GARCIA PEREIRA JUNIOR

ORIENTADORA: JANE MARIA BERTOCCO EZEQUIEL

COORIENTADOR: MARCO TÚLIO COSTA ALMEIDA

COORIENTADORA: MÁRCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCO TÚLIO COSTA ALMEIDA (Participação Virtual)
Universidade Federal do Espírito Santo UFES / AlegreES

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCO TULIO COSTA ALMEIDA
Data: 08/02/2023 19:16:22-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dr. MARCOS ROBERTO CHIARATTI (Participação Virtual)
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCOS ROBERTO CHIARATTI
Data: 09/02/2023 07:08:46-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dr. RICARDO PERECIN NOCITI (Participação Virtual)
FZEA/USP / Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br RICARDO PERECIN NOCITI
Data: 09/02/2023 12:26:21-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Profa. Dra. ROSEMARY LAIS GALATI (Participação Virtual)
Universidade Federal de Mato Grosso / Cuiabá/MT

Documento assinado digitalmente
gov.br ROSEMARY LAIS GALATI
Data: 08/02/2023 19:25:41-0300
Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Assoc. DANILO DOMINGUES MILLEN (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT - UNESP - Dracena

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Sérgio Antonio Garcia Pereira Junior – nascido no dia 24 de outubro de 1993 no município de Cuiabá, capital do estado Mato Grosso. Iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Mato Grosso, em 05 de março de 2012. Durante o curso de graduação foi bolsista de monitoria da disciplina Monitoria Comparada dos Animais Domésticos I por um período de um ano e logo após iniciou na pesquisa acadêmica como estagiário voluntário e posteriormente bolsista de iniciação científica em Nutrição e Avaliação de Alimentos para Ruminantes, sob coordenação da Profa. Dra. Rosemary Laís Galati. Em fevereiro de 2017 ingressou no curso de mestrado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal-SP, sob orientação da Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel e coorientação do Prof. Dr. Eric Haydt Castello Branco van Cleef, recebendo o título de mestre em abril de 2019. Em agosto do mesmo ano iniciou o doutorado em Zootecnia na mesma instituição sob orientação da mesma professora e coorientação do Prof. Dr. Marco Túlio Costa Almeida e Dra. Márcia Helena Machado Rocha Fernandes.

Dedico

Aos meus pais, **Sérgio e Elaine,**

que sempre foram meus apoiadores durante todo o processo da
minha formação.

Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me projetar cada vez mais longe.

Aos meus pais, Sérgio e Elaine e minha irmã Maria Eduarda, que nunca deixaram de me apoiar.

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

Aos amigos que também fizeram e muita diferença Edson, Erika, Ingrid Paloma, Julia, Juliana, Kênia, Laís, Marina, Palloma, Rayanne e Rodrigo.

Aos professores e doutores que me auxiliaram na interpretação dos dados de sequenciamento, Prof Marcos Chiaratti e Dr Ricardo Nociti.

Ao Carlos Conte e João que me deram apoio imprescindível na condução do experimento a campo.

Meu sincero agradecimento

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO.	iv
ABSTRACT .	v
CAPÍTULO 1	1
1. Produção de carne ovina no Brasil	1
2. Qualidade da carne ovina	2
3. Caracterização do melaço de soja	4
3.1. Toxicidade do melaço de soja	6
3.2. Potencialidades de uso do melaço de soja na produção de ruminantes	7
4. Efeito nutricional sobre a expressão gênica	9
4.1. Melaço de soja como agregador de qualidade de carne	12
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 - Potencial lipogênico do melaço de soja na dieta de cordeiros machos em terminação	23
Introdução	24
Material e Métodos	25
- Animais, dietas e delineamento experimental	25
- Consumo alimentar e desempenho animal	27
- Análises de composição químico-bromatológicas	27
- Parâmetros sanguíneos	29
- Abate, características de carcaça e amostragem de carne	29
- Análises físicas na carne	31
- Análises químicas na carne	31
- Vida de prateleira – “Shelf life”	32
- Celularidade de adipócitos	33
- Extração de RNA, análise qualitativa, biblioteca e sequenciamento	33
- Identificação de genes diferencialmente expressos	35
- Análise de co-expressão em fatores de transcrição	35
- Análise estatística	35
Resultados	36
- Consumo alimentar e desempenho animal	37
- Parâmetros sanguíneos	38
- Características de carcaça e qualidade da carne	38
- Vida de prateleira – “Shelf life”	39
- Celularidade de adipócitos	40
- Avaliação geral da expressão gênica	41
- Expressão gênica diferencial	41
- Análise de co-expressão e fatores de transcrição	42
Discussão	45
Conclusão	50

Referências	50
CAPÍTULO 3 – Efeito do melaço de soja na qualidade da carne e perfil do transcriptoma muscular de cordeiros castrados em sistema de confinamento	69
Introdução	70
Material e Métodos	71
- <i>Animais, dietas e delineamento experimental</i>	71
- <i>Consumo alimentar e desempenho animal</i>	73
- <i>Análises de composição químico-bromatológicas</i>	73
- <i>Parâmetros sanguíneos</i>	75
- <i>Abate, características de carcaça e amostragem de carne</i>	75
- <i>Análises físicas na carne</i>	76
- <i>Análises químicas na carne</i>	77
- <i>Vida de prateleira – “Shelf life”</i>	78
- <i>Celularidade de adipócitos</i>	79
- <i>Extração de RNA, análise qualitativa, biblioteca e sequenciamento</i>	79
- <i>Identificação de genes diferencialmente expressos</i>	80
- <i>Análise de co-expressão em fatores de transcrição</i>	81
- <i>Análise estatística</i>	81
Resultados	82
- <i>Consumo alimentar e desempenho animal</i>	82
- <i>Avaliação geral da expressão gênica</i>	86
- <i>Análise de expressão diferencial e fatores de transcrição</i>	86
Discussão	88
Conclusão	91
Referências	91
CAPÍTULO 4 – Considerações finais	106

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do melaço de soja em substituição ao milho sobre a qualidade da carne de cordeiros mestiços terminados em confinamento"**, protocolo nº 002583/20, sob a responsabilidade da Profª Drª Jane Maria Bertocco Ezequiel, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 12 de março de 2020.

Vigência do Projeto	01/04/2020 a 01/04/2022
Espécie / Linhagem	<i>Ovis aries</i>
Nº de animais	40 cordeiros
Peso / Idade	~18 Kg / 2 meses
Sexo	Machos inteiros e castrados
Origem	Aquisição de fazenda comercial

Jaboticabal, 12 de março de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

QUALIDADE DA CARNE E PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM MELAÇO DE SOJA EM CONFINAMENTO

RESUMO – O melaço de soja (MSO) é um subproduto da soja com baixo custo e alto rendimento de produção com potencial efeito em agregar qualidade à carne de cordeiros. Portanto, o objetivo com este estudo é investigar o potencial do subproduto sobre os parâmetros de carcaça e qualidade da carne de cordeiros em confinamento, sobretudo seu potencial em regular fatores de transcrição gênica relacionados à deposição de gordura. Foram utilizados quarenta cordeiros machos, sendo vinte não castrados e vinte castrados cirurgicamente e, distribuídos aleatoriamente em duas dietas experimentais (CON – 0 g/kg de MSO e M20 – 200 g/kg de MSO), o período experimental teve duração de 76 dias. No momento do abate foi avaliada a carcaça dos animais e coletado amostras do músculo *Longissimus thoracis* fresco para avaliação do transcriptoma por meio de RNA-seq e amostras de gordura subcutânea e músculo na altura da 12^a costela para avaliação de celularidade de adipócitos. Após refrigeração de 24h, foram coletadas amostras do mesmo músculo de ambos os lados da carcaça para avaliação física e composição química da carne. Os efeitos do MSO foram avaliados de forma separada para cada categoria sexual. A inclusão do MSO não influenciou o desempenho, carcaça e carne dos cordeiros não castrados, contudo aumentou o peso do fígado em proporção ao peso corporal, aumentou a circulação sanguínea de triglicerídeos totais e o tamanho das células adiposas subcutâneas. Enquanto nos animais castrados, o MSO aumentou a circulação de ureia no sangue, reduziu a glicose e aumentou a deposição de gordura subcutânea, bem como o tamanho das suas células adiposas além de melhorar a durabilidade da carne ao reduzir os teores de malonaldeído. O perfil do transcriptoma do músculo nos animais não castrados, demonstraram que a maior circulação de triglicerídeos altera a sinalização à insulina no músculo, enquanto para os cordeiros castrados a inclusão do MSO aumenta a expressão de genes envolvidos no metabolismo da frutose, *HK2*. E a dieta CON aumenta a expressão de genes envolvidos na oxidação lipídica como o *ACOX2* e *LPL*, o que leva a menores deposições de gordura na carcaça em comparação à MS20. Portanto, o efeito do MSO na carne de cordeiros em confinamento neste estudo está mais atrelado a reduções na oxidação lipídica do músculo melhorando o balanço entre síntese e oxidação.

Palavras-chave: Lipogênese, RNA-seq; subproduto.

MEAT QUALITY AND TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF LAMBS FED SOYBEAN MOLASSES IN FEEDLOT

ABSTRACT – Soybean molasses (SM) is a soybean by-product with low production cost and high production yield with potential effect in adding quality to lamb meat. Therefore, the aim of this study is to investigate the potential of the by-product on carcass traits and meat quality of feedlot lambs, especially its potential to modulate gene expression related to fat deposition. Forty male lambs were used, twenty non-castrated and twenty surgically castrated and randomly distributed in two experimental diets (CON – 0 g/kg of SM and SM20 – 200 g/kg of SM), the experimental period lasted 76 days. At the time of slaughter, the animals' carcasses were evaluated and samples of fresh *Longissimus thoracis* muscle were collected for transcriptome evaluation by RNA-seq and samples of subcutaneous fat and muscle at the height of the 12th rib for evaluation of adipocyte cellularity. After 24 hours of refrigeration, samples of the same muscle were collected from both sides of the carcass for physical evaluation and chemical composition of the meat. The effects of SM were evaluated separately for each sex category. The inclusion of SM did not influence the performance, carcass traits and meat of non-castrated lambs, however it increased liver weight in proportion to body weight, increased blood circulation of total triglycerides and the size of subcutaneous adipose cells. While in castrated animals, SM increased the circulation of urea seric, decreased glucose and increased subcutaneous fat deposition, as well as the size of their adipose cells, and improved meat shelf life by reducing TBARS content. The profile of the muscle transcriptomic in non-castrated animals demonstrated that the greater circulation of triglycerides alters insulin signaling pathway in the muscle, while for castrated lambs the inclusion of SM increases the gene expression of genes involved in fructose metabolism, as *HK2*. And the CON diet increases the gene expression of genes involved in lipid oxidation such as *ACOX2* and *LPL*, which leads to less fat deposition in the carcass. Therefore, the effect of SM on meat from feedlot lambs in this study is more linked to reductions in muscle lipid oxidation, improving the balance between synthesis and oxidation.

Keywords: By-product, lipogenesis, RNA-seq.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Produção de carne ovina no Brasil

O sistema de produção de ovinos no Brasil possui rebanho ovino com mais de 20 milhões de cabeças, estimado no ano de 2020, com crescimento modesto nos últimos anos, em que a região Nordeste continua como a mais produtora seguida pela região Sul (IBGE, 2021). Tal crescimento não tem acompanhado a demanda dos consumidores pela carne ovina no país, que atualmente é de 0,6 kg/capita com crescimento de cerca de 1,99% ao ano, levando à importação da carne ovina em volumes anuais de 3 mil ton entre 2019 e 2021, o que demonstra potencial a ser explorado dentro da cadeia de ovinocultura (OECD-FAO, 2022).

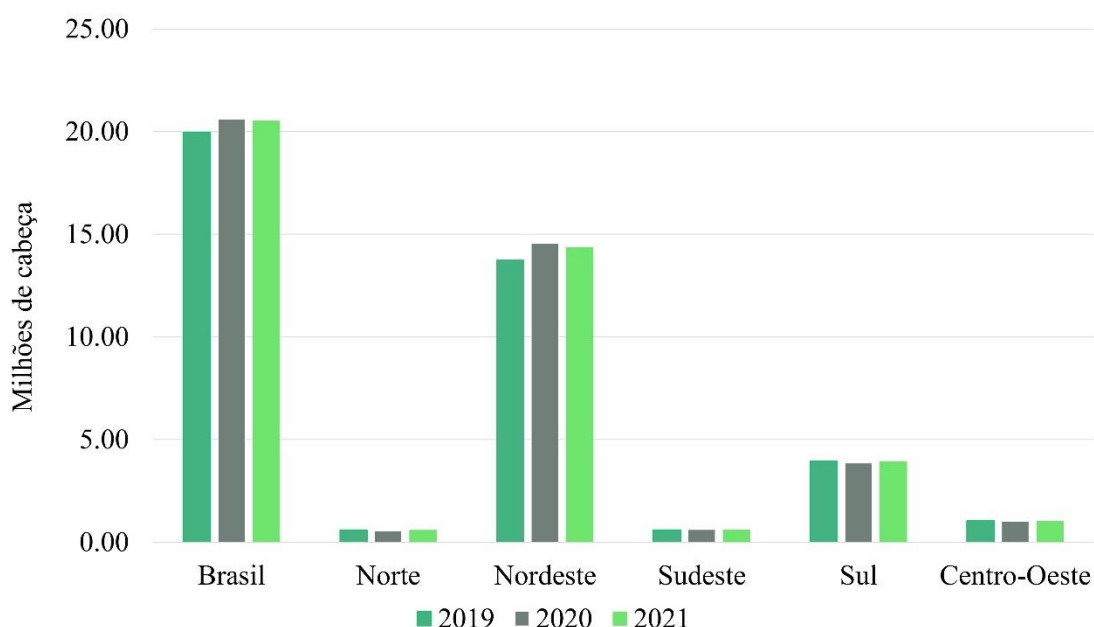


Figura 1 – Crescimento do rebanho efetivo ovino em cabeças de 2019 a 2021 (IBGE)

A categoria animal cordeiros refere-se aos animais jovens, dentes de leite e sem queda das pinças (Vaz, 2007; Gonzaga et al., 2018). Sua carne é considerada exótica, de textura macia e lisa, com coloração rosada e consistência firme. Além de possui concentração média de 143 mg/100g de ácidos graxos poli-insaturados da família ω -3 (Howe et al., 2007), cujas propriedades são amplamente relatadas, como

benefícios contra doenças cardíacas, de pele, asma, artrite, nefrite, esclerose múltipla entre outras (Abedi e Sahara, 2014).

A maior demanda pelo mercado consumidor de carne ovina é justificada pela qualidade nutricional que a carne oferece, atrelada às mudanças no padrão de consumo da população, a exemplo da atenção com a saúde e bem-estar, o qual tem feito o consumidor procurar assiduamente restaurantes ou boutiques especializadas na comercialização de produtos ovinos nos grandes centros, cidades turísticas e litorâneas (Lucene et al., 2018). Além do crescente número de “steak houses” que oferecem carnes e hambúrgueres de carnes diferenciadas, sendo conhecido como mercado gourmet (Leonelli et al., 2016).

2. Qualidade da carne ovina

Apesar do cordeiro ser a categoria animal que proporciona carne de melhor qualidade, com maiores rendimentos de carcaça e maior eficiência de produção (Pires et al., 2000), a produção nacional tem ofertado muito pouco desta categoria animal, não atendendo os grandes centros urbanos do país, que tem procurado e pagado por carne de cordeiro jovem e com bom acabamento (Zanette et al., 2012). Deste modo, restaurantes e boutiques de carne possuem preferência por importar e congelar suas carnes para que possam garantir o produto ofertado em seus estabelecimentos (Fernandes et al., 2014), uma vez que no produto nacional não há regularidade na oferta, devido ao predominante sistema extensivo que retarda o abate do animal e leva à uma despadronização na carcaça, desfavorecendo a cadeia produtiva da ovinocultura (Brasil, 2017).

De acordo com Gonzaga et al. (2018) a qualidade da carne de cordeiros pode ser definida mediante seu aspecto sanitário, coloração da carne e gordura, quantidade de gordura intermuscular, intramuscular (marmoreio) e de cobertura (subcutânea), associada aos atributos sensoriais como aroma, textura, sabor e flavor. Muitos dos consumidores contestam sobre a textura e o odor forte da carne ovina, atrelados à ácidos graxos ramificados como o 4-metiloctanoico, todavia estas características são inerentes aos animais adultos e velhos (carneiros e ovelhas), enquanto os cordeiros demonstram quantidades significativamente menores, justamente por ainda estarem

em fase de crescimento muscular e não terem atingido a maturidade fisiológica (Sutherland e Ames, 1996; Fiems et al., 2000).

Outro ponto discutido é a castração dos animais, a qual muitas vezes é utilizada como uma forma de reduzir a agressão dos machos e facilitar o seu manejo e principalmente agregar qualidade à carne (Mahgoub et al., 1997). Em bovinos a castração é amplamente relacionada a maiores quantidades de marmoreio, maciez, intensidade de vermelho e luminosidade, além de menor perda por cocção, menores quantidades de colágeno e comportamento sexual (Mach et al., 2009; Nian et al., 2018). Enquanto na espécie ovina, a castração pode ser considerada até mesmo desnecessária devido a idade ao abate ser bem cedo nestes animais, por volta dos 6 meses de idade (Fernandes Junior, 2021), o que configura uma carne de boa qualidade. Ainda assim, mesmo em cordeiros a castração continua sendo associada à maiores deposições de gordura na carcaça (Sales et al., 2014), haja vista que a quantidade de gordura intramuscular é influenciada por idade, raça, peso ao abate, dieta e taxa de crescimento (Pewan et al., 2020). Kelly e Jones (2013) relatam que a sensibilidade à insulina é reduzida na ausência da testosterona, demonstrando uma função chave do hormônio no metabolismo da glicose e lipídeo. Os hormônios gonadais são importantes no crescimento pois aumentam a eficiência de utilização do nitrogênio dietético (Lawrence e Fowler, 2002), o que justifica a menor eficiência alimentar de animais castrados.

Dada a importância de carcaças padronizadas com elevados padrões de qualidade de carne, ovinocultores tem investido na fase de terminação dos cordeiros, optando por utilizar o sistema de confinamento, com duração de até 80 dias ao qual os cordeiros desmamados entram com peso médio inicial de 15 a 20 kg com ganhos diários médio de 250 g (Gallo et al., 2014). A associação do sistema de terminação com dietas de alta energia proporcionam adequada deposição de gordura (Osório et al., 2009), ocasionando melhor acabamento na carcaça e deposição de gordura de marmoreio. A aceitação dos consumidores de carne de cordeiros aumenta significativamente quando possui cerca de 3% de gordura intramuscular, e alcança sua máxima aceitação com 4% (Realini et al., 2021).

Além disso, o confinamento possui inúmeras vantagens, sendo a redução na idade de abate, aumento na disponibilidade de forragem para as demais categorias

animais, agilidade de retorno do capital investido, maior produção de carne de qualidade, entre outros (Martins et al., 2009). Contudo, um de seus maiores desafios é a redução dos custos da produção, uma vez que todo o alimento ingerido pelos animais é fornecido mediante cocho, portanto, a avaliação de coprodutos e subprodutos que possam reduzir os altos custos com a alimentação, mantendo ganhos satisfatórios para os animais, são extremamente relevantes e pertinentes.

Neste cenário se encontra o melaço de soja (MSO), que apresenta alto potencial de incorporação na nutrição de ruminantes, porém ainda é pouco explorado. Seu uso na alimentação de ruminantes tem sido relatado pela substituição aos grãos energéticos, como o milho ou sorgo, aumentando ou evitando a queda no consumo de MS por meio da melhora na aceitabilidade e aproveitamento do volumoso da dieta (van Cleef et al., 2018a; van Cleef et al., 2018b). A inclusão deste subproduto em dietas comerciais é relatada de 6 e 20% na MS para dietas de adaptação e terminação respectivamente (Brum, 2015). No entanto, os baixos números de pesquisas com este subproduto contribuem para ainda existirem muitos questionamentos sem respostas plausíveis, o que perduram incertezas sobre os efeitos de sua utilização. Portanto, a necessidade de estudos com o melaço de soja na dieta de cordeiros é uma realidade para que se possa otimizar o uso deste subproduto na alimentação dos ruminantes, que cresce a cada dia no Brasil.

3. Caracterização do melaço de soja

O melaço de soja é um subproduto da soja com aparência que se assemelha a um xarope castanho viscoso com sabor agri-doce (Chajuss, 2004). Sua obtenção é mediante a extração dos carboidratos contidos no farelo de soja desengordurado (Figura 1). Ao dissolver o farelo em soluções de água e álcool duas misturas são formadas, uma mais sólida que origina o concentrado proteico de soja com maior concentração de proteínas, e, outra mais líquida contendo os carboidratos simples, essa mistura é submetida a evaporação e destilação para que se recupere a água e álcool, respectivamente, originando assim o melaço de soja (Chajuss, 2004; Silva et al., 2012). Com alta produção e baixo custo comercial, são produzidos cerca de 216 mil tonelada-ano no Brasil (Rodrigues et al., 2020) a um custo de R\$ 430,00 a ton. Se

não aproveitado e descartado indevidamente ao meio ambiente, o subproduto pode vir a ser um problema ambiental por sua alta quantidade de compostos orgânicos que pode contaminar os rios e lençóis freáticos por eutrofização (Schopf et al., 2014).

Por se tratar de um ingrediente líquido o seu transporte e armazenamento é feito em reservatórios IBC (Intermediate Bulk Container) com capacidade de armazenamento de mil litros. Com durabilidade do subproduto preconizada pelas empresas que o comercializam de 6 meses.

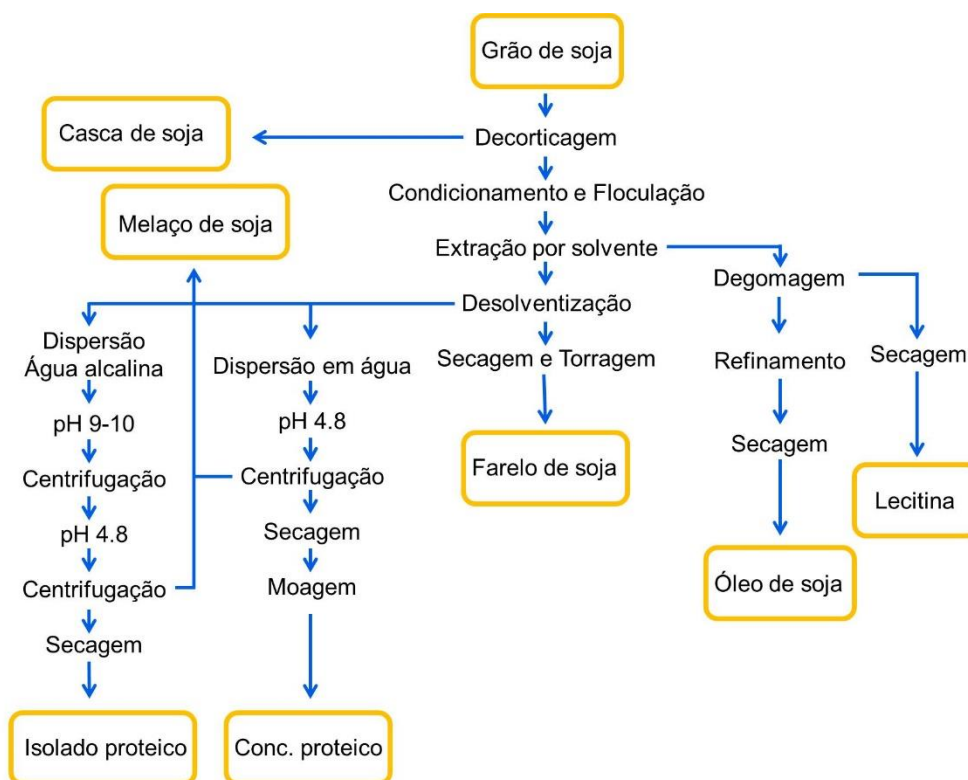


Figura 1 – Processamento da soja para obtenção dos seus produtos e subprodutos. Pereira Junior, 2019.



Figura 2 – Foto ilustrativa do melaço de soja armazenado em reservatório IBC. Arquivo pessoal.

Diversos estudos são realizados para encontrar o melhor aproveitamento do melaço de soja como, processos fermentativos, produção de etanol, biogás e alimentação animal (Siqueira et al., 2008; Yang et al., 2018; Rodrigues et al., 2020; Rodrigues et al., 2021). Embora seja comum o uso em dietas de confinamentos comerciais, como um ingrediente que agrega aceitabilidade, há poucos trabalhos na literatura, mesmo que destacando a alimentação de ruminantes como sua principal utilização (Siqueira et al., 2008). O melaço de soja, como qualquer outro subproduto, apresenta variações na composição, numa amplitude de 6 a 10% para proteínas, até 20% de lipídeos, 6 a 10% para minerais, 40 a 60% para carboidratos e baixos teores de fibras (0,1%). Dentro da composição de carboidratos se destacam a glicose (4%), frutose (4%), rafinose (11,5%), sacarose (38,5%) e estaquiose (42%) (Kinney et al., 2003; Fernandes e Miguel, 2011).

3.1. Toxicidade do melaço de soja

A preocupação com a intoxicação alimentar é um tópico que deve ser sempre analisado, principalmente quando se trata de um novo ingrediente com escassa

literatura. No caso do MSO as suas preocupações estão relacionadas a composição dos oligossacarídeos como rafinose e estaquiose, a elevada concentração de potássio e presença de etanol residual. Os oligossacarídeos da soja (rafinose e estaquiose) são prejudiciais aos animais não ruminantes, uma vez que aves e mamíferos não possuem a habilidade de produzir enzimas que degradem a ligação α 1-6 galactosidase, ocasionando problemas metabólicos como diarreia e flatulência (Choct et al., 2010), o que é facilmente contornado pelos ruminantes por antes de chegarem ao lúmen intestinal é primeiramente degradado pela microbiota ruminal. Os níveis de potássio no subproduto são relativamente altos (2,09%), mas não chega a ser um problema até os níveis de inclusão testados (30%), pois não atingiram os níveis máximos dietéticos (1,73 g/kg PC) que causariam intoxicação (Neathery et al., 1979; Pereira Junior, 2019).

A presença de etanol residual também pode vir a ser um problema, pois causa intoxicação e danos neurológicos (Trujillo et al., 2018), contudo tal ocorrência será atrelada à problemas de lotes de fabricação, pois o etanol é facilmente recuperado por destilação. Portanto, o melaço de soja, assim como qualquer outro coproduto, subproduto ou resíduo que tenha o etanol constituído em qualquer parte que seja do seu processo na indústria, deve ser inspecionado no momento do recebimento, presença de odor alcóolico sinaliza que o produto não deve ser fornecido aos animais antes de ser colocado em local ventilado para que haja evaporação alccolica.

Associações de polioencefalomalácia em ruminantes com a utilização de melaço nas dietas, em geral, não podem ser aplicadas ao subproduto da soja, uma vez que a patologia possui como causa mais aceita àquelas associadas ao excesso de consumo de enxofre presente na dieta (Sant'Ana e Barros, 2010), e no caso do MSO a sua extração não é feita com nenhum solvente a base de enxofre, como é o caso dos grãos de destilaria do milho (Uwituze et al., 2011).

3.2. Potencialidades de uso do melaço de soja na produção de ruminantes

Os resultados obtidos na literatura com a utilização de melaço de soja na dieta de ruminantes embora não sejam numerosos, mas demonstram ser uma boa alternativa ao trivial. Ao avaliarem um melaço de soja mais rico em proteína (20,9%

PB), em níveis de 2 e 4% de inclusão na MS na dieta de bovinos de corte, Schoenholz et al. (1999) relataram que o melaço de soja suporta em 55% a mais o crescimento microbiano do que o farelo de soja, em condições limitantes de N, devido a sua maior proporção de proteína prontamente disponível.

Já Bitencourt (2012) ao avaliar a inclusão de melaço de soja em 4, 5 e 9% na MS em substituição ao milho reidratado e ensilado, encontrou melhora no ambiente ruminal ao aumentar o pH do rúmen de vacas em lactação, fortalecendo teorias como: 1) o açúcar fornece menores quantidades de carbono doador de prótons por unidade de massa que o amido (Hall e Herejk, 2001); 2) os açúcares solúveis podem ser incorporados e convertidos pelos microrganismos ruminais a glicogênio, estocando energia para momentos de escassez (Hall e Weimer, 2007) e por último, 3) a suplementação com açúcares aumenta a produção de ácido butírico no rúmen (Oba et al., 2015), reduzindo a produção de prótons por unidade de matéria orgânica degradada, uma vez que 1 mol de hexose gera 1 mol de ácido butírico ou 2 moles de ácido acético e propiônico (Van Soest, 1994).

Ao avaliar níveis crescentes de melaço de soja na dieta de ovelhas adultas, Schultz et al. (2020) incluiu 0, 3, 6, 9 e 12% na MS e observou aumento no consumo de proteína bruta, mas sem restrições sobre digestibilidade aparente e comportamento ingestivo das ovelhas. Em estudo com vacas leiteiras, Miletic et al. (2017) avaliaram o desempenho dos animais com a inclusão de 3,5% de melaço de soja na MS, e observaram que a inclusão do subproduto aumentou o rendimento do leite em gordura corrigida para 4%, concentração e rendimento de proteína do leite, além de melhorar a eficiência alimentar dos animais.

Em recente estudo realizado por van Cleef et al. (2018b) com inclusões de 0, 10 e 20% na MS em substituição ao milho, foi constatado em ensaios *in vitro* maior digestibilidade da MS e menor produção de metano e dióxido de carbono por grama de MS degradada. Com os mesmos níveis de inclusão, em ensaio *in vivo* em ovinos, não foram encontrados efeitos sob os parâmetros ruminais, sugerindo que a substituição do milho por melaço de soja não acarreta prejuízos sobre o ambiente ruminal (Almeida et al., 2018).

Além disso, Pereira Junior (2019) avaliou a inclusão do melaço de soja em substituição ao milho nos níveis de 0, 15 e 30% na MS em dieta de ovinos e observou

aumento no pH ruminal (de 5,92 para 6,21), maior concentração de ácido butírico e redução da amônia ruminal. As mesmas dietas foram avaliadas no desempenho de cordeiros cruzados Santa Inês × Dorper e não houve alteração no consumo de MS, embora tenha reduzido a eficiência alimentar. Adicionalmente, os autores observaram melhora na maciez e aumento na deposição de gordura intramuscular dos animais no músculo *Longissimus* (Rodrigues et al., 2020). Arruda et al. (2021) também evidencia o MSO como uma excelente opção de substituição ao milho, o qual não influenciou o consumo de MS, desempenho, características de carcaça e parâmetros de qualidade de carne de cordeiro, apenas reduzindo a eficiência alimentar dos animais alimentados em níveis crescentes de 0, 10, 20 e 30% de inclusão na MS.

Embora estes estudos sejam promissores, ainda é preciso uma avaliação mais ampla e criteriosa sobre o efeito do melaço de soja, animais de diferentes categorias, como castrados e fêmeas, uma vez que se comportam de maneira diferente, por proporcionarem melhor acabamento de carcaça e maior gordura intramuscular (Gravador et al., 2018), contudo com menor qualidade no perfil dos ácidos graxos (Lima et al., 2019). Assim sendo, conhecer a resposta do subproduto na deposição de gordura intramuscular dos ruminantes e seu modo de ação no tecido adiposo, em especial nos cordeiros, é no mínimo interessante devido ao seu grande potencial a ser explorado na cadeia nacional.

4. Efeito nutricional sobre a expressão gênica

Com os resultados obtidos até o momento é possível observar que o melaço de soja possui um padrão de resposta diferente dos alimentos tradicionais, tal efeito inicia-se no rúmen e termina no metabolismo muscular. Por isso, entender essas modulações metabólicas são interessantes para que se possa explorar ao máximo as potencialidades do subproduto.

Epigenética tem sido descrita como o estudo de mudanças hereditárias em divisões mitóticas e/ou meióticas na função gênica que não pode ser explicada por mudanças na sequência do DNA (Rigss et al., 1996). Os principais mecanismos reguladores de reprogramação do genoma incluem metilação de DNA (adição de grupos metil nos terminais de citosina), modificações das histonas (metilação,

acetilação, fosforilação nas caudas de histonas), reposicionamento da estrutura da cromatina e nucleossoma e RNA não codificadores são alguns exemplos epigenéticos que podem ser alterados por ações ambientais, como: dieta, exposição à toxinas, inflamações, estresse social, atividade física, envelhecimento, medicação, desordem metabólica e hormonal entre outras, todas sem causar alterações na sequência de DNA (Khatib, 2021).

Processos fisiológicos dos mais simples ao mais complexos são dependentes de expressões e interações gênicas, dentre os quais a estrutura do músculo, característica histológica e composição das fibras são estritamente relacionadas à qualidade da carne, por isso tem recebido muita atenção e foco de estudos e pesquisas ultimamente (Sun et al., 2022). Os efeitos dietéticos sobre a expressão gênica têm sido denominados como epigenética nutricional (Park et al., 2012), e inúmeras ferramentas de transcriptoma são utilizadas para avaliar e caracterizar as alterações na expressão gênica para identificação de genes diferencialmente expressos, como: microarranjo (microarray), PCR em tempo real (qRT-PCR) e o RNA-seq.

Dentre essas técnicas, o RNA-seq é amplamente utilizado para investigação do perfil do transcriptoma, ou seja, o perfil da expressão gênica global, de todos os genes. Esta metodologia apresenta grandes vantagens em relação às outras uma vez que permite o acesso direto às sequências de RNA mensageiro, contornando variações de hibridização, além de detectar splicing alternativo (Malone e Oliver, 2011). O RNA-seq realiza o sequenciamento e quantificação dos transcritos com grande resolução, e, pode ser utilizado para determinar os níveis de expressão gênica exigindo uma quantidade pequena de RNA, comparado ao microarranjo (Wang et al., 2008; Fonseca, 2016).

Conhecer o padrão de expressão gênica em tecidos e órgãos específicos importantes no metabolismo e características de importância econômica para a produção animal, é de extrema relevância, pois auxilia na compreensão das vias metabólicas que metabolizam os alimentos ofertados, bem como seus possíveis efeitos epigenéticos que causam alterações fenotípicas desejáveis ou indesejáveis.

Portanto, o que é colocado a disposição no cocho do animal pode resultar muito mais que ganho de peso.

A adição ou troca de alimentos seja tradicional ou não, ocasiona inúmeras modificações em diversos níveis metabólicos ou até fisiológicos, além do que se conhece ou imagina. A exemplo dos açúcares que possuem padrão fermentativo diferente do amido (Heldt et al., 1999), que levam à diversas modificações na biohidrogenação ruminal (Martel et al., 2011; Sun et al., 2015) que consequentemente alteram o perfil de ácidos graxos que chegam a luz intestinal. Ácidos graxos possuem uma relação muito intimista com a regulação de genes lipogênicos e fatores de transcrição, como os receptores ativados por proliferador de peroxissoma - PPAR (Bionaz et al., 2013; Ladeira et al., 2016). O funcionamento destes fatores de transcrição são como heterodímeros associados ao receptor X retinóide (RXR) que são ativados ao se ligarem aos ácidos graxos modificando sua estrutura, agora na forma ativa se liga a uma sequência de DNA específica induzindo ou reprimindo a sua expressão (Bionaz et al., 2013).

Dentre os fatores de transcrição da família PPAR há o receptor $\gamma 2$ que é regulada a nível transcricional pela nutrição (Vidal Puig et al., 1996), este demonstra ser um regulador chave da expressão gênica de gordura, desempenhando um papel fundamental na adipogênese e lipogênese de ovinos e bovinos, sendo fortemente expresso em animais com carne altamente marmorizada (Lim et al., 2011; Bionaz et al., 2013; Shao et al., 2016).

O PPAR $\gamma 2$ possui uma positiva correlação com outros genes lipogênicos importantes, como o SCD, gene que codifica a enzima estearoil CoA dessaturase, envolvida na conversão do AGS – ácido graxo saturado em AGM - ácido graxo monoinsaturado (Corazzin et al., 2013), responsável assim por modificar o perfil de ácidos graxos presentes na carne.

Estes genes possuem sua expressão facilmente manipulada através dos ácidos graxos dietéticos que alcançam o tecido adiposo. A expressão gênica do SCD é deprimida significativamente em bovinos alimentados com dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3, AGP n-3, (Herdman et al., 2010), enquanto que dietas que propiciam menor pH ruminal, como dietas ricas em amido, proporcionam maiores isomerizações ruminiais de C18:2 trans-10 cis-12, (Choi et al.,

2005), que reduzem expressões de genes lipogênicos importantes, como: PPAR γ , FASN, SCD1, ACACA e SREBF-1 (Brown et al., 2003; Zhang et al., 2018).

Em contrapartida, os PPAR α são expressos em tecidos que ocorrem a β -oxidação, como fígado, por justamente estarem envolvidos na lipólise (Shao et al., 2016). Como um importante indutor ao catabolismo lipídico, a manipulação da dieta deve ser planejada com finalidade de manter baixa a β -oxidação, uma vez que a quantidade de gordura a ser depositada no músculo é resultado do equilíbrio entre a síntese e degradação do próprio lipídeo (Ladeira et al., 2016). Logo, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados podem aumentar a expressão gênica do PPAR α e assim reduzir a gordura intramuscular (Bionaz et al., 2013).

Outro ponto relevante é a importância não só do acetato para a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo, mas também a glicose que é precursora de acetil CoA via ciclo de Krebs (Ladeira et al., 2016). O tecido adiposo intramuscular possui maior preferência por glicose que o acetato para a síntese *de novo*, enquanto o tecido adiposo subcutâneo utiliza em maior proporção o acetato como precursor inicial (Gilbert et al., 2003; Smith et al., 2018). Destacando desta forma a relevância de dietas glicogênicas, como as ricas em grãos, que provavelmente oferecem maior estímulo para a deposição de gordura intramuscular, fornecendo glicose via gliconeogênese.

Recentemente estudos em ratos e humanos vêm demonstrando que a frutose possui um potencial lipogênico ainda maior que a glicose, induzindo ainda mais a expressão de genes lipogênicos como G6PD, ACACA, FASN e SCD1 (Samuel, 2011; Shimada et al., 2017), por simplesmente contornar o principal ponto regulador da via glicolítica, que é a enzima fosfofrutoquinase, tornando assim a frutose uma fonte inesgotável de acetil CoA (Elliott et al., 2002; Herman e Samuel, 2016). Volpi Lagrecca e Duckett (2016) trabalharam com 4,6% de frutose diluída na água de bovinos de corte. Embora não tivessem encontrado efeitos sobre o ganho de peso e gordura intramuscular na carne, encontraram células adiposas maiores para o tratamento em que continha frutose. Como conclusão os autores atribuíram a ausência de efeito sobre o marmoreio da carne à baixa dosagem de frutose.

4.1. Melaço de soja como agregador de qualidade de carne

Diante do exposto, o melaço de soja é um subproduto que atende muito bem os requisitos para agregar qualidade na carne de ruminantes, uma vez que ao aumentar o pH ruminal selecionam microrganismos específicos que podem fornecer ao lúmen intestinal maiores quantidades de CLA cis-9, trans-11 em detrimento de seu isômero, trans-10, cis-12 que reprime a expressão de genes lipogênicos e adipogênicos. Também pode mediante seu alto teor de açúcares, principalmente frutose (via hidrólise dos mais abundantes carboidratos solúveis: sacarose e estaquiose) fornecer grandes quantidades de acetil CoA para a síntese *de novo*, seja via propionato ou seja escape dos carboidratos solúveis do rúmen pela taxa de passagem da água. Essas hipóteses se tornam no mínimo interessante e atrativas para a indústria de carne brasileira, podendo assim contribuir, dentro da possibilidade que cabe a nutrição, para a melhoria no padrão de qualidade dos produtos cárneos para exportação ou comercialização no mercado interno.

Neste estudo, o nível de inclusão do melaço de soja adotado é devido a característica do subproduto em reduzir linearmente a eficiência alimentar dos animais, parâmetro de extrema importância na produção animal. Para que a dieta experimental permaneça atrativa aos produtores, a escolha foi de apenas 20% na MS.

Diante dos pontos supracitados, o objetivo geral com este estudo foi de investigar o potencial do melaço de soja sobre os parâmetros de qualidade de carne de cordeiros, sobretudo seu potencial de ação reguladora sobre os principais genes relacionados à lipogênese e adipogênese em cordeiros cruzados. Para aumentar a possibilidade de encontrar efeitos de acabamento de carcaça e gordura intramuscular foi acrescentado animais machos castrados nos tratamentos, partindo da hipótese de que os ovinos alimentados com melaço de soja em substituição ao milho teriam maiores quantidades de gordura na carne mediante maior expressão de genes relacionados à lipogênese, mediante modulação nas vias metabólicas ruminais ocasionada pelas quantidades de carboidratos solúveis presentes no melaço de soja, que podem até mesmo alcançar o lúmen intestinal.

REFERÊNCIAS

Abedi E, Sahari MA (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. **Food Science & Nutrition** 2(5), 443-463.

Almeida M, van Cleef E, Paschoaloto J, Castro Filho E, Barducci R, Soragni G, Zampieri Neto E, Pedro A, Ezequiel JMB (2018). PSXV-32 Effects of increasing inclusion of soybean molasses on rumen fermentation of feedlot sheep. **Journal of Animal Science** 96(suppl_3), 476-476.

Arruda MCG, Almeida MTC, Bertoco JPA, Pereira-Junior SA, Castro-Filho ES, Feliciano AL, Rodrigues JL, Torres RNS, Costa RV, Grilo LMSFSS, Ezequiel JM (2021). Soybean molasses to replace corn for feedlot lambs on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. **Translational Animal Science** 5(1), txaa230.

Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Looor JJ (2013). Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research** 2013.

Bitencourt LL (2012) **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. 131f. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Brasil. **Bases para o plano nacional de desenvolvimento da rota do cordeiro**. Ministério da Integração Nacional, Secretaria de Desenvolvimento Regional. – Brasília: Ministério da Integração Nacional, 2017.

Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK (2003). Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research** 44(7), 1287-1300.

Brum AG (2015) **Novos insumos usados na alimentação de bovinos de corte**. 46f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

Chajuss D (2004). Soy molasses: processing and utilization as a functional food, In: Liu K, (Ed.) **Soybeans as functional foods and ingredients**. AOCS Missouri, pp. 132-144.

Choct M, Dersjant-Li Y, McLeish J, Peisker M (2010) Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in

pigs and poultry. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 23(10), 1386-1398.

Choi NJ, Imm JY, Oh S, Kim BC, Hwang HJ, Kim YJ (2005). Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. **Animal Feed Science and Technology** 123, 643-653.

Corazzin M, Bovolenta S, Saccà E, Bianchi G, Piasentier E (2013) Effect of linseed addition on the expression of some lipid metabolism genes in the adipose tissue of young Italian Simmental and Holstein bulls. **Journal of Animal Science** 91(1), 405-412.

Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition** 76(5), 911-922.

Fernandes RDPP, de Alvarenga Freire MT, de Paula ESM, Kanashiro ALS, Catunda FAP, Rosa AF, Trindade MA (2014) Stability of lamb loin stored under refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. **Meat Science** 96(1), 554-561.

Fernandes Junior F, de Freitas Pena A, Grandis FA, Koritiaki NA, de Almeida Rego F C, dos Santos RM, de Azambuja Ribeiro EL (2021) Subcutaneous fat thickness at slaughter in castrated and non-castrated Santa Inês and Dorper lambs and its influence on meat and carcass quality. **Livestock Science** 253, 104694.

Fernandes GR, Miguel DP (2011) **Detecção dos açúcares da soja**. Cadernos de Pós Graduação da FAZU 2(1).

Fiems LO, De Campeneere S, De Smet S, Van de Voorde G, Vanacker JM, Boucqué CV (2000) Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. **Meat Science** 56(1), 41-47.

Fonseca LFS (2016) **Expressão gênica diferencial em tecido muscular de bovinos Nelore divergentes para qualidade de carne**. 107 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Unesp, Jaboticabal.

Gallo SB, de Almeida Merlin F, de Macedo CM, de Oliveira Silveira RD (2014) Whole grain diet for Feedlot Lambs. **Small Ruminant Research** 120(2-3), 185-188.

Gilbert CD, Lunt DK, Miller RK, Smith SB (2003) Carcass, sensory, and adipose tissue traits of Brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. **Journal of Animal Science** 81(10), 2457-2468.

Gravador RS, Moloney AP, Brunton NP, Gkarane V, Allen P, Fahey AG, Claffey NA, Diskin MG, Farmer LJ, Monahan FJ (2018) Effects of castration and slaughter age on the fatty acid composition of ovine muscle and adipose tissue from two breeds. **Small ruminant Research** 168, 94-100.

Hall MB, Herejk C (2001) Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal Dairy Science** 84:2486-2493.

Hall MB, Weimer PJ (2007) Sucrose concentration alters fermentation kinetics, products, and carbon fates during in vitro fermentation with mixed ruminal microbes. **Journal of Animal Science** 85(6), 1467-1478.

Heldt JS, Cochran RC, Stokka GL, Farmer CG, Mathis CP, Titgemeyer EC, Nagaraja TG (1999) Effects of different supplemental sugars and starch fed in combination with degradable intake protein on low-quality forage use by beef steers. **Journal of Animal Science** 77(10), 2793-2802.

Herdmann A, Nuernberg K, Martin J, Nuernberg G, Doran O (2010) Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. **Animal** 4(5), 755-762.

Herman MA, Samuel VT (2016) The sweet path to metabolic demise: fructose and lipid synthesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 27(10), 719-730.

Howe P, Buckley J, Meyer B (2007) Long-chain omega-3 fatty acids in red meat. **Nutrition & Dietetics: the Journal of the Dietitians Association of Australia** 64(3), S135-S135.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020) **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939> Acesso em: 02 de Setembro de 2022.

Kelly DM, Jones TH (2013) Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. **Journal of Endocrinology** 217(3), R25-R45.

Khatib H (2021) Transgenerational epigenetic inheritance in farm animals: How substantial is the evidence? **Livestock Science** 250, 104557.

Kinney AJ (2003) Engineering soybeans for food and health. **The Journal of Agrobiotechnology Management and Economics** 6:18-22.

Ladeira M, Schoonmaker J, Gionbelli M, Dias J, Gionbelli T, Carvalho J, Teixeira P (2016) Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International Journal of Molecular Sciences** 17(6), 918.

Lawrence TLJ, Fowler VR (2002) Compensatory growth. **Growth of farm animals**, (Ed. 2), 229-254.

Leonelli FCV, de Oliveira IRC (2016) Percepção dos consumidores sobre os açougues gourmet: um estudo multicaso. **Organizações Rurais & Agroindustriais** 18(1).

Lima PMT, Moraes CVDSA, do Prado Paim T, Corrêa PS, Lanna DPD, McManus C, Abdalla AL, Louvandini H (2019) Fatty acid profile and carcass characteristics in castrated and uncastrated hair lambs. **Tropical Animal Health and Production** 51(4), 775-780.

Lim D, Kim NK, Park HS, Lee SH, Cho YM, Oh SJ, Kim TH, Kim H (2011) Identification of candidate genes related to bovine marbling using protein-protein interaction networks. **International Journal of Biological Sciences** 7(7), 992.

Lucena CC, Martins EC, Magalhães EA, Holanda Filho ZF (2018) **Produtos de origem caprina e ovina: mercado e potencialidades na região do Semiárido brasileiro**. Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E).

Mach N, Bach A, Realini CE, Furnols MF, Velarde A, Devant M (2009) Burdizzo pre-pubertal castration effects on performance, behaviour, carcass characteristics, and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Meat Science** 81(2), 329-334.

Mahgoub O, Horton GMJ, Olvey FH (1998) Effect of method and time of castration on growth and carcass characteristics of omani sheep. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 11(2), 121-127.

Malone JH, Oliver B (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biology** 9, 34.

Martel CA, Titgemeyer EC, Mamedova LK, Bradford BJ (2011) Dietary molasses increases ruminal pH and enhances ruminal biohydrogenation during milk fat depression. **Journal of Dairy Science** 94(8), 3995-4004.

Martins EC, Guimarães VP, Bomfim MAD, Carvalho RDS (2010) **Terminação de cordeiros em confinamento: avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais**. In Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE).

Miletić A, Stojanović B, Grubić G, Stojić P, Radivojević M, Joksimović-Todorović M, Popovac M, Obradović S (2017) The soybean molasses in diets for dairy cows. **Mljekarstvo** 67(3), 217-225.

Nian Y, Allen P, Harrison SM, Kerry JP (2018) Effect of castration and carcass suspension method on the quality and fatty acid profile of beef from male dairy cattle. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 98(11), 4339-4350.

Neathery MW, Pugh DG, Miller WJ, Whitlock RH, Gentry RP, Allen JC (1979) Potassium toxicity and acid-base balance from large oral doses of potassium to young calves. **Journal of Dairy Science** 62(11), 1758-1765.

Oba M, Mewis JL, Zhining Z (2015) Effects of ruminal doses of sucrose, lactose, and corn starch on ruminal fermentation and expression of genes in ruminal epithelial cells. **Journal of Dairy Science** 98(1), 586-594.

OECD/FAO (2022) **OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031**. OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en>.

Osório JCDS, Osório MTM, Sañudo C (2009) Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**.

Park LK, Friso S, Choi SW (2012) Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. **Proceedings of the Nutrition Society** 71, 75–83.

Pereira Junior SAG (2019) **Melaço de soja na terminação e metabolismo de ovinos em confinamento**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Pewan SB, Otto JR, Huerlimann R, Budd AM, Mwangi FW, Edmunds RC, Malau-Aduli AEO (2020) Genetics of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid metabolism and meat eating quality in Tattykeel Australian White lambs. **Genes** 11(5), 587.

Pires CC, da Silva LF, Schlick FE, Guerra DP, Biscaino G, Carneiro RM (2000) Cria e terminação de cordeiros confinados. **Ciência Rural** 30(5), 875-880.

Realini CE, Pavan E, Johnson PL, Font-i-Furnols M, Jacob N, Agnew M, Moon CD (2021) Consumer liking of M. longissimus lumborum from New Zealand pasture-finished lamb is influenced by intramuscular fat. **Meat Science** 173, 108380.

Riggs AD, Martienssen RA, Russo VEA (1996) **Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation**. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York.

Rodrigues JL, Pereira-Junior SAG, Castro Filho ES, Costa RV, Barducci RS, van Cleef EHCB, Ezequiel JMB (2020) Effects of elevated concentrations of soybean molasses on feedlot performance and meat quality of lambs. **Livestock Science** 240, 104155.

Rodrigues BCG, De Mello BS, da Costa Araujo MLG, da Silva GHR, Sarti A (2021) Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering** 9(4), 105226.

Sales J (2014) Quantification of the effects of castration on carcass and meat quality of sheep by meta-analysis. **Meat Science** 98(4), 858-868.

De Sant'Ana FJ, Barros CS (2010) Polioencephalomalacia in ruminants in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Pathology** 3, 70-9.

Samuel VT (2011) Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 22(2), 60-65.

Schoenholz CK, Hunter RD, Nutsch TA, Drouillard JS (1999) Soy molasses as a feed ingredient for finishing cattle. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports** Vol. 0: Iss. 1.

Schopf N, Erbino P, Puvogel A (2014) Alternative fuels: energetic use of liquid by-products from sugar and soy processing. **Sugar Tech** v.16, n.4, p. 333-338.

Schultz EB, Júnior GM, Paula CGD, Ferreira IC (2020) Soybean molasses: an alternative to sheep's supplementation. **Boletim De Indústria Animal** 77, 1-8.

Shao X, Wang M, Wei X, Deng S, Fu N, Peng Q, Jiang Y, Ye L, Xie J, Lin Y (2016) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : master regulator of adipogenesis and obesity. **Current Stem Cell Research & Therapy** 11(3), 282-289.

Shimada M, Hibino M, Takeshita A (2017) Dietary supplementation with myo-inositol reduces hepatic triglyceride accumulation and expression of both fructolytic and lipogenic genes in rats fed a high-fructose diet. **Nutrition Research** 47, 21-27.

Silva FB, Romão BB, Cardoso VL, Coutinho Filho U, Ribeiro EL (2012) Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. **Biochemical Engineering Journal** 69:61-69.

Siqueira PF, Karp SG, Carvalho JC (2008) Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology** 99(17):8156-8163.

Smith SB, Blackmon TL, Sawyer JE, Miller RK, Baber JR, Morrill JC, Wickersham TA, (2018) Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. **Journal of Animal Science** 96(3), 921-929.

Sun Y, Ma Y, Zhao T, Li M, Mao Y, Yang Z (2022) Epigenetic Regulation Mechanisms of the Cofilin-1 Gene in the Development and Differentiation of Bovine Primary Myoblasts. **Genes** 13(5), 723.

Sun X, Wang Y, Chen B, Zhao X (2015) Partially replacing cornstarch in a high-concentrate diet with sucrose inhibited the ruminal trans-10 biohydrogenation pathway in vitro by changing populations of specific bacteria. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 6(1), 57.

Sutherland MM, Ames JM (1996) Free fatty acid composition of the adipose tissue of intact and castrated lambs slaughtered at 12 and 30 weeks of age. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44(10), 3113-3116.

Trujillo JG, Teixeira MAS, Lima AHA, Montão DP, Ross TB, Riet-Correa G, Bezerra Júnior PS (2018) Intoxicação por etanol em bovinos alimentados com bagaço de malte acrescido de levedura de cerveja. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38, 382-386.

Uwituze S, Parsons GL, Karges KK, Gibson ML, Hollis LC, Higgins JJ, Drouillard JS (2011) Effects of distillers grains with high sulfur concentration on ruminal fermentation and digestibility of finishing diets. **Journal of Animal Science** 89(9), 2817-2828.

van Cleef ECB, Almeida MTC, Paschoaloto JR, Castro Filho ES, Barducci RB, Soragni G, Zampieri Neto E, Pedro A, Ezequiel JMB (2018a) PSXV-17 Effects of increasing concentrations of soybean molasses on feed intake, growth performance, carcass and meat traits of feedlot lambs. **Journal of Animal Science** 96, 3.

van Cleef F, van Cleef E, Almeida M, Paschoaloto J, Castro E, Barducci R, Soragni G, Zampieri Neto E, Ezequiel J (2018b) In vitro digestibility and gas production of diets containing different levels of soybean molasses for feedlot sheep. **Journal of Animal Science** 96, 63-63.

Van Soest PJ (1994) **Nutritional ecology of ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University, 476p.

Vaz CMSL (2007) **Ovinos: o produtor pergunta, a Embrapa responde** – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 158 p.

Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Moller DE (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. **The Journal of Clinical Investigation** 97(11), 2553-2561.

Volpi-Lagreca G, Duckett SK (2016) Supplementation of glycerol or fructose via drinking water to enhance marbling deposition and meat quality of finishing cattle. **Journal of Animal Science** 94(2), 858-868.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2008) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics** Advance Online Publication.

Yang H, Wang Z, Lin M, Yang ST (2018) Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology** 250:1-9.

Zanette PM, Neumann M (2012) Confinamento como ferramenta para incremento na produção e na qualidade da carne de ovinos. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais** 8, 415-426.

Zhang TY, Huang JT, Tian HB, Ma Y, Chen Z, Wang JJ, Shi HP, Luo J (2018) trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid alters lipid metabolism of goat mammary epithelial cells by regulation of de novo synthesis and the AMPK signaling pathway. **Journal of Dairy Science** 101(6), 5571-5581.

CAPÍTULO 2 - Potencial lipogênico do melaço de soja na dieta de cordeiros machos em terminação

RESUMO - O objetivo com este estudo foi avaliar o potencial lipogênico do melaço de soja (MSO) sobre as características de carcaça, qualidade da carne e perfil do transcriptoma do músculo de cordeiros machos terminados em confinamento. Vinte cordeiros machos (Santa Inês × Dorper, 98 dias de vida), após pesagem em jejum, foram blocados pelo peso corporal ($21,13 \pm 0,92$ kg) e alocados dentro do bloco à duas dietas experimentais: CON (0 g/kg MSO) e MS20 (200 g/kg MSO). As dietas consistiam em 16% de volumoso e 84% de concentrado na matéria seca. O período de confinamento teve duração de 76 dias, sendo 12 dias de adaptação e 64 dias com dieta experimental. O consumo de ração, ganho médio diário (GMD) e eficiência alimentar (EA) foram determinados com base nos dias de confinamento com oferta das dietas experimentais. No d-6 e d-75 amostras de sangue foram coletadas para avaliação do status energético e proteico dos animais, antes da primeira refeição do dia. Após o abate amostras de músculo fresco foram coletadas para avaliação de RNA-seq e celularidade de adipócitos, além do músculo *Longissimus thoracis* do lado direito e esquerdo da carcaça para avaliação da qualidade de carne por meio do PROC MIXED do software SAS. Os cordeiros alimentados com MSO tiveram maior concentração sérica de triglicerídeos totais e fígado mais pesado em relação ao peso corporal comparado aos animais alimentados com dieta CON. A inclusão do MSO na dieta dos animais também proporcionou maior tamanho dos adipócitos subcutâneos e menor número de células demonstrando efeito de hipertrofia para a dieta MS20 e hiperplasia para a dieta CON, evidenciado por genes relacionados à proliferação de adipócitos altamente influenciados pela dieta CON (*SPINK5* e *SLITRK6*). A dieta MS20 proporcionou maior expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico no músculo com os genes *FABP3*, *FABP4*, *ADIPOQ* e *PPARG* relacionados ao transporte e síntese de lipídeos. Portanto, a inclusão de MSO na dieta de cordeiros em confinamento proporciona maior expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico o que culminou em hipertrofia dos adipócitos subcutâneos.

Palavras-chaves: adipócitos, adipogênese; qualidade de carne.

Introdução

A gordura na carne e carcaça desempenha um papel fundamental dentro da qualidade no produto final, ao qual a gordura subcutânea é essencial para impedir o encurtamento das fibras musculares pelo frio durante o processo de desenvolvimento do rigor mortis (Ripoll et al., 2018), e a gordura intramuscular, também conhecida como marmoreio, é um importante atributo na aceitação sensorial da carne vermelha por influenciar a maciez, sabor, suculência e aceitação geral pelos consumidores (Pannier et al., 2014; Stewart et al., 2021).

Estudos recentes têm indicado que valores abaixo de 3% na gordura intramuscular na carne bovina estão fora da janela considerada aceitável, enquanto consumidores de carne de cordeiro sugerem valores entre 3 e 5% para uma boa experiência alimentar (Miller, 2014; Pannier et al., 2014; Lambe et al., 2017; Phelps et al., 2018; Miller, 2020). Todavia, a sua deposição não é um processo simples, pois envolve fatores genéticos, nutricionais, categoria sexual, idade e biohidrogenação ruminal (Teixeira et al., 2017), que interagem entre si dificultando a manipulação dentro da produção de ruminantes.

Dietas de terminação ricas em concentrado, especialmente grãos, aceleram o crescimento animal devido a maior densidade energética, agregando padronização e qualidade na carne bem como permite maior taxa de alocação de animais por área (Pewan et al., 2020). Adicionalmente, a nutrição tem sido aportada como um importante fator ambiental passível de influenciar a expressão gênica do animal através dos efeitos epigenéticos, induzindo a diferenciação e proliferação de células adiposas (Ladeira et al., 2018). O melaço de soja se destaca como um ingrediente energético por recentemente indicar ser um potencializador da lipogênese em cordeiros em terminação, ao qual a substituição do milho pelo MSO aumentou a maciez e marmoreio da carne (Rodrigues et al., 2020). O que o torna um interessante ingrediente por se tratar de um subproduto da soja de baixo custo de produção e aquisição.

Portanto, nossa hipótese é que ao substituir o milho por melaço de soja na dieta de terminação de cordeiros confinados há maior atividade lipogênica nas células adiposas no músculo, melhorando a qualidade da carne. Logo, o objetivo com este

estudo foi avaliar o potencial lipogênico do melaço de soja sobre os parâmetros de carcaça e carne, além do perfil do transcriptoma do músculo de cordeiros machos terminados em confinamento.

Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram seguidos pelos Princípios Éticos para Experimentação Animal regulamentada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal (nº 002583/2020).

- Animais, dietas e delineamento experimental

O experimento foi realizado nas dependências da Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos e as análises foram feitas no Laboratório de Carne da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21° 14' 05" S latitude, 48° 17' 09" W longitude e 615 m de altitude). Vinte cordeiros machos não castrados (Santa Inês × Dorper; 21,13 ± 0,92 kg de peso corporal inicial; 98 dias de idade) foram alocados em blocos por peso e distribuídos aleatoriamente em duas dietas experimentais (CON – sem adição de melaço de soja e M20 – com 200 g/kg de melaço de soja na MS).

Em todo o período experimental os animais foram mantidos em baias individuais (1.2 m²) com piso ripado suspenso, comedouros individuais e bebedouros coletivos, dentro de um galpão coberto. Tratamento sanitário prévio foi realizado em todos os cordeiros, vermifugação e suplementação com vitaminas A, D, E e K (Closantel 0.8% w/v e Vit ADEK Calbos, Curitiba, PR - Brazil), além de vacinação preventiva contra clostridiose (Bovilis Poli-Star T, Kenilworth, NJ - EUA). Por já serem habituados a se alimentarem em cocho, os cordeiros foram adaptados às dietas experimentais com apenas dois degraus, adaptação 1 com 480 g/kg de concentrado e adaptação 2 com 660 g/kg de concentrado, sendo 6 dias cada. No d-13 iniciou o fornecimento das dietas experimentais de terminação com relação volumoso concentrado de 16:84. O objetivo era que os animais alcançassem média de 35 kg de

PC e então encerrar o período experimental, para isso pesagens quinzenais sem jejum eram realizadas com finalidade de acompanhamento do peso corporal e estabelecer o dia do abate. Portanto, o período experimental foi de 76 dias incluindo 12 dias de adaptação e 64 dias de dieta de terminação.

As dietas foram formuladas para serem semelhantes no teor de proteína e energia de acordo com as recomendações do NRC (2007) para a categoria. Os ingredientes utilizados foram silagem de milho, milho grão moído, farelo de trigo, polpa cítrica, farelo de soja, ureia, sal mineral, bicarbonato de sódio e melaço de soja. O MSO tinha a seguinte composição: matéria seca: 54,8%, matéria mineral: 107,5 g/kg, extrato etéreo: 13,7 g/kg, proteína bruta: 63,0 g/kg, FDN: 0,0 g/kg e carboidrato não fibrosos: 815,8 g/kg.

Tabela 1 – Composição centesimal e bromatológica da dieta experimental.

Item	Dietas	
	CON	M20
<i>Composição centesimal, g/kg</i>		
Silagem de milho	160,0	160,0
Milho	640,0	440,0
Farelo de trigo	57,0	44,0
Polpa cítrica	55,0	42,0
Melaço de soja	-	200,0
Farelo de soja	53,0	76,0
Ureia	8,0	11,0
Sal mineral	17,0	17,0
Bicarbonato de sódio	10,0	10,0
<i>Composição bromatológica, g/kg</i>		
Matéria seca	662,4	664,5
Matéria mineral	42,8	55,4
Proteína bruta	140,2	132,8
Extrato etéreo	36,7	53,8
FDNcp	222,1	159,6

Carboidratos não fibrosos	573,3	618,9
Amido	522,6	376,0
Carboidrato solúvel	35,1	230,8
Pectina	15,6	12,1
Energia metabolizável, Mcal/kg	3,28	3,33

Carboidratos não fibrosos: Estimados por equação de Hall (2000);
 Amido e Pectina: Estimado por média obtidas no CQBAL 4.0;
 Carboidrato solúvel = Carboidratos não fibrosos – amido – pectina.

- Consumo alimentar e desempenho animal

A dieta fornecida aos animais era pesada diariamente de forma separada, silagem de milho, melaço de soja e concentrado, e então misturados manualmente até sua homogeneidade para evitar seleção. Metade da refeição foi fornecida pela manhã (08:00 h) e a outra metade ao final da tarde (16:00 h). Os ajustes do fornecido eram realizados diariamente por meio de escore de cocho no primeiro horário da manhã, permitindo sobras de 3 a 5% no cocho, ao qual eram pesadas para obtenção do consumo alimentar individual dos cordeiros (CMS).

O desempenho animal individual (GMD) foi realizado por meio da razão de peso corporal obtida em jejum de sólidos por 16h, no início e fim do período experimental e dias de confinamento com a dieta de terminação (64 d), enquanto a eficiência alimentar (EA) foi calculada pela razão do desempenho e consumo alimentar.

$$GMD = PCf - PCi) / \text{dias de confinamento}$$

[1]

Ao qual PCf = peso corporal final (kg); PCi = peso corporal inicial (kg)

- Análises de composição químico-bromatológicas

A cada quinze dias era realizada amostragem das dietas ofertadas aos animais, que juntamente com amostras representativas dos ingredientes eram submetidos à análise bromatológica em laboratório, sendo a silagem de milho e amostras dos fornecidos submetidos a secagem em estufa de ventilação forçada 55°C por 72h (método G-001/2) seguido por moagem em moinho tipo Wiley, com peneiras de crivos

1 mm e então levados a estufa de 105°C por 16h, juntamente com o restante dos ingredientes, para obtenção da matéria seca (MS, método G-003/1). A determinação da matéria mineral foi através da combustão total em forno mufla a 600°C por 4h (MM, método M-001/2).

O nitrogênio total foi avaliado mediante uso de aparato micro-Kjeldahl (método N-001/2) e os teores de proteína bruta (PB) obtidos pela multiplicação do N total por 6.25. Os teores de extrato etéreo foram obtidos por meio da extração em éter de petróleo em aparato Soxhlet num período de 4h (EE, método G-004/1). Vale destacar, que a análise de EE do melaço de soja precisou ser ajustada, pois o mesmo quando analisado de forma isolada e *in natura* superestimava os valores devido à sua elevada concentração de carboidratos solúveis, sendo assim foi realizado uma mistura na proporção de 2:1 de feno com MSO. Após bem homogeneizada a mistura, três amostras condicionadas em papel filtro qualitativo, foram submersos em água destilada por 12 s e seguidos de secagem em estufa a 105°C por uma hora, e então submetidos a extração em aparato Soxhlet (AOAC – método 920.39-C). Uma vez conhecido a concentração de EE do feno utilizado como adsorvente, era descontado deste, o valor obtido na mistura feno:MSO.

Os conteúdos de fibra em detergente neutro e detergente ácido foram obtidos utilizando cadinhos filtrantes (FDN, método F-013/1 e FDA, método F-015/1, respectivamente), utilizando enzima α -amilase termoestável com atividade enzimática de 300 KNU/g, sem sulfito de sódio. Enquanto o nitrogênio insolúvel em detergente neutro foi segundo INCT-CA (NIDN, método N-004/2) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido por INCT-CA (NIDA, método N-005/2), bem como cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN, método M-002/2) para correções de cinzas e proteína da fibra de acordo com os procedimentos padrões analíticos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (Detmann et al., 2021). Conteúdo de carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela equação de Hall (2000).

$$CNF = 1000 - ((PB - PB_{ureia} + ureia) + FDN_{cp} + EE + MM)$$

[2]

Em que, PB = proteína bruta; PBureia = proteína bruta presente na ureia; FDNcp = fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral.

Análise de lignina foi realizada pelo método de hidrólise ácida (método F-005/2) para compor os cálculos de estimativa da energia metabolizável, o qual foram estimados mediante equação descrita por NRC (2001), com a composição dos fornecidos obtidos em laboratório. Os valores de amido e pectina foram estimados utilizando as médias obtidas no CQBAL 4.0, enquanto os carboidratos solúveis foram obtidos mediante subtração do CNF com os valores de amido e pectina.

- Parâmetros sanguíneos

A coleta de sangue foi realizada no início (d-6) e fim (d-75) do período experimental. Sendo a primeira desta com o objetivo de se obter o status bioquímico dos animais na condição pré-experimental, por isso foi realizada nos primeiros dias de confinamento, ainda com a dieta de adaptação. Em ambas as coletas, amostras de sangue de todos os cordeiros foram colhidas em tubos vacutainer com ativador de coágulo (Vacuplast®), no período da manhã, antes da primeira alimentação do dia, mediante venipunção jugular para avaliação do metabolismo proteico através das variáveis proteína total e ureia, bem como o metabolismo energético através das variáveis colesterol total, triglicerídeos totais e glicose.

As amostras foram imediatamente processadas em centrífuga refrigerada a 4°C em rotação de 2000 rpm por 15 min. O soro obtido após centrifugação foi armazenado a -20°C até o momento das análises, as quais foram feitas por meio de kits comerciais: proteína total (K-031), ureia (K-056), colesterol total (K-083), triglicerídeos totais (K-117), glicose (K-082) da Quibasa-Biocrin, Belo Horizonte, MG – Brasil. Enquanto, as leituras foram realizadas em analisador automático de bioquímica SBA-200 (CELM®, Barueri, SP - Brasil).

- Abate, características de carcaça e amostragem de carne

No último dia experimental os cordeiros foram submetidos a jejum de sólidos de 16h e pesados para obtenção do peso corporal final (PCf), e então transportados

para abatedouro comercial. Os animais foram dessensibilizados por eletronarcose de dois pontos, seguido por secção da veia jugular e artéria carótida. Após evisceração, o fígado foi separado e pesado assim como as carcaças para obtenção do peso de carcaça quente (PCQ), e então levadas para refrigeração por 24h a aproximadamente 4°C. Após o período de refrigeração as carcaças novamente foram pesadas para obtenção do peso de carcaça fria (PCF). O rendimento da carcaça (RC) foi calculado como:

$$RC = \left(\frac{PCQ}{PCF} \right) * 100$$

[3]

No lado esquerdo da carcaça foi feita uma secção para exposição do músculo *Longissimus thoracis*, na altura da 12ª costela, para mensuração da espessura de gordura subcutânea (EGS) com auxílio de paquímetro digital e obtenção da área de olho de lombo (AOL) usando equação de Silva Sobrinho (1999):

$$AOL = \left(\frac{A}{2} * \frac{B}{2} \right) * \pi$$

[4]

Ao qual A é o comprimento máximo do músculo e B é comprimento mínimo do músculo.

Ambos os lados da carcaça o músculo *Longissimus thoracis* foi removido entre as alturas da 6ª e 13ª costela e porcionado em 4 bifos, ao qual o lado direito foi destinado para análises químicas e o lado esquerdo para as análises físicas. As análises que não foram realizadas imediatamente ao abate, tiveram seus bifos embalados a vácuo (Selovac 200S, São Paulo - Brasil) com 99% de vácuo em sacos de poliamida/polietileno com 120 µm e 1 cm³/m²/24h de permeabilidade de O₂, 3 cm³/m²/ 24h de permeabilidade de CO₂ mensurado a 5°C e 75% de umidade relativa. A taxa de transmissão de vapor de água foi de 3g/m²/24h a 38°C e 100% de umidade

relativa. O valor vácuo 20 (50 Pa) foi usado para embalar as amostras, o qual eram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

- Análises físicas na carne

O pH final da carne foi mensurado após a refrigeração de 24h da carcaça diretamente no músculo *Longissimus thoracis*, do lado esquerdo, na altura da 12ª costela utilizando um potenciômetro de H₂ digital (Text 205 Sparta, NJ - EUA). Capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada mediante a pesagem de 2g de carne submetida a pressão de 10kg por 5 min, ao qual pela diferença de peso inicial e final foi utilizada para expressar o CRA em %, conforme descreve Ham (1986). Enquanto a perda por cocção (PPC) foi obtida mediante a cocção de um bife do *Longissimus thoracis* de cada animal, em grill elétrico (Geroque Foreman, Beachwood, OH - EUA), pré-aquecido a 196°C. Os bifes foram cozidos até atingirem temperatura interna de 75°C, monitorada por termômetro do tipo espeto (Incotemp, Porto Alegre, RS - Brasil).

Após a cocção, os bifes foram refrigerados em temperatura de 4°C ao qual permaneceram durante a noite, na manhã do dia seguinte, os bifes foram novamente pesados e pela diferença de peso inicial e final foi obtido o PPC em %. Deste mesmo bife, foram retirados seis núcleos cilíndricos de 1,27 cm de diâmetro em sentido paralelo ao eixo da fibra muscular (AMSA, 1995), para determinação da força de cisalhamento (Wheeler et al., 2002) pelo equipamento texturômetro (CT3 25K Brokfield Middleboro, MA - EUA). Cada cilindro foi cortado ao meio no sentido perpendicular ao eixo da fibra muscular com auxílio da lâmina Warner Bratzler, e os valores obtidos em kgf foram convertidos para newton (N).

- Análises químicas na carne

Para as análises químicas da carne, as amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram primeiramente descongeladas a 2°C por 24h e moídas no processador de alimentos (AOAC, método 983.18), congeladas novamente para serem liofilizadas por 72 h para obtenção de amostras homogêneas e livres de umidade. Para a determinação da composição química da carne as análises foram realizadas segundo AOAC (1995), cinzas (método 920.153) e proteína bruta (928.08). Enquanto o

conteúdo de gordura intramuscular foi mensurado como lipídeo total mediante extração a frio por Bligh e Dyer (1959).

A análise de oxidação lipídica TBARS foi mediante a mensuração do malonaldeído (MDA), com auxílio do ácido tiobarbitúrico como descreve Souza et al. (2011) e Vyncke (1970). Em 10 mL de solução TCA (7,5% TCA, 0,1% EDTA) foi adicionado 5 g de carne de cordeiro e homogeneizado em Ultra Turrax para então ser centrifugado (15 min, 4000 rpm e 4°C). O sobrenadante foi filtrado e misturada em solução TBA (1% ácido tiobarbitúrico, 15% TCA e 562,5 µM HCl) em proporções de 1:1 v/v. A mistura foi aquecida em banho maria (100° C) durante 15 min, resfriada em banho de gelo (5 min) e absorvância lida em 540 nm. As concentrações de MDA foram calculadas utilizando curva padrão de 1,3,3-tetrametoxipropano (0 – 40 µM) e os resultados expressos em mg MDA/kg de carne de cordeiro.

- Vida de prateleira – “Shelf life”

A avaliação da coloração da carne ao longo do tempo iniciou-se no dia seguinte ao abate, em laboratório, para isso foi destinado um bife para avaliação da vida de prateleira, simulando condição real da gôndola de supermercados brasileiros. As amostras do *Longissimus thoracis* foram embaladas em bandejas de polietileno e embrulhadas em papel filme retrátil (permeável ao oxigênio), sem contato com a amostra e então acondicionadas ao expositor display refrigerado (Klima Expositor Practice, 05B0500.1, Venâncio Aires RS - Brasil) a 4°C ± 1 e luzes fluorescentes (1200 lx, 12h).

A coloração da carne foi avaliada nos dias 0, 1, 7, 10 e 14 dias de exposição, ao qual três mensurações em locais distintos do bife eram feitas para obtenção da média, com auxílio de colorímetro (CR-300 Minolta Chroma Meter Osaka - Japão), conforme descreve Houben et al. (2000). Antes das leituras, foi feita uma calibração em temperatura ambiente do local de trabalho (24° C) utilizando um padrão branco puro (100% reflexão) e uma caixa preta (zero reflexão). Os parâmetros avaliados foram: luminosidade L*, intensidade de vermelho a*, intensidade de amarelo b*, que foram avaliados de acordo com o sistema de cores CIE L*, a* e b* (CIE, 2004). Adicionalmente, ângulo Hue e índice de saturação chroma foram calculados de acordo com o AMSA (2012):

$$Hue = \arctang \frac{b}{a}$$

$$Chroma = (a^2 + b^2) \div \frac{1}{2}$$

[5]

- *Celularidade de adipócitos*

Ainda na carcaça quente, foi coletado aproximadamente 2 g de amostra do *Longissimus thoracis* e da gordura subcutânea, na altura da 12ª costela, para determinação do tamanho e número dos adipócitos, como proposto por Etherton et al. (1977), modificada por Prior (1983). As amostras foram laminadas ainda congeladas, a 1 mm de espessura e transferidas para vials de cintilação e então fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri - USA). As amostras fixadas foram filtradas através de telas com porosidade de 250 µm e 10 µm com auxílio de tampão Triton x-100 a 0,01% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri - USA). Os tecidos retidos em telas de 250 µm eram descartados, enquanto os retidos em tela de 10 µm foram coletados e suspensos em solução de 10 mL com 55,5% de glicerol. O tamanho dos adipócitos foi determinado por meio do programa analisador de imagens (Image-Pro v 4.5, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD), enquanto o número de adipócitos foi determinado pela equação:

$$\text{Número de células g}^{-1} = \text{número de células contadas} / ((\text{área da grade} \times \text{número de grades}) / \text{área da lâmina}) \times \text{diluição} / \text{g tecido fixado}$$

[6]

- *Extração de RNA, análise qualitativa, biblioteca e sequenciamento*

Para sequenciamento de RNA, foram selecionadas aleatoriamente quatro amostras de tecido muscular para cada dieta experimental. O RNA total foi extraído do tecido muscular esquelético, coletado ainda fresco (~500 mg), por meio de kit comercial de extração de RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), de

acordo com as instruções do fabricante. Com auxílio de espectrofotômetro Nanodrop (Mustiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e Bioanalyzer RNA, foram avaliados, respectivamente, a quantificação, pureza e integridade das amostras. Todas as amostras apresentaram um número de integridade de RNA (RIN) maior ou igual a 7,5 (Tabela S1). Para cada amostra foram utilizados 2 µg de RNA, para preparação da biblioteca de acordo com o protocolo descrito no guia TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). A estimativa do tamanho médio da biblioteca foi realizada com o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) e a quantificação da biblioteca foi realizada por meio de PCR quantitativa com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As amostras quantificadas foram diluídas e agrupadas (cinco grupos de todas as 8 amostras cada), utilizando TruSeq DNA CD Index Plate (96 índices, 96 amostras, Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Todas as amostras foram agrupadas numa única lane de fluxo de sequenciamento, utilizando o kit TruSeq PE Cluster v4-cBot-HS (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos), e foram clusterizadas e sequenciadas utilizando o equipamento HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) com o TruSeq SBS Kit v4-HS (200 ciclos), conforme descreve as instruções do manual do fabricante. Toda a análise de sequenciamento foi realizada no Centro Genômico na ESALQ, localizada no Laboratório de Biotecnologia Animal na ESALQ – USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Adaptadores de sequenciamento e leituras de baixa complexidade foram removidas em um passo inicial de filtragem por meio do Trim Galore 0.6.5 software. Somente as leituras com tamanho acima de 70 nucleotídeos e um score Phred menor que 33 foram mantidas após o corte. Controle de qualidade e a estatística das leituras foram estimadas com software FASTQC versão 0.11.8 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/) acesso em 15 de Junho de 2021. O genoma referência adotado foi *Ovis_aries_Oar_rambouillet_V1.0104* acesso em 15 de Junho de 2021. A abundância (contagem de leituras) de mRNAs de todos os genes anotados foram calculados por meio de featureCounts pertencente ao pacote Rsubread (Liao et al., 2019).

- Identificação de genes diferencialmente expressos

Genes diferencialmente expressos (DE) foram analisados por meio de contraste entre dois tratamentos, com auxílio do DESeq2 disponível no pacote Bioconductor do software R, utilizando um design de multifator (Love et al., 2014). Anteriormente a análise estatística, as contagens das leituras dos dados foram filtradas da seguinte forma: (i) genes com zero contagem para todas as amostras, eram genes não expressos; (ii) genes com menos que uma leitura por amostra na média foram removidas (expressão muito baixa); (iii) genes que não estavam presentes ao menos em 50% das amostras foram removidos (raramente expressos). A abordagem de corte realizada para identificar os genes DE foi controlar o *P*-valor a 5% e cujos valores de $\log_2$ fold change fossem maiores em módulo que a 0.60 ($0.60 > \log_2 FC < -0.60$), de acordo com estudos anteriores e recomendações DESeq2 (Cesar et al., 2016; Love et al., 2014).

- Análise de co-expressão em fatores de transcrição

Os fatores de transcrição (TFs) podem ser definidos como moléculas chave que regulam a expressão de um ou mais genes no sistema biológico (Vaquerizas et al., 2009) e a sua identificação destaca interações gênicas que são de fato mais relevante ao estudo. Assim sendo, a análise de correlação parcial e teoria da informação (PCIT) é utilizada para a reconstrução de redes de co-expressão de genes (GCN), identificando associações significativas gene-gene. Enquanto, a identificação dos TFs é realizada através da análise de fatores de impacto regulatórios (RIF), ao qual calcula para cada condição uma correlação de co-expressão entre TFs e genes DE identificando os genes regulatórios críticos ao estudo. Tanto a análise de PCIT como RIF são mais detalhadas em Reverter e Chan (2008) e Reverter et al. (2010), respetivamente. Ambas as análises foram realizadas através do pacote “CeTF” do software R desenvolvido por Biagi Junior et al. (2021) que não só integra as análises de PCIT e RIF como também realiza inúmeras plotagens dos dados.

- Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, ao qual o peso corporal inicial foi utilizado como critério para divisão em 5 blocos homogêneos. Os cordeiros foram considerados como unidade experimental ($n = 10$), e cada tratamento continha 2 repetições (bloco 1: $16,01 \pm 0,94$ kg; bloco 2: $18,94 \pm 0,23$ kg; bloco 3: $21,68 \pm 0,72$ kg; bloco 4: $23,36 \pm 0,19$ kg; bloco 5: $27,17 \pm 1,36$ kg). De acordo com o modelo estatístico:

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

[6]

Onde: Y_{ij} = variável dependente no tratamento i e no bloco j ; μ = efeito geral da média; t_i = efeito do tratamento ($i = \text{CON e MS20}$); b_j = efeito do bloco ($j = 1 \text{ a } 5$); e_{ij} = erro aleatório da parcela que recebeu o tratamento i , no bloco j .

Os parâmetros sanguíneos foram avaliados considerando a primeira amostragem, no início do experimento (d-6), como covariável. Enquanto a vida de prateleira (shelf life) foi avaliada como medida repetida no tempo, ao qual dieta, dia de avaliação e interação entre elas foram avaliados como efeito fixo, e bloco como aleatório, neste caso a melhor estrutura de covariância foi selecionada e ajustada mediante o menor valor de AICC.

Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED do software SAS (Inst., Cary, NC), sendo os resultados significativos foram considerados com P valor $\leq 0,05$ e tendência para P valor $< 0,10$ para médias do teste T.

Resultados

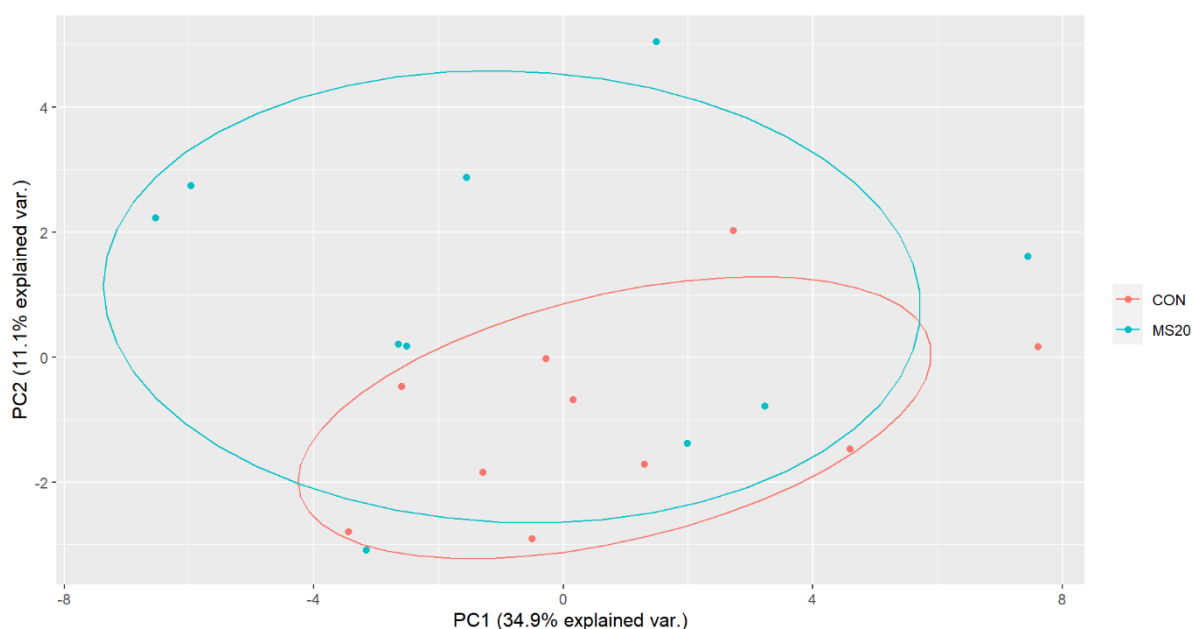


Figura 1 – Análise de componentes principais (PCA) dos tratamentos CON e MS20

- Consumo alimentar e desempenho animal

A inclusão do melaço de soja na dieta de cordeiros machos não castrados, não trouxe influências sobre o consumo de MS e desempenho dos animais ($P > 0,05$; Tabela 2), mas tiveram tendência para eficiência alimentar ($P = 0,07$), ao qual os cordeiros na dieta CON foram mais eficientes comparado aos cordeiros alimentados com MS20, média de 0,24 e 0,21 respectivamente. Nas demais variáveis, como peso corporal inicial e final, não houve efeito das dietas experimentais ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Consumo e desempenho de cordeiros terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
CMS, g	1131,61	1035,57	63,66	0,32
CMS, %PC	3,93	3,78	0,12	0,46
CPB, g	180,93	173,47	8,36	0,57
EA	0,24	0,21	0,01	0,07
PCi, kg	21,32	21,30	1,15	0,98
PCf, kg	37,77	34,90	1,69	0,21
GMD, g	261,17	215,94	13,76	0,13

¹ – CMS: Consumo de matéria seca; CMS, %PC: Consumo de matéria seca em relação ao peso corporal; CPB: Consumo de proteína bruta;

EA: Eficiência alimentar; PCi: Peso corporal inicial; PCf: Peso corporal final; GMD: Ganho médio diário.

² – EPM: Erro padrão da média

- Parâmetros sanguíneos

Não houve efeitos de dieta para as variáveis de parâmetros sanguíneos ($P > 0,05$ – Tabela 3), com exceção de triglicerídeos totais, ao qual cordeiros MS20 tiveram maiores médias em relação aos cordeiros pertencentes a dieta CON ($P = 0,05$), em que a inclusão do MSO aumentou as concentrações da variável, média de 30,89 mg dL⁻¹ para CON e 34,80 mg dL⁻¹ para MS20.

Tabela 3 – Parâmetros sanguíneos de cordeiros terminados em confinamento

Item	CON	MS20	EPM ¹	P - valor
Proteína total, g/dL	4,52	4,34	0,10	0,65
Ureia, mg/dL	26,79	27,79	1,17	0,86
Colesterol, mg/dL	55,15	52,95	1,80	0,50
Triglicerídeos, mg/dL	30,89	34,80	1,98	0,05
Glicose, mg/dL	89,34	88,55	2,48	0,99

¹ – EPM: Erro padrão da média

- Características de carcaça e qualidade da carne

Não houve efeito de tratamento sobre a maioria das variáveis ($P > 0,05$), com exceção para peso do fígado apresentado de forma proporcional ao peso corporal final dos animais ($P = 0,04$ – Tabela 4), ao qual a dieta MS20 aumentou o peso de fígado em relação ao peso corporal comparado à dieta controle.

A adição do subproduto da soja na dieta dos animais não influenciou a carcaça e nem os parâmetros físicos e químicos avaliados na carne, como peso de carcaça, rendimento, espessura de gordura subcutânea, força de cisalhamento e lipídeos totais ($P > 0,05$ – Tabela 5).

Tabela 4 – Característica de carcaça e de cordeiros terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
PCQ, kg	18,70	17,61	0,95	0,36
PCF, kg	18,27	17,21	0,93	0,37
RC, %	49,22	50,25	0,53	0,15
PR, %	2,39	2,31	0,06	0,39
Fígado, g	673,20	673,80	30,49	0,99
Fígado, % PC	1,78	1,94	0,04	0,04
EGS, mm	1,93	2,22	0,25	0,74

¹ – PCQ: Peso de carcaça quente; PCF: Peso de carcaça fria; RC: Rendimento de carcaça; PR: Perda por resfriamento; Fígado, %PC: Peso do fígado em relação ao peso corporal; EGS: Espessura de gordura subcutânea.

² – EPM: Erro padrão da média

Tabela 5 – Análises do músculo *Longissimus thoracis* de cordeiros terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
<i>Análises físicas</i>				
pH	5,73	5,69	0,05	0,70
AOL, cm ²	12,83	12,30	0,78	0,68
CRA, %	83,18	82,87	1,07	0,68
PPC, %	27,06	27,68	0,96	0,76
WBSF, N	29,32	28,46	2,14	0,83
<i>Análises químicas</i>				
Umidade, %	75,62	75,85	0,30	0,70
Cinzas, %	1,17	1,22	0,04	0,88
PB, %	18,95	18,60	0,18	0,27
Lipídeo total, %	4,60	4,72	0,29	0,75
Malonaldeído, mg/kg	0,83	0,69	0,08	0,097

¹ – AOL: Área de olho de lombo (*Longissimus thoracis*); CRA: Capacidade de retenção de água; PPC: Perda por cocção; WBSF: Warner Bratzler – Força de cisalhamento; PB: Proteína bruta.

² – EPM: Erro padrão da média

- Vida de prateleira – “Shelf life”

A análise de vida de prateleira da carne foi mensurada até 14 dias após o abate, e para todas as variáveis, como esperado, houve efeito de dia na avaliação da cor ($P < 0,05$ – Tabela 6). Contudo, o objetivo é avaliar o efeito do MSO sobre a vida de prateleira da carne dos cordeiros, que não acarretou alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados na coloração da carne ($P > 0,05$).

Tabela 6 – Avaliação da vida de prateleira da carne de cordeiros terminados em confinamento

Item ¹	Dieta	Dia de armazenamento					EPM ²	P - valor	
		0	1	7	10	14		Dieta	Dieta*Dia
L	CON	45,66	46,02	47,75	46,53	16,36	0,26	0,39	0,87
	MS20	46,35	47,34	48,05	48,24	47,04			
a*	CON	12,50	13,75	10,07	10,08	9,88	0,19	0,87	0,81
	MS20	12,67	13,30	10,38	9,90	10,22			
b*	CON	4,96	7,38	5,58	5,66	5,69	0,13	0,33	0,87
	MS20	5,03	7,34	6,11	5,92	6,29			
a*/b*	CON	2,51	1,86	1,82	1,81	1,67	0,05	0,27	0,94
	MS20	2,38	1,86	1,72	1,70	1,63			
Chroma	CON	13,47	15,60	11,52	11,56	11,45	0,21	0,50	0,82
	MS20	13,67	15,22	12,06	11,56	12,02			
Hue	CON	21,25	28,24	28,84	29,13	30,32	0,50	0,25	0,89
	MS20	21,36	28,79	30,51	29,98	31,70			

¹ – L: Luminosidade; a*: Intensidade de vermelho; b*: Intensidade de amarelo.

² – EPM: Erro padrão da média

- Celularidade de adipócitos

A inclusão do MSO na dieta dos cordeiros em confinamento influenciou no tamanho dos adipócitos subcutâneos, ao qual aumentou o diâmetro médio, média de 14,45 μm para CON e 17,38 μm para MS20 ($P = 0,01$ – Tabela 7), área com médias de 209,31 μm^2 para CON e 326,69 μm^2 para MS20 ($P = 0,01$), reduziu a frequência de adipócitos com área menor que 100 μm^2 , média de 33,69% - CON e 28,06% - MS20 ($P = 0,01$), aumentou a frequência de adipócitos com área entre 300 e 500 μm^2 , média de 8,61% para CON e 14,35 para MS20 ($P = 0,04$) e demonstrou tendência para os adipócitos acima de 500 μm^2 ($P = 0,06$).

Em contrapartida, a dieta CON proporcionou maior número de células adiposas no tecido subcutâneo ($2,37 \times 10^4$ – CON *versus* $1,62 \times 10^4$ – MS20 – $P = 0,01$), enquanto no tecido intramuscular não evidenciou efeito de tratamento ($P > 0,05$).

Tabela 7 – Celularidade de adipócitos de cordeiros terminados em confinamento

Item	CON	MS20	EPM ¹	P - valor
<i>Tecido Subcutâneo</i>				
Diâmetro médio, μm	14,45	17,38	0,63	0,01

Área, μm^2	209,31	326,69	25,62	0,01
N° Células $\times 10^4 \text{ g}^{-1}$	2,37	1,62	0,17	0,01
% < 100 μm^2	33,69	28,06	2,41	0,11
100 < % < 300 μm^2	50,37	40,77	2,89	0,05
300 < % < 500 μm^2	8,61	14,35	1,71	0,04
% > 500 μm^2	9,63	18,49	2,43	0,06
<i>Tecido Intramuscular</i>				
Diâmetro médio, μm	16,83	16,45	0,66	0,72
Área, μm^2	319,12	295,12	26,04	0,57
N° Células $\times 10^3 \text{ g}^{-1}$	5,22	5,50	0,68	0,94
% < 100 μm^2	33,42	33,81	2,61	0,94
100 < % < 300 μm^2	36,13	38,01	1,92	0,56
300 < % < 500 μm^2	11,93	10,28	1,57	0,54
% > 500 μm^2	18,53	17,90	2,28	0,65

¹ – EPM: Erro padrão da média

- Avaliação geral da expressão gênica

Todo o transcriptoma das oito amostras dos músculos de cordeiros machos não castrados alimentados ou não com melaço de soja, foram sequenciados utilizando tecnologia RNA-seq. Os dados do sequenciamento foram avaliados mediante contraste, MS20 vs. CON, ao qual resultou em 11247 genes mapeados lidos que foram eficientemente usados na análise de expressão gênica, ao qual foram encontrados 202 genes diferencialmente expressos na comparação pairwise. Adicionalmente foi realizada a análise de CeTFs, coexpressão e fatores de transcrição, para identificação dos genes mesmo que em menores níveis de expressão ou não diferencialmente expressos, mas que são relevantes na expressão de outros genes, identificando outros 128 genes. Também são descritos os Top 100 genes exclusivos para cada dieta, ao qual são candidatos à genes constitutivos “housekeeping” e genes mais influenciados/variáveis para cada dieta experimental.

- Expressão gênica diferencial

A análise do transcriptoma do músculo dos cordeiros revelou 202 genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$), dos quais 135 foram super expressos e 67 suprimidos para MS20 em comparação ao CON (Figura 2 e Tabela S2). Dentre os

DEG estão: *ALDOB* (aldolase, frutose bifosfato B) envolvido no metabolismo da frutose, *FABP4* (proteína ligadora de ácido graxo 4) no transporte de ácidos graxos e *PPARG* (peroxissoma proliferador ativado receptor gama) na adipogênese, todos super expressos para MS20.

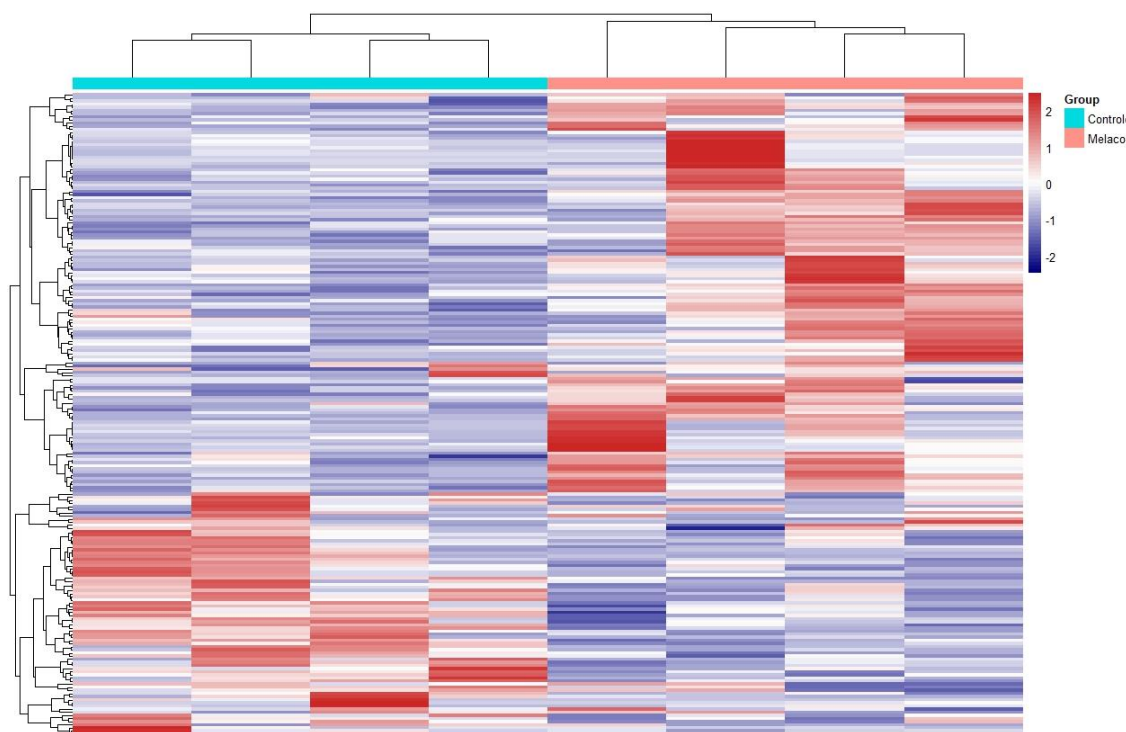


Figura 2 – Gráfico heatmap com os genes diferencialmente expressos no músculo de cordeiros machos alimentados com dieta MS20 e CON.

- Análise de co-expressão e fatores de transcrição

A análise de rede foi usada para investigar diferenças em genes co-expressos e identificar os fatores de transcrição. A análise de CeTF identificou 128 fatores de transcrição para a comparação MS20 *versus* CON (Tabela S3). Adicionalmente, foi realizado análise de enriquecimento funcional KEGG e GO, ao qual foi encontrado vias metabólicas significativas relacionadas a via de sinalização à insulina (hsa04910), resistência à insulina (hsa04931), via de sinalização e metabolismo de frutose e manose (hsa00051 – Tabela 8 e Figura 3). Além de termos ontológicos GO sobre a

diferenciação de células de gordura (GO:0045444), contração de músculo esquelético (GO:0006941), transporte de ácido graxo de cadeia longa (GO:0015909), hipertrofia muscular (GO:0014896), transporte de carboidrato (GO:0008646), regulação de gliconeogênese (GO:0006111 – Tabela S4).

Tabela 8 – Vias significativas para genes fatores de transcrição obtidos por análise de CeTF em comparação de dietas MS20 *versus* CON.

ID	Descrição	FDR	Genes
hsa04152	AMPK Signaling pathway	$3,67 \times 10^{-9}$	FBP2, FOXO1, PFKFB4, PPARGC1A, PRKAG3, SLC2A4, PIK3R1
hsa04910	Insulin signaling pathway	$8,56 \times 10^{-9}$	FBP2, FOXO1, PPARGC1A, PRKAG3, SLC2A4, SORBS1, PIK3R1
hsa04931	Insulin resistance	$1,79 \times 10^{-4}$	FOXO1, PPARGC1A, PRKAG3, PRKCQ, SLC2A4, PIK3R1
hsa04920	Adipocytokine signaling pathway	$1,97 \times 10^{-3}$	PPARGC1A, PRKAG3, PRKCQ, SLC2A4
hsa00051	Fructose and mannose metabolism	0,02	FBP2, PFKFB4

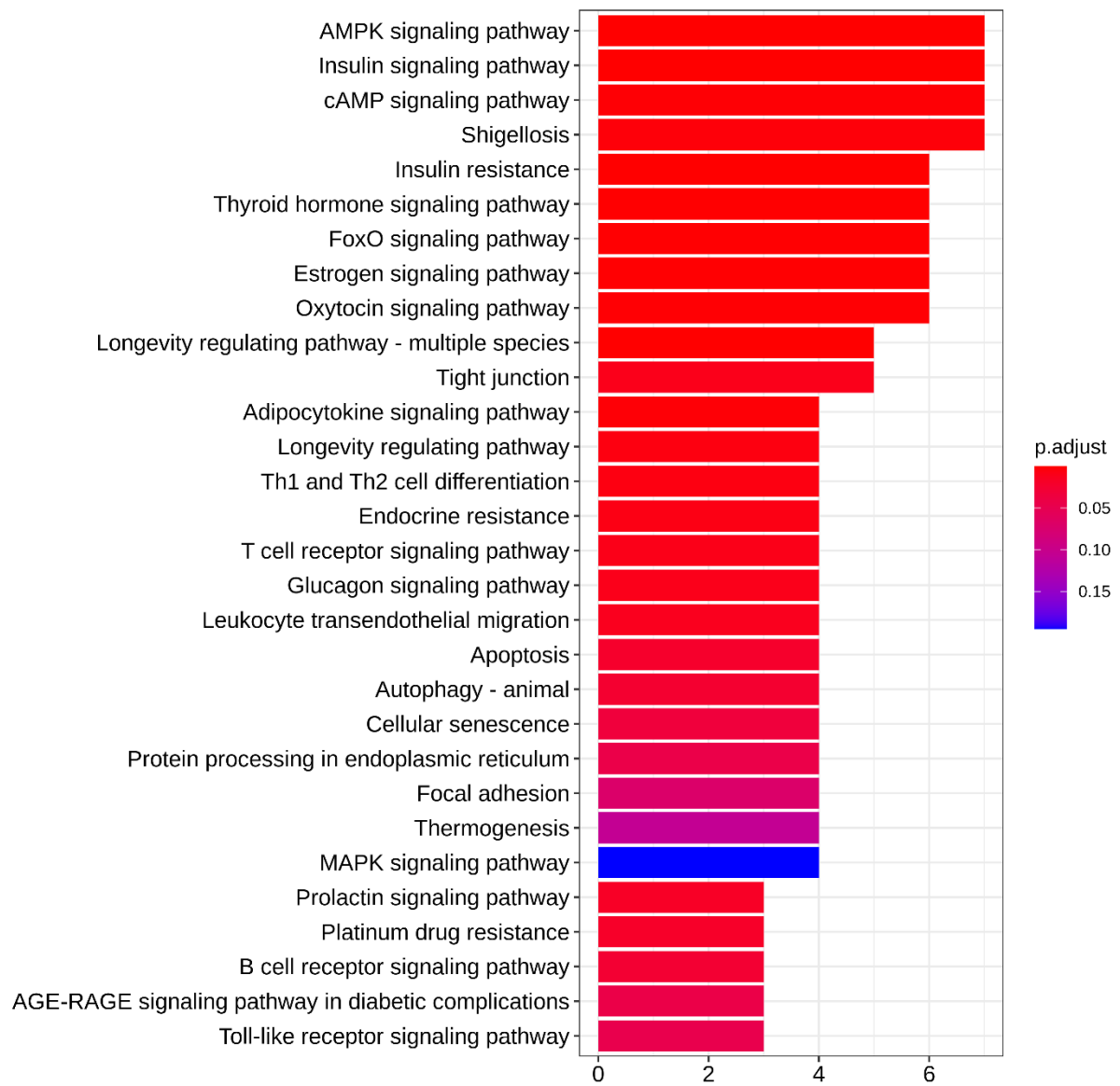


Figura 3 – Vias significativas obtidas pelo enriquecimento funcional KEGG dos genes fatores de transcrição, obtidos pela análise de CeTF.

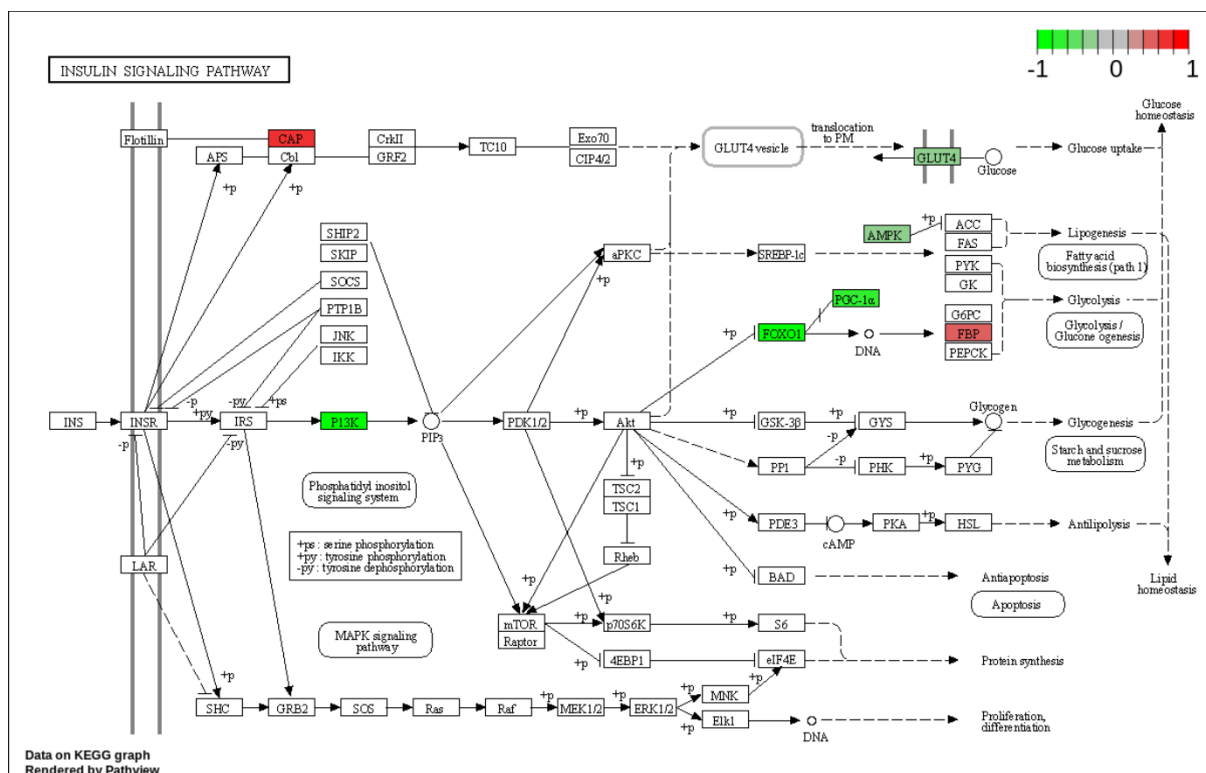


Figura 4 – Destaque dos genes influenciados pela dieta na via de sinalização à insulina, genes destacados em verde estão suprimidos e genes em vermelho estão super expressos em cordeiros alimentados com dieta MS20.

Discussão

O uso do melaço de soja na dieta de ruminantes é comumente utilizado com finalidade de agregar aceitabilidade e umidade às dietas de confinamento, por ser um ingrediente líquido e rico em carboidratos como sacarose e estaquiose, muito embora também possa ser utilizado como auxiliar de granulação e até mesmo como uma alternativa energética (Rakita et al., 2021) com potencial em melhorar a relação de ácidos graxos $\omega 6/\omega 3$ (Arruda et al., 2021) e, aumentar maciez e marmoreio na carne ovina (Rodrigues et al., 2020).

A semelhança entre os tratamentos observada para o consumo pode ser explicada pela boa aceitação do MSO pelos cordeiros, como também já evidenciado por outros estudos (van Cleef et al., 2018; Almeida et al., 2018; Rodrigues et al., 2020 e Arruda et al., 2021). Adicionalmente, as dietas foram formuladas para serem semelhantes nos teores de energia e proteína, favorecendo o consumo semelhante

entre os tratamentos. O menor consumo observado na dieta MS20 com média de 1035,57 g de MS, não foi muito distante do consumo estimado pelo NRC (2007) em 1110 g de MS.

No presente estudo, o uso do MSO na dieta de cordeiros machos não castrados não interferiu significativamente no desempenho dos animais, mas reduziu a eficiência alimentar em 12,5 %. Possivelmente a menor eficiência dos cordeiros pertencentes ao tratamento MS20 seja consequência das diferenças não significativas no ganho, peso corporal final, rendimento de carcaça e espessura de gordura subcutânea, que culminaram em redução na eficiência alimentar. Rodrigues et al. (2020) também demonstrou menor eficiência para cordeiros alimentados com MSO, embora tenha justificado com maior custo energético dos animais para aumentar a deposição de gordura na carne, comparado ao custo de deposição muscular.

As alterações dietéticas entre os dois tratamentos foram majoritariamente nas frações energéticas, em grande parte pelo perfil de carboidratos, com redução de 28 % do amido e acréscimo de 84 % de carboidratos solúveis, do tratamento CON para MS20, o que altera de forma significativa o substrato presente no rúmen. O amido fornece mais unidades de carbono por peso equivalente comparado ao carboidrato solúvel como a sacarose (Hall e Herejk, 2001), o que poderia desfavorecer o ganho em carcaça dos animais alimentados com MSO. Contudo, o balanço energético equiparado foi oriundo do óleo da soja residual presente no farelo de soja, que aumentou em 31 % o nível de extrato etéreo da dieta CON para MS20, contribuindo para resultados semelhantes no peso e rendimento de carcaça.

A mudança do substrato energético da dieta provavelmente ocasionou maior atividade hepática para MS20 ao aumentar o peso de fígado proporcionalmente ao peso corporal (1,78 % – CON *versus* 1,94 % - MS20). O fígado é um órgão vital quanto ao metabolismo energético, pois desempenha muitos processos metabólicos, a exemplo da gliconeogênese, rota de fundamental importância para a obtenção de glicose em animais ruminantes (Donkin, 2016; Fonseca et al., 2019). Fígados com elevada atividade metabólica são maiores e mais pesados (Zhu et al., 2021), o que pode inferir que no presente estudo há maior atividade metabólica, mas não de ordem de distúrbios necessariamente pois, todos os fígados foram avaliados individualmente

e nenhum deles apresentou abscesso hepático, o que denota um bom aproveitamento da dieta sem distúrbios metabólicos (Hernández et al., 2014).

Ao avaliar a substituição do milho por MSO na dieta de cordeiros confinados contendo 600 g kg⁻¹ de concentrado, Rodrigues et al. (2020) atribui o aumento em 44 % na gordura intramuscular ao possível maior aporte de frutose no lúmen intestinal e músculo dos animais, uma vez que seu potencial lipogênico é maior que a glicose no fornecimento de acetil-CoA para a *síntese de novo*. A oxidação da frutose converge à via glicolítica após o ponto de regulação pela enzima fosfrutoquinase-1, via feedback de ATP e citrato, portanto, não é regulada mediante a concentração do produto da rota metabólica (Jegatheesan e Brandt, 2017). No atual estudo, embora não tenha tido efeitos para espessura de gordura subcutânea e nem para gordura intramuscular, os cordeiros alimentados com MS20 tiveram maior tamanho dos adipócitos no tecido subcutâneo, tanto diâmetro médio como área total, além de maior expressão gênica para as enzimas presentes no metabolismo da frutose como: frutose 2,6 bifosfatase 1, frutose 1,6 bifosfatase 1 e frutose bifosfatase aldolase codificadas pelos genes *PFKFB1*, *FBP2* e *ALDOB*, respectivamente. Estas enzimas foram identificadas como fator de transcrição, gene co-expresso e diferencialmente expresso, respectivamente, o que pode indicar maior concentração de carboidratos solúveis no músculo. Ao avaliar a adição de 4,3% de xarope de milho rico em frutose diluído na água de bovinos de corte, Volpi-Lagrecia e Duckett (2016) também relataram diferenças apenas no tamanho dos adipócitos, justificando a ausência de efeito no conteúdo de gordura subcutâneo e intramuscular à baixa dosagem adotada e curto período experimental.

Embora os adipócitos tenham tido efeito apenas no tecido subcutâneo, deve-se considerar que a expressão gênica no tecido intramuscular é significativamente menor que a expressão gênica no tecido subcutâneo (Deng et al., 2020), o que pode indicar expressões ainda maiores no tecido subcutâneo. Reforçando a hipótese lançada por Rodrigues et al. (2020) de que o MSO aumenta a adipogênese em cordeiros, uma vez que o conteúdo de gordura é intimamente relacionado com tamanho e volume dos adipócitos (Hongfang et al., 2022).

A deposição de gordura na carcaça é o produto de inúmeros fatores dependentes de idade, raça, peso ao abate, dieta e taxa de crescimento (Pewan et al., 2020) e não possui distribuição homogênea no corpo animal, a deposição

observada inicia-se na cavidade abdominal, seguida pela intermuscular, subcutânea e por último a intramuscular (Ladeira et al., 2016). Portanto, no presente estudo a maior atividade lipogênica do MSO foi restrita a expressão gênica no músculo e tamanho dos adipócitos subcutâneos, o que indica que há algum evento de regulação pós transcricional ou que para observar efeito na carcaça e carne seria necessário um período maior de alimentação com MSO ou maiores níveis de inclusão, para maior intensificação dos efeitos transcripcionais.

Adicionalmente, a dieta MS20 proporcionou maior transcrição de genes envolvidos diretamente no metabolismo lipídico, como *FABP3*, *FABP4*, *PLTP*, *ADIPOQ*, *PLIN1*, *SORBS1*, *UBC* e *PPARG*, todos super expressos na via de sinalização PPAR. A proteína de ligação de ácido graxo 3 e 4 (*FABP3* e *FABP4*) possui funções de transporte intracelular de metabólitos lipídicos e são altamente induzidos durante a diferenciação de adipócitos (Furuhashi et al., 2014; Wang et al., 2021). Enquanto os genes *PPARG*, *PLTP*, *ADIPOQ* e *SORBS1* estão envolvidos no processo de diferenciação dos adipócitos, estoque de lipídeos, transporte de lipídeos e lipoproteínas, e metabolismo de glicose e colesterol (Albers et al., 2012; Bionaz et al., 2013; Ghanem et al., 2022; Gong et al., 2022).

Enquanto o MSO ocasionou hipertrofia nos adipócitos subcutâneos, a dieta CON proporcionou hiperplasia das células de gordura. Embora não se tenha um período estabelecido de proliferação das células adiposas para cordeiros, em bovinos de corte a hiperplasia ocorre em até aproximadamente 250 d pós-natal, para o tecido intramuscular e pouco menos para outros tecidos (Du et al., 2017). No presente estudo os animais tinham aproximadamente 161 d quando foram abatidos, portanto ainda dentro do período de proliferação dos adipócitos estabelecido para bovinos de corte. Dentre os top 100 genes exclusivos à dieta CON mais variáveis estão os genes *SPINK5* e *SLITRK6* que codificam o inibidor de serina peptidase Kazal tipo 5 e SLIT e NTRK como membro da família 6, respectivamente. Ambos os genes foram relatados significativamente como genes diferencialmente expressos em pré-adipócitos de ovinos cultivados *in vitro* (Xiao et al., 2021), indicando participação na atividade de hiperplasia dos adipócitos.

Portanto, uma vez que os cordeiros terminados em sistemas intensivos no Brasil possuem o objetivo de atender a demanda nacional por carne de cordeiro, tem

como característica conduzir os animais ao abatedouro com idade aproximada de 120 dias de idade (Ricardo et al., 2015), período de plena fase de proliferação dos adipócitos como o corrido na dieta CON. O que o atual estudo demonstra é que a inclusão de MSO na dieta parece acelerar ou antecipar a diferenciação dos adipócitos (adipogênese), ao proporcionar maior estocagem de triglicerídeos no interior dos pré-adipócitos, como demonstrado pelo maior tamanho dos adipócitos subcutâneos. Naturalmente a adipogênese ocorreria somente após o fim do crescimento muscular, quando os animais alcançam a maturidade (Du et al., 2017).

Eventos semelhantes também parecem ocorrer em bovinos leiteiros ao aumentar o rendimento de sólidos no leite, especialmente gordura. Ao alimentar vacas leiteiras com 150 g kg⁻¹ de uma mistura de casca de soja ou farelo de trigo com MSO numa razão de 10:3, Chen et al. (2021) encontrou maior conteúdo de proteína e gordura no leite. Semelhantemente, Miletic et al. (2017) adicionou uma pequena quantidade de MSO na dieta de vacas leiteiras (aprox. 35 g kg⁻¹) e encontrou maior rendimento de leite corrigido para 4% de gordura.

O uso do MSO na dieta de cordeiros também ocasionou uma série de mudanças no metabolismo de insulina. Genes envolvidos na via de sinalização da insulina e resistência à insulina foram suprimidos na dieta MS20. A via de sinalização a insulina possui o objetivo de ativar o transportador de glicose, GLUT4, para transportar a glicose para interior da célula, e no caso do músculo, estocá-la na forma de glicogênio, em casos de excedente (Rosenzweig e Sampson, 2021). Genes como *PIK3R1*, *PPP1CB*, *PPARGC1A* incluindo o gene codificador do GLUT4, *SLC2A4*, estão suprimidos evidenciando uma redução na sensibilidade a insulina e síntese de glicogênio muscular comparado aos animais da dieta CON (Figura 4). Possivelmente a expressão gênica de genes envolvidos na sinalização da insulina foi reduzida devido a maior presença de ácidos graxos nas células, diacilglicerol induz a expressão gênica do *PRKCQ* que por consequência inibe a sinalização a insulina, ao ativar a fosforilação nos resíduos de serina no receptor de insulina, reduzindo sua expressão (Dresner et al., 1999). Adicionalmente, a dieta MS20 proporcionou maior concentração de triglicerídeos séricos nos cordeiros, aumentando sua circulação em 11%, corroborando com os dados de expressão gênica.

Conclusão

Como conclusão o uso de MSO na dieta de cordeiros machos não castrados em terminação reduz a expressão gênica de genes envolvidos na sinalização da insulina mediante maior circulação de triglicerídeos totais no sangue e intensifica o metabolismo de lipídeos ao aumentar a expressão de genes com regulação adipogênica como o *FABP4* e *PPARG* evidenciado pelo maior tamanho dos adipócitos subcutâneos. Estudos adicionais são necessários para avaliar se a presença de efeitos na gordura intramuscular está atrelada ao maior período de alimentação com MSO ou maiores níveis de inclusão na dieta.

Referências

- Albers JJ, Vuletich S, Cheung MC (2012) Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids** 1821(3), 345-357.
- Almeida M, van Cleef E, Paschoaloto J, Castro Filho E, Barducci R, Soragni G, Zampieri Neto E, Pedro A, Ezequiel J (2018) PSXV-32 Effects of increasing inclusion of soybean molasses on rumen fermentation of feedlot sheep. **Journal of Animal Science** 96:suppl_3,476.
- AMSA - American Meat Science Association (1995) **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and tenderness measurements of fresh meat**. National Livestock and Meat Board, ChicagoIL.
- AMSA - American Meat Science Association (2012) **Meat color measurement guidelines**. American Meat Science Association. Champaign, Illinois.
- AOAC (1990). **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists** (15th ed.). Washington, DC.
- Arruda MCG, Almeida MTC, Bertoco JPA, Pereira-Junior SA, Castro-Filho ES, Feliciano AL, Rodrigues JL, Torres RNS, Costa RV, Grilo LMSFSS, Ezequiel JM (2021) Soybean molasses to replace corn for feedlot lambs on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. **Translational Animal Science** 5(1), txaa230.

Biagi Junior CO, Nociti RP, Brotto DB et al. CeTF: an R/Bioconductor package for transcription factor co-expression networks using regulatory impact factors (RIF) and partial correlation and information (PCIT) analysis. **BMC Genomics** 22, 624.

Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Looor JJ (2013) Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research**.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemical Physiology** 37 (8), 911–917.

Cesar ASM, Regitano LCA, Poleti MD, Andrade SCS, Tizioto PC, Oliveira PSN, Felício AM, do Nascimento ML, Chaves AS, Lanna DPD (2016) Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genomic** 17, 961.

Chen L, Mi H, Li B, Liu Y, Zhou C, Ren A, Zhang G (2021). Offering soybean molasses adsorbed to agricultural by-products improved lactation performance through modulating plasma metabolic enzyme pool of lactating cows. **Food Science & Nutrition** 9(12), 6447-6457.

CIE - International Commission on Illumination (2004) Colorimetry technical report. In: DeFraen JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Jardon PW Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science** 87, 4195–4206.

Deng K, Ren C, Fan Y, Liu Z, Zhang G, Zhang Y, Wang F (2020). miR-27a is an important adipogenesis regulator associated with differential lipid accumulation between intramuscular and subcutaneous adipose tissues of sheep. **Domestic Animal Endocrinology** 71, 106393.

Detmann E, Costa e Silva LF, Rocha GC, Palma MNN, Rodrigues JPP (2021) **Métodos para Análise de Alimento**. 2nd ed. Suprema: Visconde do Rio Branco, Brazil.

Donkin SS (2016) **Control of hepatic gluconeogenesis during the transition period**. In: 27th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Department of Animal Sciences, University of Florida, IFAS, Gainesville, FL.

Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Shulman GI (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1–associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **The Journal of Clinical Investigation** 103(2), 253-259.

Du M, Ford SP, Zhu MJ (2017) Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers** 7(3), 5-11.

Etherton TD, Thompson EH, Allen CE (1977) Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism. **Journal of Lipid Research** 18(4), 552-557.

Fonseca LD, Eler JP, Pereira MA, Rosa AF, Alexandre PA, Moncau CT, Salvato F, Fernandes LR, Palmisano G, Ferraz JBS, Fukumasu H (2019) Liver proteomics unravel the metabolic pathways related to feed efficiency in beef cattle. **Scientific Reports** 9(1), 1-11.

Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T (2014) Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. **Clinical Medicine Insights: Cardiology** 8, CMC-S17067.

Ghanem N, Zayed M, Mohamed I, Mohammady M, Shehata MF (2022) Co-expression of candidate genes regulating growth performance and carcass traits of Barki lambs in Egypt. **Tropical Animal Health and Production** 54(5), 260.

Gong S, Huo S, Luo Y, Li Y, Ma Y, Huang X, Ji L (2022) A variation in SORBS1 is associated with type 2 diabetes and high-density lipoprotein cholesterol in Chinese population. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews** 38(5), e3524.

Hall MB (2000) **Neutral Detergent-Soluble Carbohydrates Nutritional Relevance and Analysis**. University of Florida, Gainesville.

Hamm R (1986) **Functional properties of themiofibrilar system and their measurement**. In: Bechtel PJ (Ed.), *Muscle as Food* Orlando. Academic Press, pp. 135–199.

Hall MB, Herejk C (2001) Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science** 84(11), 2486-2493.

Hernández J, Benedito JL, Abuelo A, Castillo C (2014) Ruminant acidosis in feedlot: from aetiology to prevention. **The Scientific World Journal**

Hongfang G, Khan R, Raza SHA, Nurgulsim K, Suhail SM, Rahman A, Linsen Z (2022) Transcriptional regulation of adipogenic marker genes for the improvement of intramuscular fat in Qinchuan beef cattle. **Animal Biotechnology** 33(4), 776-795.

Houben JH, van Dijk A, Eikelenboom G, Hoving-Bolink AH (2000) Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. **Meat Science** 55 (3), 331–336.

Jegatheesan P, De Bandt JP (2017) Fructose and NAFLD: the multifaceted aspects of fructose metabolism. **Nutrients** 9(3), 230.

Ladeira MM, Schoonmaker JP, Gionbelli MP, Dias J, Gionbelli TRS, Carvalho JRR Teixeira PD (2016) Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International Journal of Molecular Sciences** 17, 918.

Ladeira MM, Schoonmaker JP, Swanson KC, Duckett SK, Gionbelli MP, Rodrigues LM, Teixeira PD (2018). Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. **Animal** 12(s2), s282-s294.

Lambe NR, McLean KA, Gordon J, Evans D, Clelland N, Bunger L (2017) Prediction of intramuscular fat content using CT scanning of packaged lamb cuts and relationships with meat eating quality. **Meat Science** 123, 112-119.

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019) The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. **Nucleic Acids Research** 47, e47.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol** 15, 550.

Miletić A, Stojanović B, Grubić G, Stojić P, Radivojević M, Joksimović-Todorović M, Obradović S (2017) The soybean molasses in diets for dairy cows. **Mljekarstvo** 67(3), 217-225.

Miller R (2014) Palatability. In.: Dikeman M, Devine C (Eds.) **Encyclopedia of meat sciences**. London: Elsevier, p. 252–261.

Miller R (2020) Drivers of consumer liking for beef, pork, and lamb: A review. **Foods** 9(4), 428.

National Research Council – NRC (2001) **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. (7th ed.). National Academic Press, Washington, DC.

National Research Council – NRC (2007). **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. (7th ed.). National Academic Press, Washington, DC.

Pannier L, Pethick DW, Geesink GH, Ball AJ, Jacob RH, Gardner GE (2014) Intramuscular fat in the longissimus muscle is reduced in lambs from sires selected for leanness. **Meat Science** 96(2), 1068-1075.

Pewan SB, Otto JR, Huerlimann R, Budd AM, Mwangi FW, Edmunds RC, Holamnn BWB, Henry MLE, Kinobe RT, Adegboye OA, Malau-Aduli AEO (2020) Genetics of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid metabolism and meat eating quality in Tattykeel Australian White lambs. **Genes** 11(5), 587.

Prior RL (1983) Lipogenesis and adipose tissue cellularity in steers switched from alfalfa hay to high concentrate diets. **Journal of Animal Science** 56(2), 483-492.

Rakita S, Banjac V, Djuragic O, Cheli F, Pinotti L (2021) Soybean molasses in animal nutrition. **Animals** 11(2), 514.

Reverter A, Chan E. (2008) Combining partial correlation and an information theory approach to the reversed engineering of gene co-expression networks. **Bioinformatics** 24(21):2491–7.

Reverter A, Hudson N, Nagaraj S, Pérez-Enciso M, Dalrymple B (2010) Regulatory impact factors: unraveling the transcriptional regulation of complex traits from expression data. **Bioinformatics** 26(7):896–904.

Ricardo HA, Fernandes ARM, Mendes LCN, Oliveira MAG, Protes VM, Scatena EM, Alves LGC (2015) Carcass traits and meat quality differences between a traditional and an intensive production model of market lambs in Brazil: Preliminary investigation. **Small Ruminant Research** 130, 141-145.

Ripoll G, Blanco M, Panea B, Joy M (2018) The effect of carcass weight on fatness and muscle and fat colour of male Ojinegra de Teruel light lambs. **Animal Production Science** 59(6), 1168-1175.

Rodrigues JL, Pereira-Junior SAG, Castro Filho ES, Costa RV, Barducci RS, van Cleef EHCB, Ezequiel JMB (2020). Effects of elevated concentrations of soybean molasses on feedlot performance and meat quality of lambs. **Livestock Science** 240, 104155.

Rosenzweig T, Sampson SR (2021) Activation of insulin signaling by botanical products. **International Journal of Molecular Sciences** 22(8), 4193.

Phelps MR, Garmyn A, Brooks JC, Mafi G, Duckett S, Legako J, O'Quinn TGO, Miller MF (2018) Effects of marbling and postmortem aging on consumer assessment of United States lamb loin. **Meat and Muscle Biology** 2(1).

Silva Sobrinho AG (1999) **Body composition and characteristics of carcass from lambs of different genotypes and ages at slaughter**. Palmerston North. Massey University.

Souza FN, Monteiro AM, dos Santos PR, Sanchez EMR, Blagitz MG, Latorre AO, Figueiredo Neto AM, Gidlund M, Della Libera AM (2011) Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in bovine leukemia virus-infected dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 143(1-2), 162-166.

Stewart SM, Lauridsen T, Toft H, Pethick DW, Gardner GE, McGilchrist P, Christensen M (2021) Objective grading of eye muscle area, intramuscular fat and marbling in Australian beef and lamb. **Meat Science** 181, 108358.

Teixeira PD, Oliveira DM, Chizzotti ML, Chalfun-Junior A, Coelho TC, Gionbelli M, Paiva LV, Carvalho JRR, Ladeira MM (2017) Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. **Meat Science** 133, 110-118.

Valadares Filho SC, Lopes, AS, et al., (2018) CQBAL 4.0. **Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes**. Disponível em: www.cqbal.com.br

van Cleef E, Almeida M, Paschoaloto J, Castro Filho E, Barducci R, Soragni G, Zampieri Neto E, Pedro A, Ezequiel J (2018) PSXV-17 Effects of increasing concentrations of soybean molasses on feed intake, growth performance, carcass and meat traits of feedlot lambs. **Journal of Animal Science** 96: 3

Vaquerizas J, Kummerfeld S, Teichmann S, Luscombe NA (2009) Census of human transcription factors: function, expression and evolution. **Nat Ver Genet** 10(4):252–63.

Volpi-Lagreca G, Duckett SK (2016) Supplementation of glycerol or fructose via drinking water to enhance marbling deposition and meat quality of finishing cattle. **Journal of Animal Science** 94(2), 858-868.

Vyncke W 1(970) Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichm** 72:1084–1087.

Wang Z, Tu J, Zhou H, Lu A, Xu B (2021) A comprehensive insight into the effects of microbial spoilage, myoglobin autoxidation, lipid oxidation, and protein oxidation on the discoloration of rabbit meat during retail display. **Meat Science** 172, 108359.

Wheeler TL, Vote D, Leheska JM, Shackelford SD, Belk KE, Wulf DM, Gwartney BL, Koohmaraie M (2002) The efficacy of three objective systems for identifying beef cuts that can be guaranteed tender. **Journal of Animal Science** 80 (12), 3315–3327.

Xiao C, Wei T, Liu LX, Liu JQ, Wang CX, Yuan ZY, Cao Y (2021) Whole-transcriptome analysis of preadipocyte and adipocyte and construction of regulatory networks to investigate lipid metabolism in sheep. **Frontiers in Genetics** 12, 662143.

Zhu YX, Hu HQ, Zuo ML, Mao L, Song GL, Li TM, Dong LC, Yang ZB, Ali Sheikh MS (2021) Effect of oxymatrine on liver gluconeogenesis is associated with the regulation of PEPCK and G6Pase expression and AKT phosphorylation. **Biomedical Reports** 15(1), 1-10.

Tabela S1 – Concentração e integridade do mRNA das amostras de cordeiros não castrados

Dieta	Concentração ng/μL	Razão 260/280	RIN
CON	465	2,18	8,6
CON	741	2,15	8,4
CON	588	2,18	8,7
CON	662	2,16	8,6
MS20	620	2,17	8,8
MS20	727	2,16	9,2

MS20	729	2,16	7,5
MS20	632	2,17	9,1

Tabela S2 – Lista de todos os genes diferencialmente expressos obtidas em contraste de MS20 versus CON em cordeiros machos não castrados

Ensembl Gene	Gene	log2 FoldChange	P-value
ENSG00000146386	ABRACL	1,283	0,004
ENSG00000166743	ACSM1	1,672	0,007
ENSG00000005187	ACSM3	2,328	0,008
ENSG00000183549	ACSM5	-0.774	0,022
ENSG00000197381	ADARB1	-0.654	0,037
ENSG00000143199	ADCY10	-2,138	0,034
ENSG00000181092	ADIPOQ	2,211	0,001
ENSG00000148671	ADIRF	0.862	0,007
ENSG00000150594	ADRA2A	2,028	0,015
ENSG00000169252	ADRB2	0.820	0,036
ENSG00000135439	AGAP2	-1,023	0,002
ENSG00000136872	ALDOB	3,529	0,016
ENSG00000151458	ANKRD50	-0.635	0,015
ENSG00000116017	ARID3A	0.924	0,013
ENSG00000156219	ART3	-0.612	0,004
ENSG00000169136	ATF5	0.664	0,008
ENSG00000101892	ATP1B4	0.665	0,012
ENSG00000107518	ATRNL1	1,420	0,034
ENSG00000177191	B3GNT8	1,150	0,018
ENSG00000118276	B4GALT6	-1,606	0,005
ENSG00000168062	BATF2	2,582	0,013
ENSG00000176697	BDNF	1,409	0,006
BST-2A	BST-2A	1,919	0,038
ENSG00000141428	C18orf21	0.776	0,002
ENSG00000159403	C1R	1,003	0,002
ENSG00000182326	C1S	0.900	0,007
ENSG00000166278	C2	2,066	0,003
ENSG00000125730	C3	1,460	0,000
ENSG00000197599	CCDC154	2,368	0,019
ENSG00000175699	CCDC197	1,060	0,046
ENSG00000250506	CDK3	0.728	0,039
ENSG00000154240	CEP112	0.684	0,008
ENSG00000111860	CEP85L	0.826	0,004
ENSG00000131778	CHD1L	1,332	0,003

ENSG00000133048	CHI3L1	0.752	0,044
ENSG00000187288	CIDEC	2,119	0,000
ENSG00000179583	CIITA	1,356	0,003
ENSG00000197467	COL13A1	1,004	0,031
ENSG00000006016	CRLF1	1,305	0,034
ENSG00000172543	CTSW	0.684	0,046
ENSG00000205279	CTXN3	-1,696	0,031
ENSG00000169245	CXCL10	2,490	0,001
ENSG00000182224	CYB5D1	-1,320	0,012
ENSG00000140465	CYP1A1	1,327	0,047
ENSG00000155016	CYP2U1	-0.724	0,040
ENSG00000145476	CYP4V2	1,356	0,002
ENSG00000146122	DAAM2	-0.610	0,001
ENSG00000062282	DGAT2	1,637	0,005
ENSG00000106976	DNM1	0.744	0,024
ENSG00000276023	DUSP14	-0.915	0,017
ENSG00000112679	DUSP22	0.632	0,007
ENSG00000119147	ECRG4	0.987	0,022
ENSG00000102034	ELF4	1,024	0,004
ENSG00000165521	EML5	-1,344	0,024
ENSG00000168913	ENHO	-1,143	0,039
ENSG00000132199	ENOSF1	0.807	0,029
ENSG00000187097	ENTPD5	-0.903	0,040
ENSG00000143819	EPHX1	0.673	0,008
ENSG00000139160	ETFBKMT	1,028	0,019
ENSG00000012232	EXTL3	-0.660	0,026
ENSG00000170323	FABP4	1,528	0,026
ENSG00000108950	FAM20A	-0.938	0,005
ENSG00000188859	FAM78B	-0.850	0,028
ENSG00000182118	FAM89A	-0.611	0,041
ENSG00000203747	FCGR3A	1,189	0,034
ENSG00000139132	FGD4	0.700	0,017
ENSG00000102678	FGF9	1,625	0,013
ENSG00000007933	FMO3	0.983	0,037
ENSG00000160097	FNDC5	-0.712	0,014
ENSG00000150907	FOXO1	-1,116	0,001
ENSG00000150893	FREM2	-0.891	0,035
ENSG00000070601	FRMPD1	1,031	0,019
ENSG00000082074	FYB1	1,052	0,020
ENSG00000143458	GABPB2	-0.963	0,025
ENSG00000154451	GBP5	1,544	0,036
ENSG00000163521	GLB1L	0.901	0,047
ENSG00000114450	GNB4	-0.689	0,015

ENSG00000104518	GSDMD	1,282	0,010
ENSG00000168298	H1-4	-2,946	0,014
ENSG00000180573	H2AC6	-1,297	0,002
ENSG00000101336	HCK	1,003	0,033
HIST1H1T	HIST1H1T	-1,930	0,035
ENSG00000204257	HLA-DMA	0.949	0,022
ENSG00000102878	HSF4	0.664	0,004
ENSG00000081870	HSPB11	0.635	0,020
ENSG00000178922	HYI	0.835	0,035
ENSG00000131203	IDO1	4,500	0,000
ENSG00000126709	IFI6	2,391	0,027
ENSG00000163913	IFT122	0.653	0,019
ENSG00000143061	IGSF3	-1,126	0,005
ENSG00000137496	IL18BP	0.732	0,013
ENSG00000125347	IRF1	1,003	0,043
ENSG00000168135	KCNJ4	1,198	0,031
ENSG00000188997	KCTD21	-0.637	0,035
ENSG00000183783	KCTD8	-1,631	0,027
ENSG00000134962	KLB	2,687	0,023
ENSG00000043462	LCP2	0.949	0,005
ENSG00000130164	LDLR	1,137	0,012
ENSG00000111052	LIN7A	4,292	0,003
ENSG00000189067	LITAF	0.840	0,012
ENSG00000087253	LPCAT2	-1,757	0,022
ENSG00000176454	LPCAT4	0.637	0,012
ENSG00000227507	LTB	1,641	0,012
ENSG00000143797	MBOAT2	-0.815	0,038
ENSG00000110492	MDK	1,176	0,002
ENSG00000139780	METTL21C	0.872	0,048
ENSG00000008394	MGST1	1,009	0,017
ENSG00000169184	MN1	-0.910	0,001
ENSG00000166343	MSS51	0.868	0,017
ENSG00000221986	MYBPHL	1,111	0,034
ENSG00000111046	MYF6	0.885	0,040
ENSG00000106436	MYL10	-4,218	0,029
ENSG00000123338	NCKAP1L	0.812	0,043
ENSG00000114670	NEK11	1,592	0,007
ENSG00000123572	NRK	-1,099	0,006
ENSG00000225950	NTF4	-1,332	0,031
ENSG00000140876	NUDT7	-0.719	0,050
ENSG00000132182	NUP210	0.647	0,022
Ovar-DRA	Ovar-DRA	0.781	0,015
ENSG00000135124	P2RX4	0.624	0,029

ENSG00000073150	PANX2	3,183	0,028
ENSG00000197121	PGAP1	-1,481	0,008
ENSG00000175287	PHYHD1	1,807	0,001
ENSG00000145675	PIK3R1	-1,232	0,000
ENSG00000114805	PLCH1	4,993	0,000
ENSG00000166819	PLIN1	1,991	0,000
ENSG00000100979	PLTP	0,699	0,049
ENSG00000221866	PLXNA4	-1,100	0,014
ENSG00000136040	PLXNC1	1,156	0,037
ENSG00000132170	PPARG	0,745	0,001
ENSG00000163644	PPM1K	-0,881	0,027
ENSG00000131771	PPP1R1B	1,183	0,015
ENSG00000135362	PRR5L	1,388	0,044
ENSG00000130962	PRRG1	-0,796	0,030
ENSG00000150687	PRSS23	-1,051	0,006
ENSG00000135069	PSAT1	-1,082	0,014
ENSG00000140368	PSTPIP1	0,839	0,009
ENSG00000107317	PTGDS	0,784	0,014
ENSG00000204179	PTPN20	-2,938	0,031
ENSG00000163661	PTX3	1,483	0,004
ENSG00000119943	PYROXD2	-0,971	0,033
ENSG00000113456	RAD1	-0,662	0,015
ENSG00000138670	RASGEF1B	0,815	0,006
ENSG00000122035	RASL11A	1,334	0,033
ENSG00000138207	RBP4	1,212	0,002
ENSG00000162444	RBP7	2,741	0,009
ENSG00000132563	REEP2	0,799	0,022
ENSG00000104856	RELB	0,716	0,007
ENSG00000054967	RELT	-0,945	0,044
ENSG00000168421	RHOH	3,296	0,042
ENSG00000116574	RHOU	1,238	0,011
ENSG00000174791	RIN1	2,966	0,031
ENSG00000143365	RORC	0,647	0,004
ENSG00000072133	RPS6KA6	-0,889	0,045
ENSG00000136193	SCRN1	-0,737	0,050
ENSG00000133488	SEC14L4	3,070	0,027
ENSG00000149131	SERPING1	1,092	0,000
ENSG00000120057	SFRP5	1,434	0,003
ENSG00000088827	SIGLEC1	2,685	0,033
ENSG00000137078	SIT1	1,746	0,008
ENSG00000108932	SLC16A6	-1,421	0,026
ENSG00000105281	SLC1A5	0,681	0,001
ENSG00000146477	SLC22A3	-1,218	0,006

ENSG00000112759	SLC29A1	0.637	0,005
ENSG00000059804	SLC2A3	-0.702	0,050
ENSG00000181830	SLC35C1	-1,132	0,015
ENSG00000134955	SLC37A2	1,346	0,031
ENSG00000134802	SLC43A3	0.953	0,021
ENSG00000130876	SLC7A10	0.724	0,003
ENSG00000188827	SLX4	-0.831	0,001
ENSG00000137834	SMAD6	1,229	0,008
ENSG00000186577	SMIM29	0.734	0,026
ENSG00000088826	SMOX	-0.736	0,030
ENSG00000172296	SPTLC3	-1,147	0,032
ENSG00000147465	STAR	-2,667	0,048
ENSG00000198648	STK39	0.793	0,040
ENSG00000135604	STX11	-0.792	0,023
ENSG00000097096	SYDE2	-0.722	0,036
ENSG00000115183	TANC1	-0.716	0,036
ENSG00000168394	TAP1	0.762	0,023
ENSG00000130193	THEM6	-1,275	0,024
ENSG00000156299	TIAM1	2,606	0,005
ENSG00000169989	TIGD4	1,844	0,035
ENSG00000095587	TLL2	1,220	0,020
ENSG00000101916	TLR8	1,007	0,031
ENSG00000167619	TMEM145	0.784	0,008
ENSG00000253304	TMEM200B	-0.965	0,050
ENSG00000163900	TMEM41A	-0.952	0,007
ENSG00000131747	TOP2A	-0.829	0,026
ENSG00000184811	TRARG1	1,879	0,011
ENSG00000142185	TRPM2	1,039	0,003
ENSG00000182179	UBA7	1,240	0,014
ENSG00000156587	UBE2L6	0.999	0,045
ENSG00000125753	VASP	0.644	0,025
ENSG00000162692	VCAM1	0.681	0,002
ENSG00000205221	VIT	0.769	0,040
ENSG00000140105	WARS1	0.699	0,034
ENSG00000173276	ZBTB21	0.844	0,031
ENSG00000187595	ZNF385C	-0.895	0,037
ENSG00000185730	ZNF696	0.865	0,002
ENSG00000102984	ZNF821	1,010	0,001
ENSG00000174276	ZNHIT2	-0.703	0,003

Tabela S3 – Lista com todos os genes fatores de transcrição encontrados em análise de CeTF em contraste MS20 versus CON de cordeiros machos não castrados

Ensembl Gene	Gene	log2 FoldChange	biotype
ENSG00000077522	ACTN2	0,191	mRNAs
ENSG00000100591	AHSA1	-0,142	mRNAs
ENSG00000159423	ALDH4A1	0,049	mRNAs
ENSG00000116748	AMPD1	0,007	mRNAs
ENSG00000101745	ANKRD12	0,209	mRNAs
ENSG00000182718	ANXA2	-0,121	mRNAs
ENSG00000117713	ARID1A	0,061	mRNAs
ENSG00000117713	ARID1A	0,061	TFs
ENSG00000018625	ATP1A2	0,058	mRNAs
ENSG00000165629	ATP5F1C	0,094	mRNAs
ENSG00000167863	ATP5PD	0,032	mRNAs
ENSG00000154723	ATP5PF	0,043	mRNAs
ENSG00000175334	BANF1	-0,014	mRNAs
ENSG00000113916	BCL6	-0,225	mRNAs
ENSG00000136717	BIN1	-0,036	mRNAs
ENSG00000171634	BPTF	-0,096	mRNAs
ENSG00000136261	BZW2	0,106	mRNAs
ENSG00000116667	C1orf21	0,146	mRNAs
ENSG00000082196	C1QTNF3	0,185	mRNAs
ENSG00000144712	CAND2	-0,071	mRNAs
ENSG00000110651	CD81	-0,151	mRNAs
ENSG00000172216	CEBPB	0,079	mRNAs
ENSG00000110172	CHORDC1	-0,031	mRNAs
ENSG00000163539	CLASP2	-0,150	mRNAs
ENSG00000164237	CMBL	0,119	mRNAs
ENSG00000088682	COQ9	-0,082	mRNAs
ENSG00000178741	COX5A	-0,011	mRNAs
ENSG00000161281	COX7A1	0,014	mRNAs
ENSG00000005339	CREBBP	-0,006	mRNAs
ENSG00000145358	DDIT4L	-0,752	mRNAs
ENSG00000140403	DNAJA4	0,586	mRNAs
ENSG00000175550	DRAP1	0,111	mRNAs
ENSG00000120129	DUSP1	-0,089	mRNAs
ENSG00000144895	EIF2A	0,076	mRNAs
ENSG00000130811	EIF3G	0,049	mRNAs
ENSG00000187840	EIF4EBP1	0,063	mRNAs
ENSG00000075151	EIF4G3	-0,073	mRNAs
ENSG00000113391	FAM172A	0,115	mRNAs

ENSG00000156804	FBXO32	0,257	mRNAs
ENSG00000266964	FXYD1	0,170	mRNAs
ENSG00000138796	HADH	-0,087	mRNAs
ENSG00000064393	HIPK2	-0,257	mRNAs
HIST2H2BE	HIST2H2BE	-0,280	mRNAs
ENSG00000175879	HOXD8	-0,130	mRNAs
ENSG00000072506	HSD17B10	0,053	mRNAs
ENSG00000166598	HSP90B1	-0,193	mRNAs
ENSG00000114166	KAT2B	0,184	mRNAs
ENSG00000110427	KIAA1549L	0,029	mRNAs
ENSG00000054523	KIF1B	0,408	mRNAs
ENSG00000124702	KLHDC3	0,024	mRNAs
ENSG00000135862	LAMC1	-0,022	mRNAs
ENSG00000175556	LONRF3	0,232	mRNAs
ENSG00000093167	LRRFIP2	0,110	mRNAs
ENSG00000093167	LRRFIP2	0,110	TFs
ENSG00000090006	LTBP4	-0,027	mRNAs
ENSG00000179632	MAF1	0,120	mRNAs
ENSG00000006062	MAP3K14	-0,182	mRNAs
ENSG00000172366	MCRIP2	-0,157	mRNAs
ENSG00000123562	MORF4L2	0,053	mRNAs
MRCL3	MRCL3	0,440	mRNAs
ENSG00000116898	MRPS15	0,070	mRNAs
ENSG00000243927	MRPS6	0,440	mRNAs
ENSG00000166343	MSS51	0,868	mRNAs
ENSG00000142661	MYOM3	-0,037	mRNAs
ENSG00000120729	MYOT	0,274	mRNAs
ENSG00000164591	MYOZ3	-0,362	mRNAs
ENSG00000184752	NDUFA12	-0,023	mRNAs
ENSG00000267855	NDUFA7	-0,066	mRNAs
ENSG00000165264	NDUFB6	-0,162	mRNAs
ENSG00000147684	NDUFB9	0,040	mRNAs
ENSG00000158864	NDUFS2	-0,108	mRNAs
ENSG00000164258	NDUFS4	-0,011	mRNAs
ENSG00000178127	NDUFV2	-0,068	mRNAs
ENSG00000117691	NENF	0,032	mRNAs
ENSG00000104904	OAZ1	-0,092	mRNAs
ENSG00000132823	OSER1	0,077	mRNAs
ENSG00000165912	PACSIN3	0,000	mRNAs
ENSG00000090060	PAPOLA	0,039	mRNAs
ENSG00000188677	PARVB	0,240	mRNAs
ENSG00000090097	PCBP4	-0,076	mRNAs
ENSG00000178104	PDE4DIP	-0,095	mRNAs

ENSG00000196923	PDLIM7	-0,031	mRNAs
ENSG00000121892	PDS5A	-0,092	mRNAs
ENSG00000158571	PFKFB1	0,042	mRNAs
ENSG00000198523	PLN	0,298	mRNAs
ENSG00000099817	POLR2E	0,017	mRNAs
ENSG00000213639	PPP1CB	-0,052	mRNAs
ENSG00000087074	PPP1R15A	0,142	mRNAs
ENSG00000167815	PRDX2	0,217	mRNAs
ENSG00000008018	PSMB1	0,155	mRNAs
ENSG00000100764	PSMC1	0,311	mRNAs
ENSG00000092010	PSME1	0,160	mRNAs
ENSG00000112655	PTK7	0,038	mRNAs
ENSG00000105404	RABAC1	0,054	mRNAs
ENSG00000174373	RALGAPA1	-0,157	mRNAs
ENSG00000182872	RBM10	0,191	mRNAs
ENSG00000188026	RILPL1	-0,120	mRNAs
ENSG00000123091	RNF11	-0,085	mRNAs
ENSG00000265491	RNF115	0,776	mRNAs
ENSG00000134318	ROCK2	0,115	mRNAs
ENSG00000265681	RPL17	-0,076	mRNAs
ENSG00000100316	RPL3	0,192	mRNAs
ENSG00000171490	RSL1D1	0,163	mRNAs
ENSG00000125744	RTN2	0,187	mRNAs
ENSG00000178980	SELENOW	-0,031	mRNAs
ENSG00000108823	SGCA	0,181	mRNAs
ENSG00000198892	SHISA4	-0,008	mRNAs
ENSG00000174032	SLC25A30	0,181	mRNAs
ENSG00000157106	SMG1	0,172	mRNAs
ENSG00000095637	SORBS1	0,772	mRNAs
ENSG00000162032	SPSB3	-0,006	mRNAs
ENSG00000163541	SUCLG1	0,066	mRNAs
ENSG00000054654	SYNE2	0,113	mRNAs
ENSG00000108639	SYNGR2	0,262	mRNAs
ENSG00000182253	SYNM	-0,170	mRNAs
ENSG00000126351	THRA	0,006	mRNAs
ENSG00000126351	THRA	0,006	TFs
ENSG00000171914	TLN2	0,011	mRNAs
ENSG00000130598	TNNI2	0,075	mRNAs
ENSG00000140416	TPM1	0,104	mRNAs
ENSG00000158109	TPRG1L	0,058	mRNAs
ENSG00000038382	TRIO	0,061	mRNAs
ENSG00000130985	UBA1	0,011	mRNAs
ENSG00000150991	UBC	0,306	mRNAs

ENSG000000151116	UEVLD	-0,058	mRNAs
ENSG000000070010	UFD1	0,109	mRNAs
ENSG000000010256	UQCRC1	0,040	mRNAs
ENSG000000103194	USP10	-0,049	mRNAs

Tabela S4 – Lista com os Top 100 genes mais estáveis e variáveis em cada dieta de acordo valores de gini

Constitutivos “Housekeeping”				Variáveis			
MS20		CON		MS20		CON	
GENE	gini	GENE	gini	GENE	gini	GENE	gini
AUTS2	0,004	ANO8	0,004	TNFRSF12A	0,528	SESN2	0,519
NUDT3	0,007	MRPS16	0,006	KLHL40	0,529	ATRNL1	0,519
GRAMD1B	0,007	BTBD2	0,006	TMIE	0,529	CALR3	0,519
NECAP2	0,007	ACSS2	0,007	MINAR2	0,530	CRTAM	0,519
FNBP1L	0,010	TTK	0,007	IRF7	0,531	HTR2B	0,519
MYOM1	0,011	NFKBIL1	0,007	SLC3A1	0,531	LY6G5B	0,519
SARNP	0,011	BCKDK	0,007	CIART	0,531	SMCO4	0,519
POMGNT2	0,012	CYB5A	0,007	IQCA1	0,532	CCL16	0,520
PRKCZ	0,012	GDE1	0,007	IKZF2	0,532	UTS2R	0,521
GFOD1	0,012	NDUFS3	0,008	ALDH8A1	0,532	TMEM156	0,522
RPL31	0,012	UQCRC1	0,008	NDST3	0,532	MATN3	0,522
IMPDH2	0,012	PLEKHB2	0,008	INHBA	0,532	IGSF21	0,523
ARL6IP5	0,013	EIF3G	0,008	MT1C	0,532	LRRC25	0,524
MACIR	0,013	CAP2	0,008	HIST3H2BB	0,533	CENPH	0,524
CFAP99	0,013	UQCRC1	0,008	SPC24	0,533	SCN3A	0,524
KARS1	0,014	CHCHD5	0,008	SYT17	0,534	ECT2L	0,524
CAMK2D	0,015	GNL2	0,008	CCR4	0,534	DUOX1	0,525
ASAP1	0,015	ARHGEF10L	0,008	ATF3	0,536	SPINK5	0,525
ADI1	0,015	UCKL1	0,009	ADGRB2	0,540	DENND2D	0,526
RPS24	0,015	GLRX3	0,009	NFE2	0,540	HOXA2	0,527
PAK3	0,015	TSPAN18	0,009	VSNL1	0,540	MZB1	0,527

GHR	0,015	MPC2	0,009	CREG2	0,542	PPP1R3E	0,527
APOOL	0,016	RRM2B	0,009	HIST1H1T	0,546	LRATD1	0,529
YME1L1	0,016	NUAK1	0,009	MTCP1	0,546	CRIP3	0,529
BRPF3	0,016	RPL32	0,009	FAIM2	0,546	SNCG	0,529
CD151	0,016	NIF3L1	0,009	TSSK6	0,546	MMP9	0,531
KALRN	0,016	NDUFV2	0,010	DUOX1	0,547	CACNA1B	0,536
JMJD1C	0,016	RPS6KC1	0,010	CSPG5	0,549	ERCC6L	0,537
RANBP9	0,016	PANK2	0,010	SATB2	0,549	VSIG10L	0,541
KMT2C	0,017	PSME1	0,010	XAF1	0,554	ENPP6	0,541
TUSC3	0,017	LATS2	0,010	C9orf43	0,554	SLITRK6	0,546
BCL2L12	0,017	NAP1L4	0,010	PLA2G4E	0,554	NLRC4	0,549
RBM17	0,017	VTA1	0,010	ARID5A	0,555	FBXO36	0,550
EIF2B2	0,017	EHHADH	0,011	GRM4	0,556	PCK1	0,550
ADCY2	0,017	RIOK3	0,011	DNAJA4	0,557	TPRG1	0,550
RPS16	0,017	MRPL52	0,011	CCL19	0,558	GABRA1	0,552
RACK1	0,017	ERI3	0,011	NXPE4	0,560	EFR3B	0,555
IPO5	0,017	STOML2	0,011	KCNG2	0,563	H2AW	0,557
PKD2L2	0,017	AGL	0,011	SMPDL3B	0,564	IL17B	0,559
MED12	0,017	KDM4B	0,012	CCNA1	0,566	HSF5	0,560
MAPKAPK3	0,017	MAZ	0,012	FGF	0,567	LAG3	0,561
CUX1	0,018	HADH	0,012	EDIL3	0,568	LEKR1	0,562
CLTB	0,018	PTCH2	0,012	IL1RL1	0,571	DBNDD1	0,570
H2AC6	0,018	QARS1	0,012	SNTG1	0,571	CDH8	0,572
NUDT21	0,018	FAH	0,012	RTP4	0,574	E2F8	0,572
GAMT	0,018	MCRIP2	0,012	MND1	0,577	PRLR	0,572
RPL36	0,019	DRAP1	0,012	MX2	0,577	TNFSF8	0,572
RPL27A	0,019	RAB1B	0,012	H1-4	0,580	FLACC1	0,573
AIDA	0,019	B4GALT7	0,012	EOMES	0,583	H1-5	0,574

ENO1	0,019	EIF3M	0,012	OTUD1	0,585	LPAR4	0,575
RPL24	0,019	TRDN	0,012	ATP6V0A4	0,591	C1orf105	0,577
EIF4A3	0,019	GSPT1	0,012	MT2	0,592	HNF4A	0,577
VTI1B	0,019	ZMAT2	0,013	BRINP1	0,599	DNAH5	0,585
TESK1	0,019	SNRNP25	0,013	MT1A	0,603	NECAB2	0,585
PNPO	0,020	L2HGDH	0,013	PDZK1	0,606	DRC1	0,587
DOCK2	0,020	COQ9	0,013	CDK15	0,610	CPVL	0,590
VPS13B	0,020	CTBP1	0,013	DNAJC6	0,610	RBP7	0,590
ASB14	0,020	VBP1	0,013	GIPC2	0,611	RAMP3	0,590
RPL28	0,020	LMAN2	0,013	EMX2	0,614	NEK2	0,592
NBEA	0,020	SUGP1	0,013	FANCD2	0,614	COL9A3	0,594
REX1BD	0,020	TRAPPC6B	0,014	PLPPR3	0,617	LIPH	0,596
KIRREL1	0,021	DBI	0,014	PVALB	0,619	PAK6	0,596
TRDN	0,021	ATP5PF	0,014	IL7	0,622	CCDC158	0,598
MFSD2B	0,021	PPP1CB	0,014	RSAD2	0,623	CREB3L4	0,600
SKP1	0,021	COPS3	0,014	CNTN3	0,625	PDZRN4	0,600
JAM3	0,021	NDRG1	0,014	PRR29	0,625	NR4A3	0,613
MRPL58	0,021	MLX	0,014	IFI6	0,641	HTR7	0,616
RTRAF	0,021	NEDD1	0,014	ABCC2	0,641	KCNK7	0,616
SLC25A37	0,021	CPSF1	0,014	ISG15	0,642	PCDH19	0,616
MECP2	0,021	CCDC92	0,014	LRRC25	0,648	ODF3L2	0,630
BRD2	0,021	TOMM22	0,014	TOGARAM2	0,648	POU2F2	0,630
GRIPAP1	0,021	YWHAE	0,014	SH2D3A	0,650	ZSWIM5	0,630
RRAGB	0,021	COX5A	0,014	CAMKK1	0,650	GAS2	0,634
RPL37	0,022	ACTN3	0,014	OAS2	0,650	SLC34A3	0,634
TSR2	0,022	EIF3F	0,014	MCTP2	0,652	CRB2	0,639
HESX1	0,022	SNX8	0,014	FOSL1	0,655	NEU4	0,639
C18H15orf40	0,022	NDUFS2	0,014	LRRC23	0,659	GCA	0,641

RPL11	0,022	SETD3	0,014	CHRNA3	0,659	ST6GALNAC5	0,645
TCTP	0,022	AGAP3	0,014	ANKRD1	0,660	IRF4	0,651
CCDC9	0,022	MGST3	0,014	CHAC1	0,662	VIPR1	0,655
MBD3	0,022	MRPS15	0,014	SIGLEC1	0,669	IL18RAP	0,660
COPS6	0,022	PIP4K2A	0,014	SLC7A4	0,671	FLRT1	0,666
PSMD6	0,022	CAVIN1	0,015	TKTL1	0,674	ARHGAP36	0,666
DBNDD2	0,022	ADCK5	0,015	RUNX1	0,682	KCNF1	0,675
SELENOF	0,022	MICOS10	0,015	SDCBP2	0,687	NRXN2	0,680
DST	0,023	MAPKAPK2	0,015	IDO1	0,691	COL22A1	0,690
RPL18	0,023	RNF11	0,015	TIAM2	0,696	KYNU	0,704
RNF220	0,023	SNAPC3	0,015	PKHD1	0,698	PNLDC1	0,704
ITPR1	0,023	EHD3	0,015	SDR16C5	0,708	ALDOB	0,750
CAV1	0,023	ANK2	0,015	TROAP	0,713	ATP12A	0,750
CSDE1	0,023	NDUFA7	0,015	ECT2L	0,719	EPHB6	0,750
TAGLN2	0,023	SMYD3	0,015	HSPA6	0,737	GPR173	0,750
ARF6	0,023	DIS3L	0,015	AGER	0,750	GPR20	0,750
MRPL50	0,024	UQCRC2	0,015	FGF16	0,750	LIN7A	0,750
DDX54	0,024	PDSS2	0,015	HPD	0,750	LRRC31	0,750
COPS7B	0,024	ATP5F1B	0,015	KLF14	0,750	MESP2	0,750
SNRPD3	0,024	NTHL1	0,015	LHB	0,750	PANX2	0,750
IFRD2	0,024	PPIL4	0,015	PTPN20	0,750	SEC14L4	0,750
GABRB1	0,024	NDUFA8	0,015	STAR	0,750	TMSB15B	0,750
CIAO2B	0,024	FAM3C	0,015	TNFRSF9	0,750	VANGL2	0,750

CAPÍTULO 3 – Efeito do melaço de soja na qualidade da carne e perfil do transcriptoma muscular de cordeiros castrados em sistema de confinamento

RESUMO – O objetivo com este estudo foi avaliar o efeito da inclusão do melaço de soja (MSO) na dieta de cordeiros castrados em confinamento sobre o desempenho, acabamento de carcaça, composição química da carne, parâmetros bioquímicos no sangue, celularidade de adipócitos e expressão de mRNA no músculo. Cordeiros castrados, (10 animais/tratamento) blocados por peso corporal foram distribuídos em duas dietas experimentais, contendo 84% de concentrado (CON - 0 g/kg de MSO e MS20 - 200 g/kg de MSO na MS). O experimento teve duração de 76 dias e os animais foram castrados cirurgicamente antes do período de adaptação. O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados e medidas repetidas no tempo quando necessário, e analisados por meio do SAS studio. A dieta MS20 aumentou a concentração de ureia no sangue (27,47mg/dL – CON e 31,09 mg/dL), e reduziu a concentração de glicose (91,92 mg/dL – CON e 87,28 mg/dL – MS20). Cordeiros alimentados com MSO demonstraram maior deposição de gordura subcutânea e tamanho dos adipócitos subcutâneos, além de reduzir o TBARS da carne. O sequenciamento de RNA identificou 294 genes diferencialmente expressos e 172 fatores de transcrição. A expressão gênica foi influenciada pela inclusão do MSO ao evidenciar redução na expressão dos genes *ACOX2* e *LPL* envolvidos diretamente na oxidação lipídica no músculo, além de aumentar a expressão do gene *HK2*, envolvido no metabolismo da frutose. Portanto, a inclusão do MSO na dieta de cordeiros castrados aumenta a deposição de gordura na carcaça e reduz a oxidação lipídica da carne.

Palavras-chaves: carboidratos solúveis, gordura, subproduto

Introdução

A terminação de cordeiros em sistema de confinamento, com uso de dietas ricas em concentrado, são utilizadas com objetivo de agregar valor à carcaça de cordeiros com baixa conformação e promover desenvolvimento muscular e deposição de gordura para fornecimento de produtos cárneos de melhor qualidade (Van der Merwe et al., 2020). A alta digestibilidade do amido permite o bom aproveitamento energético da dieta além de grande quantidade de glicose via propionato que leva à síntese de gordura intramuscular (Gilbert et al., 2003; Moharrery et al., 2014). Muito embora, altas inclusões de milho pode levar a problemas metabólicos como acidose ruminal, devido à queda no pH ruminal que culmina em respostas inflamatórias do epitélio ruminal e baixo aproveitamento da fibra (Ghoso et al., 2006; Nagaraja e Lechtenberg, 2007).

O melaço de soja (MSO) pode vir a ser uma alternativa ao proporcionar maior estabilidade no pH ruminal e ainda agregar qualidade à carne de cordeiros, aumentando a maciez e gordura intramuscular (Pereira Junior, 2019; Rodrigues et al., 2020). Com alta concentração de carboidratos solúveis, o efeito do MSO pode estar atrelado ao aumento na taxa de passagem do rúmen, melhor sincronia de energia e proteína e maior aporte de monossacarídeos, como a frutose, no músculo, permitindo maior síntese de novo de ácidos graxos (Pereira Junior, 2019).

Outras evidências dos efeitos do MSO são reportadas, a exemplo de vacas leiteiras que tiveram maior produção de gordura no leite no início da lactação ao serem alimentadas com 15% de mistura de casca de soja ou farelo de trigo adsorvido com MSO em proporções de 10:3 na ração (Chen et al., 2021), enquanto Bittencourt, (2012) relata o aumento de 6,2 para 6,7 no pH ruminal de vacas em lactação, alimentadas com até 9% de MSO.

Portanto, o objetivo com o presente estudo é investigar o mecanismo de ação do MSO no metabolismo muscular de cordeiros em terminação, para isso o uso de animais castrados, cuja maturação é mais precoce, foi adotado a fim de avaliação do desempenho, avaliação da carcaça e carne bem como perfil transcriptômico do músculo *Longissimus thoracis*.

Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram seguidos pelos Princípios Éticos para Experimentação Animal regulamentada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal (nº 002583/2020).

- Animais, dietas e delineamento experimental

O experimento foi realizado nas dependências da Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos e as análises foram feitas no Laboratório de Carne da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21° 14' 05" S latitude, 48° 17' 09" W longitude e 615 m de altitude). Vinte cordeiros machos previamente castrados cirurgicamente (Santa Inês × Dorper; 21,13 ± 0,92 kg de peso corporal inicial; 98 dias de idade) foram alocados em blocos por peso e distribuídos aleatoriamente em duas dietas experimentais (CON – sem adição de melaço de soja e M20 – com 200 g/kg de melaço de soja na MS).

Em todo o período experimental os animais foram mantidos em baias individuais (1.2 m²) com piso ripado suspenso, comedouros individuais e bebedouros coletivos, dentro de um galpão coberto. Tratamento sanitário prévio foi realizado em todos os cordeiros, vermifugação e suplementação com vitaminas A, D, E e K (Closantel 0.8% w/v e Vit ADEK Calbos, Curitiba, PR - Brazil), além de vacinação preventiva contra clostridiose (Bovilis Poli-Star T, Kenilworth, NJ - EUA). Por já serem habituados a se alimentarem em cocho, os cordeiros foram adaptados às dietas experimentais com apenas dois degraus, adaptação 1 com 480 g/kg de concentrado e adaptação 2 com 660 g/kg de concentrado, sendo 6 dias cada. No d-13 iniciou o fornecimento das dietas experimentais de terminação com relação volumoso concentrado de 16:84. O objetivo era que os animais alcançassem média de 35 kg de PC e então encerrar o período experimental, para isso pesagens quinzenais sem jejum eram realizadas com finalidade de acompanhamento do peso corporal e

estabelecer o dia do abate. Portanto, o período experimental foi de 76 dias incluindo 12 dias de adaptação e 64 dias de dieta de terminação.

As dietas foram formuladas para serem semelhantes no teor de proteína e energia de acordo com as recomendações do NRC (2007) para a categoria. Os ingredientes utilizados foram silagem de milho, milho grão moído, farelo de trigo, polpa cítrica, farelo de soja, ureia, sal mineral, bicarbonato de sódio e melaço de soja. O MSO tinha a seguinte composição: matéria seca: 54,8%, matéria mineral: 107,5 g/kg, extrato etéreo: 13,7 g/kg, proteína bruta: 63,0 g/kg, FDN: 0,0 g/kg e carboidrato não fibrosos: 815,8 g/kg.

Tabela 1 – Composição centesimal e bromatológica da dieta experimental.

Item	Dietas	
	CON	M20
<i>Composição centesimal, g/kg</i>		
Silagem de milho	160,0	160,0
Milho	640,0	440,0
Farelo de trigo	57,0	44,0
Polpa cítrica	55,0	42,0
Melaço de soja	-	200,0
Farelo de soja	53,0	76,0
Ureia	8,0	11,0
Sal mineral	17,0	17,0
Bicarbonato de sódio	10,0	10,0
<i>Composição bromatológica, g/kg</i>		
Matéria seca	662,4	664,5
Matéria mineral	42,8	55,4
Proteína bruta	140,2	132,8
Extrato etéreo	36,7	53,8
FDNcp	222,1	159,6
Carboidratos não fibrosos	573,3	618,9
Amido	522,6	376,0

Carboidrato solúvel	35,1	230,8
Pectina	15,6	12,1
Energia metabolizável, Mcal/kg	3,28	3,33

Carboidratos não fibrosos: Estimados por equação de Hall (2000);
 Amido e Pectina: Estimado por média obtidas no CQBAL 4.0;
 Carboidrato solúvel = Carboidratos não fibrosos – amido – pectina.

- *Consumo alimentar e desempenho animal*

A dieta fornecida aos animais era pesada diariamente de forma separada, silagem de milho, melaço de soja e concentrado, e então misturados manualmente até sua homogeneidade para evitar seleção. Metade da refeição foi fornecida pela manhã (08:00 h) e a outra metade ao final da tarde (16:00 h). Os ajustes do fornecido eram realizados diariamente por meio de escore de cocho no primeiro horário da manhã, permitindo sobras de 3 a 5% no cocho, ao qual eram pesadas para obtenção do consumo alimentar individual dos cordeiros (CMS).

O desempenho animal individual (GMD) foi realizado por meio da razão de peso corporal obtida em jejum de sólidos por 16h, no início e fim do período experimental e dias de confinamento com a dieta de terminação (64 d), enquanto a eficiência alimentar (EA) foi calculada pela razão do desempenho e consumo alimentar.

$$GMD = PCf - PCi) / \text{dias de confinamento}$$

[1]

Ao qual PCf = peso corporal final (kg); PCi = peso corporal inicial (kg)

- *Análises de composição químico-bromatológicas*

A cada quinze dias era realizada amostragem das dietas ofertadas aos animais, que juntamente com amostras representativas dos ingredientes eram submetidos à análise bromatológica em laboratório, sendo a silagem de milho e amostras dos fornecidos submetidos a secagem em estufa de ventilação forçada 55°C por 72h (método G-001/2) seguido por moagem em moinho tipo Wiley, com peneiras de crivos 1 mm e então levados a estufa de 105°C por 16h, juntamente com o restante dos ingredientes, para obtenção da matéria seca (MS, método G-003/1). A determinação

da matéria mineral foi através da combustão total em forno mufla a 600°C por 4h (MM, método M-001/2).

O nitrogênio total foi avaliado mediante uso de aparato micro-Kjeldahl (método N-001/2) e os teores de proteína bruta (PB) obtidos pela multiplicação do N total por 6.25. Os teores de extrato etéreo foram obtidos por meio da extração em éter de petróleo em aparato Soxhlet num período de 4h (EE, método G-004/1). Vale destacar, que a análise de EE do melaço de soja precisou ser ajustada, pois o mesmo quando analisado de forma isolada e *in natura* superestimava os valores devido à sua elevada concentração de carboidratos solúveis, sendo assim foi realizado uma mistura na proporção de 2:1 de feno com MSO. Após bem homogeneizada a mistura, três amostras condicionadas em papel filtro qualitativo, foram submersos em água destilada por 12 s e seguidos de secagem em estufa a 105°C por uma hora, e então submetidos a extração em aparato Soxhlet (AOAC – método 920.39-C). Uma vez conhecido a concentração de EE do feno utilizado como adsorvente, era descontado deste, o valor obtido na mistura feno:MSO.

Os conteúdos de fibra em detergente neutro e detergente ácido foram obtidos utilizando cadinhos filtrantes (FDN, método F-013/1 e FDA, método F-015/1, respectivamente), utilizando enzima α -amilase termoestável com atividade enzimática de 300 KNU/g, sem sulfito de sódio. Enquanto o nitrogênio insolúvel em detergente neutro foi segundo INCT-CA (NIDN, método N-004/2) e o nitrogênio insolúvel em detergente ácido por INCT-CA (NIDA, método N-005/2), bem como cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN, método M-002/2) para correções de cinzas e proteína da fibra de acordo com os procedimentos padrões analíticos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal (Detmann et al., 2021). Conteúdo de carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela equação de Hall (2000).

$$CNF = 1000 - ((PB - PB_{ureia} + ureia) + FDN_{cp} + EE + MM)$$

[2]

Em que, PB = proteína bruta; PB_{ureia} = proteína bruta presente na ureia; FDN_{cp} = fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; EE = extrato etéreo; MM = matéria mineral.

Análise de lignina foi realizada pelo método de hidrólise ácida (método F-005/2) para compor os cálculos de estimativa da energia metabolizável, o qual foram estimados mediante equação descrita por NRC (2001), com a composição dos fornecidos obtidos em laboratório. Os valores de amido e pectina foram estimados utilizando as médias obtidas no CQBAL 4.0, enquanto os carboidratos solúveis foram obtidos mediante subtração do CNF com os valores de amido e pectina.

- Parâmetros sanguíneos

A coleta de sangue foi realizada no início (d-6) e fim (d-75) do período experimental. Sendo a primeira desta com o objetivo de se obter o status bioquímico dos animais na condição pré-experimental, por isso foi realizada nos primeiros dias de confinamento, ainda com a dieta de adaptação. Em ambas as coletas, amostras de sangue de todos os cordeiros foram colhidas em tubos vacutainer com ativador de coágulo (Vacuplast®), no período da manhã, antes da primeira alimentação do dia, mediante venipunção jugular para avaliação do metabolismo proteico através das variáveis proteína total e ureia, bem como o metabolismo energético através das variáveis colesterol total, triglicerídeos totais e glicose.

As amostras foram imediatamente processadas em centrífuga refrigerada a 4°C em rotação de 2000 rpm por 15 min. O soro obtido após centrifugação foi armazenado a -20°C até o momento das análises, as quais foram feitas por meio de kits comerciais: proteína total (K-031), ureia (K-056), colesterol total (K-083), triglicerídeos totais (K-117), glicose (K-082) da Quibasa-Bioclin, Belo Horizonte, MG – Brasil. Enquanto, as leituras foram realizadas em analisador automático de bioquímica SBA-200 (CELM®, Barueri, SP - Brasil).

- Abate, características de carcaça e amostragem de carne

No último dia experimental os cordeiros foram submetidos a jejum de sólidos de 16h e pesados para obtenção do peso corporal final (PCf), e então transportados para abatedouro comercial. Os animais foram dessensibilizados por eletronarcose de dois pontos, seguido por secção da veia jugular e artéria carótida. Após evisceração, o fígado foi separado e pesado assim como as carcaças para obtenção do peso de

carcaça quente (PCQ), e então levadas para refrigeração por 24h a aproximadamente 4°C. Após o período de refrigeração as carcaças novamente foram pesadas para obtenção do peso de carcaça fria (PCF). O rendimento da carcaça (RC) foi calculado como:

$$RC = \left(\frac{PCQ}{PCF} \right) * 100$$

[3]

No lado esquerdo da carcaça foi feita uma secção para exposição do músculo *Longissimus thoracis*, na altura da 12ª costela, para mensuração da espessura de gordura subcutânea (EGS) com auxílio de paquímetro digital e obtenção da área de olho de lombo (AOL) usando equação de Silva Sobrinho (1999):

$$AOL = \left(\frac{A}{2} * \frac{B}{2} \right) * \pi$$

[4]

Ao qual A é o comprimento máximo do músculo e B é comprimento mínimo do músculo.

Ambos os lados da carcaça o músculo *Longissimus thoracis* foi removido entre as alturas da 6ª e 13ª costela e porcionado em 4 bifos, ao qual o lado direito foi destinado para análises químicas e o lado esquerdo para as análises físicas. As análises que não foram realizadas imediatamente ao abate, tiveram seus bifos embalados a vácuo (Selovac 200S, São Paulo - Brasil) com 99% de vácuo em sacos de poliamida/polietileno com 120 µm e 1 cm³/m²/24h de permeabilidade de O₂, 3 cm³/m²/ 24h de permeabilidade de CO₂ mensurado a 5°C e 75% de umidade relativa. A taxa de transmissão de vapor de água foi de 3g/m²/24h a 38°C e 100% de umidade relativa. O valor vácuo 20 (50 Pa) foi usado para embalar as amostras, o qual eram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

- *Análises físicas na carne*

O pH final da carne foi mensurado após a refrigeração de 24h da carcaça diretamente no músculo *Longissimus thoracis*, do lado esquerdo, na altura da 12ª costela utilizando um potenciômetro de H₂ digital (Text 205 Sparta, NJ - EUA). Capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada mediante a pesagem de 2g de carne submetida a pressão de 10kg por 5 min, ao qual pela diferença de peso inicial e final foi utilizada para expressar o CRA em %, conforme descreve Ham (1986). Enquanto a perda por cocção (PPC) foi obtida mediante a cocção de um bife do *Longissimus thoracis* de cada animal, em grill elétrico (Geroge Foreman, Beachwood, OH - EUA), pré-aquecido a 196°C. Os bifes foram cozidos até atingirem temperatura interna de 75°C, monitorada por termômetro do tipo espeto (Incotemp, Porto Alegre, RS - Brasil).

Após a cocção, os bifes foram refrigerados em temperatura de 4°C ao qual permaneceram durante a noite, na manhã do dia seguinte, os bifes foram novamente pesados e pela diferença de peso inicial e final foi obtido o PPC em %. Deste mesmo bife, foram retirados seis núcleos cilíndricos de 1,27 cm de diâmetro em sentido paralelo ao eixo da fibra muscular (AMSA, 1995), para determinação da força de cisalhamento (Wheeler et al., 2002) pelo equipamento texturômetro (CT3 25K Brokfield Middleboro, MA - EUA). Cada cilindro foi cortado ao meio no sentido perpendicular ao eixo da fibra muscular com auxílio da lâmina Warner Bratzler, e os valores obtidos em kgf foram convertidos para newton (N).

- Análises químicas na carne

Para as análises químicas da carne, as amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram primeiramente descongeladas a 2°C por 24h e moídas no processador de alimentos (AOAC, método 983.18), congeladas novamente para serem liofilizadas por 72 h para obtenção de amostras homogêneas e livres de umidade. Para a determinação da composição química da carne as análises foram realizadas segundo AOAC (1995), cinzas (método 920.153) e proteína bruta (928.08). Enquanto o conteúdo de gordura intramuscular foi mensurado como lipídeo total mediante extração a frio por Bligh e Dyer (1959).

A análise de oxidação lipídica TBARS foi mediante a mensuração do malonaldeído (MDA), com auxílio do ácido tiobarbitúrico como descreve Souza et al.

(2011) e Vyncke (1970). Em 10 mL de solução TCA (7,5% TCA, 0,1% EDTA) foi adicionado 5 g de carne de cordeiro e homogeneizado em Ultra Turrax para então ser centrifugado (15 min, 4000 rpm e 4°C). O sobrenadante foi filtrado e misturado em solução TBA (1% ácido tiobarbitúrico, 15% TCA e 562,5 µM HCl) em proporções de 1:1 v/v. A mistura foi aquecida em banho maria (100° C) durante 15 min, resfriada em banho de gelo (5 min) e absorvância lida em 540 nm. As concentrações de MDA foram calculadas utilizando curva padrão de 1,3,3-tetrametoxipropano (0 – 40 µM) e os resultados expressos em mg MDA/kg de carne de cordeiro.

- Vida de prateleira – “Shelf life”

A avaliação da coloração da carne ao longo do tempo iniciou-se no dia seguinte ao abate, em laboratório, para isso foi destinado um bife para avaliação da vida de prateleira, simulando condição real da gôndola de supermercados brasileiros. As amostras do *Longissimus thoracis* foram embaladas em bandejas de polietileno e embrulhadas em papel filme retrátil (permeável ao oxigênio), sem contato com a amostra e então acondicionadas ao expositor display refrigerado (Klima Expositor Practice, 05B0500.1, Venâncio Aires RS - Brasil) a 4°C ± 1 e luzes fluorescentes (1200 lx, 12h).

A coloração da carne foi avaliada nos dias 0, 1, 7, 10 e 14 dias de exposição, ao qual três mensurações em locais distintos do bife eram feitas para obtenção da média, com auxílio de colorímetro (CR-300 Minolta Chroma Meter Osaka - Japão), conforme descreve Houben et al. (2000). Antes das leituras, foi feita uma calibração em temperatura ambiente do local de trabalho (24° C) utilizando um padrão branco puro (100% reflexão) e uma caixa preta (zero reflexão). Os parâmetros avaliados foram: luminosidade L*, intensidade de vermelho a*, intensidade de amarelo b*, que foram avaliados de acordo com o sistema de cores CIE L*, a* e b* (CIE, 2004). Adicionalmente, ângulo Hue e índice de saturação chroma foram calculados de acordo com o AMSA (2012):

$$Hue = \arctang \frac{b}{a}$$

$$Chroma = (a^2 + b^2) \div \frac{1}{2}$$

[5]

- *Celularidade de adipócitos*

Ainda na carcaça quente, foi coletado aproximadamente 2 g de amostra do *Longissimus thoracis* e da gordura subcutânea, na altura da 12^a costela, para determinação do tamanho e número dos adipócitos, como proposto por Etherton et al. (1977), modificada por Prior (1983). As amostras foram laminadas ainda congeladas, a 1 mm de espessura e transferidas para vials de cintilação e então fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri - USA). As amostras fixadas foram filtradas através de telas com porosidade de 250 µm e 10 µm com auxílio de tampão Triton x-100 a 0,01% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri - USA). Os tecidos retidos em telas de 250 µm eram descartados, enquanto os retidos em tela de 10 µm foram coletados e suspensos em solução de 10 mL com 55,5% de glicerol. O tamanho dos adipócitos foi determinado por meio do programa analisador de imagens (Image-Pro v 4.5, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD), enquanto o número de adipócitos foi determinado pela equação:

$$\text{Número de células g}^{-1} = \text{número de células contadas} / ((\text{área da grade} \times \text{número de grades}) / \text{área da lâmina}) \times \text{diluição} / \text{g tecido fixado}$$

[6]

- *Extração de RNA, análise qualitativa, biblioteca e sequenciamento*

Para sequenciamento de RNA, foram selecionadas aleatoriamente quatro amostras de tecido muscular para cada dieta experimental. O RNA total foi extraído do tecido muscular esquelético, coletado ainda fresco (~500 mg), por meio de kit comercial de extração de RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Com auxílio de espectrofotômetro Nanodrop (Mustiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e Bioanalyzer RNA, foram avaliados, respectivamente, a quantificação, pureza e integridade das

amostras. Todas as amostras apresentaram um número de integridade de RNA (RIN) maior ou igual a 7,5 (Tabela S1). Para cada amostra foram utilizados 2 µg de RNA, para preparação da biblioteca de acordo com o protocolo descrito no guia TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). A estimativa do tamanho médio da biblioteca foi realizada com o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) e a quantificação da biblioteca foi realizada por meio de PCR quantitativa com o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As amostras quantificadas foram diluídas e agrupadas (cinco grupos de todas as 8 amostras cada), utilizando TruSeq DNA CD Index Plate (96 índices, 96 amostras, Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Todas as amostras foram agrupadas numa única lane de fluxo de sequenciamento, utilizando o kit TruSeq PE Cluster v4-cBot-HS (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos), e foram clusterizadas e sequenciadas utilizando o equipamento HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) com o TruSeq SBS Kit v4-HS (200 ciclos), conforme descreve as instruções do manual do fabricante. Toda a análise de sequenciamento foi realizada no Centro Genômico na ESALQ, localizada no Laboratório de Biotecnologia Animal na ESALQ – USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Adaptadores de sequenciamento e leituras de baixa complexidade foram removidas em um passo inicial de filtragem por meio do Trim Galore 0.6.5 software. Somente as leituras com tamanho acima de 70 nucleotídeos e um score Phred menor que 33 foram mantidas após o corte. Controle de qualidade e a estatística das leituras foram estimadas com software FASTQC versão 0.11.8 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/) acesso em 15 de Junho de 2021. O genoma referência adotado foi *Ovis_aries_Oar_rambouillet_V1.0104* acesso em 15 de Junho de 2021. A abundância (contagem de leituras) de mRNAs de todos os genes anotados foram calculados por meio de featureCounts pertencente ao pacote Rsubread (Liao et al., 2019).

- Identificação de genes diferencialmente expressos

Genes diferencialmente expressos (DE) foram analisados por meio de contraste entre dois tratamentos, com auxílio do DESeq2 disponível no pacote

Bioconductor do software R, utilizando um design de multifator (Love et al., 2014). Anteriormente a análise estatística, as contagens das leituras dos dados foram filtradas da seguinte forma: (i) genes com zero contagem para todas as amostras, eram genes não expressos; (ii) genes com menos que uma leitura por amostra na média foram removidas (expressão muito baixa); (iii) genes que não estavam presentes ao menos em 50% das amostras foram removidos (raramente expressos). A abordagem de corte realizada para identificar os genes DE foi controlar o *P*-valor a 5% e cujos valores de $\log_2$ fold change fossem maiores em módulo que a 0.60 ($0.60 > \log_2 FC < -0.60$), de acordo com estudos anteriores e recomendações DESeq2 (Cesar et al., 2016; Love et al., 2014).

- Análise de co-expressão em fatores de transcrição

Os fatores de transcrição (TFs) podem ser definidos como moléculas chave que regulam a expressão de um ou mais genes no sistema biológico (Vaquerizas et al., 2009) e a sua identificação destaca interações gênicas que são de fato mais relevante ao estudo. Assim sendo, a análise de correlação parcial e teoria da informação (PCIT) é utilizada para a reconstrução de redes de co-expressão de genes (GCN), identificando associações significativas gene-gene. Enquanto, a identificação dos TFs é realizada através da análise de fatores de impacto regulatórios (RIF), ao qual calcula para cada condição uma correlação de co-expressão entre TFs e genes DE identificando os genes regulatórios críticos ao estudo. Tanto a análise de PCIT como RIF são mais detalhadas em Reverter e Chan (2008) e Reverter et al. (2010), respetivamente. Ambas as análises foram realizadas através do pacote “CeTF” do software R desenvolvido por Biagi Junior et al. (2021) que não só integra as análises de PCIT e RIF como também realiza inúmeras plotagens dos dados.

- Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, ao qual o peso corporal inicial foi utilizado como critério para divisão em 5 blocos homogêneos. Os cordeiros foram considerados como unidade experimental ($n = 10$), e cada

tratamento continha 2 repetições (bloco 1: $15,91 \pm 0,75$ kg; bloco 2: $18,01 \pm 0,40$ kg; bloco 3: $19,63 \pm 0,22$ kg; bloco 4: $21,35 \pm 0,64$ kg; bloco 5: $25,39 \pm 0,32$ kg). De acordo com o modelo estatístico:

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

[6]

Onde: Y_{ij} = variável dependente no tratamento i e no bloco j ; μ = efeito geral da média; t_i = efeito do tratamento (i = CON e MS20); b_j = efeito do bloco (j = 1 a 5); e_{ij} = erro aleatório da parcela que recebeu o tratamento i , no bloco j .

A vida de prateleira (shelf life) e parâmetros sanguíneos foram avaliados como medida repetida no tempo, ao qual dieta, dia de avaliação e interação entre elas foram avaliados como efeito fixo, e bloco como aleatório, neste caso a melhor estrutura de covariância foi selecionada e ajustada mediante o menor valor de AICC.

Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED do software SAS (Inst., Cary, NC), sendo os resultados significativos foram considerados com P valor $\leq 0,05$ e tendência para P valor $< 0,10$ para médias do teste T.

Resultados

- Consumo alimentar e desempenho animal

A inclusão do melaço de soja na dieta dos animais não influenciou os parâmetros de consumo, peso corporal e ganho diário ($P > 0,05$), com exceção da tendência significativa para eficiência alimentar ($P = 0,07$; Tabela 1), ao qual os cordeiros castrados MS20 foram menos eficientes comparados ao tratamento CON.

Tabela 1 – Consumo e desempenho de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
CMS, g	1152,72	1139,46	47,52	0,87
CMS, %PC	4,27	4,24	0,11	0,90
CPB, g	184,95	182,22	7,43	0,84
EA	0,20	0,17	0,01	0,07
PCi, kg	20,87	21,30	0,66	0,29

PCf, kg	35,21	34,41	1,00	0,61
GMD, g	227,70	208,10	11,59	0,38

¹ – CMS: Consumo de matéria seca; CMS, %PC: Consumo de matéria seca em relação ao peso corporal; CPB: Consumo de proteína bruta; EA: Eficiência alimentar; PCi: Peso corporal inicial; PCf: Peso corporal final; GMD: Ganho médio diário.

² – EPM: Erro padrão da média

- Parâmetros sanguíneos

Neste estudo os parâmetros sanguíneos tiveram melhores resultados quando apresentados como medida repetida no tempo, mesmo que não tenha sido observado efeito de interação para dieta × tempo ($P > 0,05$; Tabela 2). A inclusão do MSO influenciou a ureia sanguínea dos animais ($P = 0,03$), bem como glicose ($P = 0,04$), aumentando e reduzindo respectivamente suas concentrações séricas.

Tabela 2 – Parâmetros sanguíneos de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item	CON		MS20		EPM ¹	P - valor	
	Início	Fim	Início	Fim		Dieta	Dieta×Dia
Proteína total, g dL ⁻¹	4,41	4,32	4,26	4,32	0,13	0,63	0,63
Ureia, mg dL ⁻¹	25,60	27,47	29,49	31,09	1,30	0,03	0,95
Colesterol, mg dL ⁻¹	55,19	58,44	55,63	59,15	3,22	0,74	0,85
Triglicerídeos, mg dL ⁻¹	32,51	32,99	31,59	32,60	2,36	0,66	0,96
Glicose, mg dL ⁻¹	93,13	91,92	85,69	87,28	2,06	0,04	0,62

¹ – EPM: Erro padrão da média

- Características de carcaça e qualidade de carne

Não houve efeito de dieta para a maioria das variáveis ($P > 0,05$), exceto para gordura subcutânea ($P = 0,04$; Tabela 3). A inclusão do MSO aumentou em 29% a deposição de gordura sobre as carcaças (3,09 mm – CON *versus* 4,38 mm – MS20).

Houve influência do MSO sobre os teores de malonaldeído da carne dos cordeiros castrados, ao qual a dieta MS20 reduziu em 97% a oxidação lipídica no músculo *Longissimus thoracis* ($P < 0,01$; Tabela 4). Para as demais variáveis como, pH, AOL, capacidade de retenção de água, perda por cocção e força de cisalhamento, não houveram efeito significativo ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Característica de carcaça e de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
PCQ, kg	18,18	17,84	0,61	0,69
PCF, kg	17,79	17,44	0,60	0,68
RC, %	51,49	51,76	0,56	0,77
PR, %	2,20	2,26	0,10	0,36
Fígado, g	642,10	653,40	23,21	0,80
Fígado, % PC	1,82	1,85	0,05	0,66
EGS, mm	3,09	4,38	0,40	0,04

¹ – PCQ: Peso de carcaça quente; PCF: Peso de carcaça fria; RC: Rendimento de carcaça; PR: Perda por resfriamento; Fígado, %PC: Peso do fígado em relação ao peso corporal; EGS: Espessura de gordura subcutânea.

² – EPM: Erro padrão da média

Tabela 4 – Análises do músculo *Longissimus thoracis* de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item ¹	CON	MS20	EPM ²	P - valor
<i>Análises físicas</i>				
pH	5,59	5,56	0,01	0,30
AOL, cm ²	13,03	12,50	0,58	0,63
CRA, %	81,16	82,08	0,61	0,13
PPC, %	26,38	28,60	1,87	0,22
WBSF, N	29,02	27,91	1,31	0,69
<i>Análises químicas</i>				
Umidade, %	75,33	75,04	0,30	0,39
Cinzas, %	1,18	1,15	0,03	0,59
PB, %	19,08	19,11	0,25	0,93
Lipídeo total, %	4,53	4,71	0,12	0,47
Malonaldeído, mg kg ⁻¹	0,75	0,38	0,07	<0,01

¹ – AOL: Área de olho de lombo (*Longissimus thoracis*); CRA: Capacidade de retenção de água; PPC: Perda por cocção; WBSF: Warner Bratzler – Força de cisalhamento; PB: Proteína bruta.

² – EPM: Erro padrão da média

- Vida de prateleira “Shelf life”

A análise de vida de prateleira visa simular as gôndolas de supermercado, e iniciaram imediatamente após as primeiras 24h de refrigeração das carcaças, ao qual

permaneceram em refrigerador por 14 dias. Não houve efeito de dieta e nem interação de dieta $\times$ dia de avaliação ($P > 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação da vida de prateleira da carne de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item ¹	Dieta	Dia de armazenamento					EPM ²	P - valor	
		0	1	7	10	14		Dieta	Dieta $\times$ Dia
L	CON	46,03	46,00	46,32	47,0	46,93	0,22	0,36	0,79
	MS20	46,71	46,55	47,92	48,44	47,38			
a*	CON	13,56	14,43	10,11	9,77	9,37	0,24	0,99	0,97
	MS20	13,27	14,46	10,03	9,79	9,55			
b*	CON	5,68	7,91	6,07	6,05	6,35	0,13	0,87	0,99
	MS20	5,61	8,10	6,11	6,29	6,44			
a*/b*	CON	2,42	1,84	1,68	1,62	1,53	0,04	0,45	0,99
	MS20	2,43	1,79	1,67	1,60	1,52			
Chroma	CON	14,71	16,46	11,80	11,50	11,34	0,25	0,95	0,98
	MS20	14,43	16,58	11,75	11,66	11,54			
Hue	CON	22,64	28,71	30,98	31,88	34,29	0,50	0,71	0,97
	MS20	22,75	29,27	31,27	32,45	33,79			

¹ – L: Luminosidade; a*: Intensidade de vermelho; b*: Intensidade de amarelo.

² – EPM: Erro padrão da média

- Celularidade de adipócitos

Enquanto a análise de celularidade de adipócitos foi realizada com objetivo de melhor compreender o efeito do MSO sobre o desenvolvimento e diferenciação dos adipócitos. Portanto, o MSO aumentou o diâmetro médio das células adiposas subcutâneas ($P < 0,01$; Tabela 6), bem como a proporção de adipócitos com áreas médias entre 100 e 300 μm^2 ($P < 0,01$), consequentemente reduzindo a proporção de células menores que 100 μm^2 ($P < 0,01$). O efeito único sobre as células adiposas intramusculares entre proporções de 100 e 300 μm^2 parece muito mais atribuído à dispersão dos dados que propriamente efeito da dieta.

Tabela 6 – Celularidade de adipócitos de cordeiros machos castrados terminados em confinamento

Item	CON	MS20	EPM ¹	P - valor
<i>Tecido Subcutâneo</i>				
Diâmetro médio, μm	15,95	18,18	0,55	<0,01
Área, μm^2	287,45	317,26	17,94	0,17

N° Células × 10 ⁴ g ⁻¹	1,7	1,8	0,21	0,81
% < 100 μm ²	29,48	13,28	3,64	<0,01
100 < % < 300 μm ²	36,57	59,05	4,31	<0,01
300 < % < 500 μm ²	17,53	18,85	1,85	0,47
% > 500 μm ²	19,69	12,59	2,57	0,23
<i>Tecido Intramuscular</i>				
Diâmetro médio, μm	16,61	16,74	0,64	0,93
Área, μm ²	291,73	338,70	22,42	0,31
N° Células × 10 ³ g ⁻¹	5,16	4,37	0,38	0,27
% < 100 μm ²	31,16	40,37	3,40	0,19
100 < % < 300 μm ²	39,20	29,25	2,26	0,02
300 < % < 500 μm ²	12,30	10,98	1,37	0,96
% > 500 μm ²	18,57	19,40	2,08	0,85

¹ – EPM: Erro padrão da média

- Avaliação geral da expressão gênica

Todo o transcriptoma das oito amostras dos músculos de cordeiros castrados terminados em confinamento, foram sequenciados utilizando tecnologia RNA-seq. A concentração e integridade do mRNA das amostras são descritas na Tabela 7. Os dados do sequenciamento foram avaliados mediante contraste CON *versus* MS20, ao qual resultou em 11247 genes expressos que foram utilizados na análise de expressão diferencial e fatores de transcrição.

Tabela 7 – Concentração e integridade do mRNA nas amostras

Dieta	Concentração ng/μL	Razão 260/280	RIN
CON	1073	2,17	8,8
CON	407	1,88	9,4
CON	819	2,17	7,8
CON	1010	2,16	8,4
MS20	893	2,17	8,7
MS20	846	2,17	7,6
MS20	1001	2,13	7,8
MS20	694	2,17	9,1

- Análise de expressão diferencial e fatores de transcrição

A análise do transcriptoma do músculo dos cordeiros machos castrados revelou 294 genes diferencialmente expressos ($FDR < 0,10$; Tabela S1), dos quais 171 foram super expressos e 123 suprimidos para MS20 em comparação ao CON. Adicionalmente foi identificado o gene *ACOX2* como exclusivo para CON e *MFSD4B* exclusivo para MS20, com log2 fold change de 2,08 e 1,22 respectivamente.

A análise de rede foi usada para investigar diferenças em genes co-expressos e identificar os fatores de transcrição. A análise de CeTF identificou 172 fatores de transcrição para a comparação CON *versus* MS20 (Tabela S2). Adicionalmente, foi realizada análise de enriquecimento funcional para processos biológicos - GO com todos os genes identificados por análise de expressão diferencial e CeTF, ao qual foi encontrado vias enriquecidas significativamente relacionadas a proteólise (GO:0006508), fosforilação oxidativa (GO:0006119), resposta ao estresse oxidativo (GO:0006979) e processo metabólico derivados de carboidratos (GO:1901135) (Tabela 7 e Figura 1).

Tabela 7 – Vias significativas para genes fatores de transcrição obtidos por análise de CeTF e genes diferencialmente expressos em comparação de dietas CON *versus* MS20.

ID	Descrição	FDR	Genes
GO:0006508	Proteólise	0,001	USP13, OTUD4, USP37, USP31, CUL5, ROCK2, LRRK2, TGFB1I1, SPPL2A, USP34, LTN1, UBR4, XIAP, UBR2, BAG6, VCPIP1, RMND5A, AIFM1, LONP2, ASCC2, PSMF1, CAPN1, TBC1D10A, CTSB, EDEM3, ATE1, ZYG11B, OSBPL7, TGFB1, STAT1, CSNK1D, USP28, CLPX, CYLD, PSMA3, PSME4, FBXL3, NUPR1, COPS8, CRYAB, VPS28, NFE2L2, PTPN3
GO:0006119	Fosforilação oxidativa	0,001	NDUFA7, NDUFS8, NDUFS6, NDUFA12, COQ9, NUPR1, NDUFV3, COX5A, COX7A1, COX6A2, NDUFV1
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	0,011	APP, PRKAA2, NOS3, NDUFA12, LRRK2, HSPB1, OXSR1, FOS, SIRT3, MAPK8, SFPQ, NDUFS8, SESN3, HYAL2, MSRB3, RIPK1, CRYAB, NFE2L2

GO:1901135 Processo metabólico
derivados de carboidratos 0,046

GPI, APP, TNKS, NDUFA12, LRRK2,
NGLY1, SLC2A4, COX7A1,
COX6A2, COX5A, GNS, HK2,
GNPTAB, HYAL2, NDUFV3, UGGT1,
NDUFV1, ATP5ME, EDEM3,
ATP5PF, TCF7L2, RRM1, NDUFA7,
ADSL, TGFB1, ATP5PD, NOS3,
PGAM2, COQ9, CLPX, NDUFS8,
NDUFS6, TRIP11, NUPR1, DCTPP1

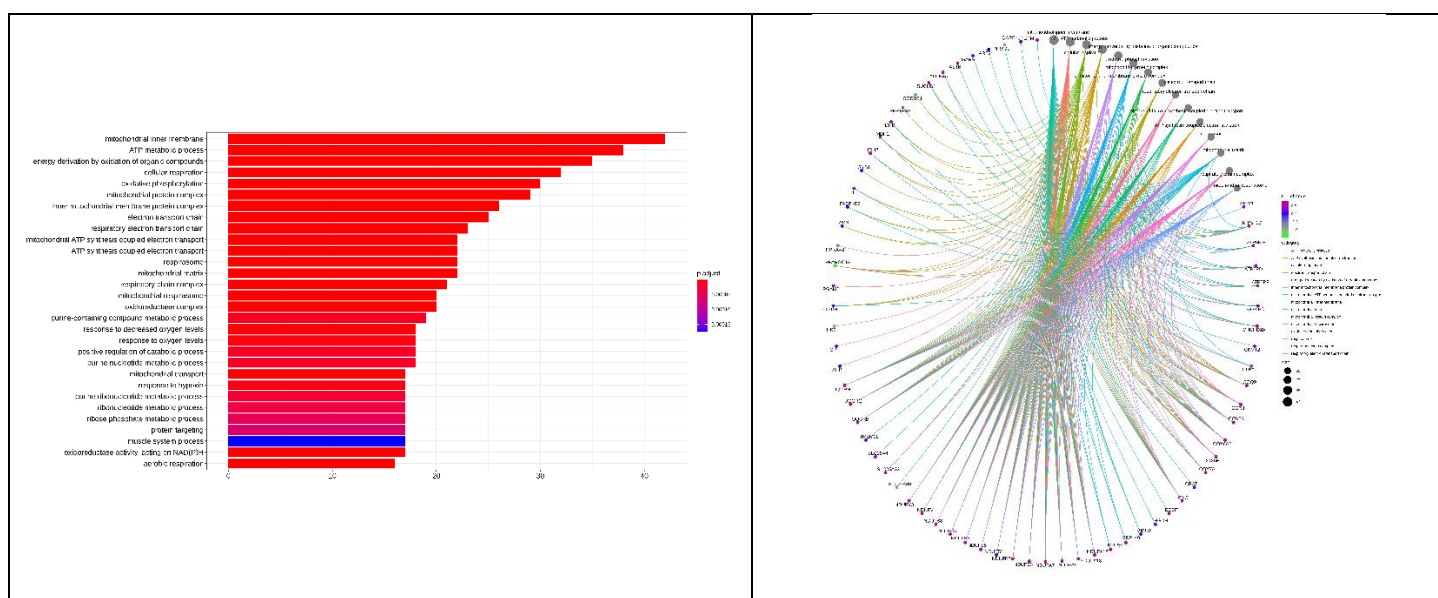


Figura 1 – Enriquecimento funcional dos genes fatores de transcrição obtidos por análise de CeTF, vias e rotas metabólicas GO enriquecidas no contraste CON vs MS20.

Discussão

A castração dos animais dentro do sistema de produção é comumente utilizada para agregar qualidade e padrão na carcaça e carne, seja em bovinos de corte (Santiago et al., 2022), cordeiros (Gravador et al., 2018) ou suínos (Bonneau e Weiler, 2019). Dentre as vantagens oferecidas pela castração está a deposição de gordura na carcaça de forma precoce e, também perfil lipídico que proporciona menor oxidação lipídica, o que aumenta a durabilidade da carne nas prateleiras (Seidman et al., 1982). Em contrapartida, a maior deposição de gordura na carcaça ocorre em detrimento do crescimento muscular desacelerado, animais castrados possuem

menor atividade miogênica que pode estar intimamente relacionada à menor eficiência de uso do N dietético (Lawrence e Fowler, 2002; Zhao et al., 2011).

A redução na eficiência alimentar em virtude da inclusão do MSO na dieta dos cordeiros é corroborada por outros estudos que também tiveram o mesmo efeito (van Cleef et al., 2018; Rodrigues et al., 2020). Animais de produção mais eficientes possuem maior atividade na cadeia transportadora de elétrons (CTE) nas células mitocondriais musculares (Sharifabadi et al., 2012; Fernandez et al., 2020), devido a maior intensidade nas vias oxidativas como, glicólise e β -oxidação que são fontes de NADH e FADH₂ que serão reoxidados durante a fosforilação oxidativa na membrana interna das mitocôndrias (Alberts et al., 2010). No atual estudo, foi observado maior expressão dos genes envolvidos na via glicolítica (*GPI*, *HK2* e *PGAM2*) e fosforilação oxidativa (*NDUFA7*, *NDUFS8*, *NDUFS6*, *NDUFA12*, *COCQ9*, *NUPR1*, *NDUFV7*, *COX5A*, *COX7A1*, *COX6A2*, *NDUFV1*) para a dieta CON, que pode ser atribuída à maior quantidade de glicose oriunda do escape ruminal do amido e metabolização do propionato no fígado, haja visto que quimicamente o amido possui maior densidade energética comparado aos mono e dissacarídeos (Broderick et al., 2008). Adicionalmente, a dieta CON demonstrou maior circulação sanguínea de glicose, o que provavelmente seja fruto de intensa atividade gliconeogênica no fígado, pela conversão do propionato em glicose (Membrive, 2016). Em contrapartida, a dieta MS20 demonstrou maior circulação de açúcares solúveis no músculo, possivelmente frutose, devido à maior expressão do gene *HK2* identificado como diferencialmente expresso na dieta MS20. Este gene, codifica a enzima hexoquinase 2 que dentre as suas funções metabólicas é fosforilar a frutose, haja vista que sua afinidade é maior por frutose comparada à glicose (Hapeta et al., 2021).

A inclusão do MSO na dieta dos cordeiros confinados, aumentaram a circulação sanguínea da ureia, estudos *in situ* demonstraram efeito positivo com a inclusão do MSO na dieta de ovinos, melhorando a digestibilidade da fração proteica da dieta, possivelmente pelo melhor sincronismo entre energia e proteína ao aumentar a fração solúvel da dieta, culminando em maior digestibilidade da matéria seca e proteína bruta (Pereira Junior, 2019).

O efeito lipogênico do MSO na dieta de cordeiros foi reportado por Rodrigues et al. (2020), no atual estudo tal efeito foi observado sobre a gordura na carcaça, em

que a dieta MS20 aumentou em aproximadamente 29% a gordura subcutânea. A castração dos cordeiros neste estudo não parece ter potencializado o efeito lipogênico do MSO, pelo contrário, a ausência de efeitos significativos na análise de genes diferencialmente expressos e fatores de transcrição (CeTFs) para genes envolvidos no metabolismo de lipídeos tais como: *PPARG*, *ACACA*, *FASN*, *FABP4* demonstra similaridade na síntese *de novo* entre as duas dietas. Moon et al. (2011) relata o efeito estimulante do hormônio andrógeno na atividade glicolítica e síntese *de novo* de lipídeos em células da próstata humana. O que pode indicar que para efeitos na carne, cordeiros não castrados seriam mais adequados.

Logo, a diferença no perfil de transcrição entre as duas dietas é sobretudo na oxidação lipídica. A deposição de gordura na carne e carcaça é resultado entre a balança de síntese e oxidação de lipídeos (Baik et al., 2014), no atual estudo a oxidação lipídica no músculo dos cordeiros pertencentes à dieta CON foi maior, demonstrada pela super expressão dos genes *LPL* (lipoproteína lipase), *ACOX2* (acil-CoA oxidase-2) identificados como gene diferencialmente expresso e exclusivamente expresso para a dieta CON. O que culminou para maior tamanho dos adipócitos subcutâneos e espessura de gordura na carcaça. Efeitos dietéticos sobre a gordura intramuscular neste estudo não foram suficientes para alterar a expressão gênica, tampouco a concentração de lipídeos totais na carne, o que pode ser devido ao nível de inclusão do MSO insuficiente ou pouco tempo de confinamento para que haja efeito como o reportado por Rodrigues et al. (2020).

A oxidação lipídica na carne é um parâmetro de extrema relevância na ciência da carne, pois uma maior atividade de oxidação das gorduras, em especial nos ovinos, ocasiona uma depreciação na qualidade e aceitação do produto pelos consumidores, uma vez que está atrelada a sabores rançosos e fortes, além de desacelerar a coloração da carne (Faustman e Suman, 2017). Portanto, reduzir a oxidação lipídica é amplamente desejável e aumenta a vida de prateleira do produto no mercado, o que faz a carne pertencente a dieta MS20 mais atrativa do ponto de vista comercial, tal efeito pode ser facilmente atribuído ao perfil de ácidos graxos que compõe a carne e presença de antioxidantes.

A inclusão do MSO na dieta de cordeiros reduz a quantidade de ácidos poli-insaturados na carne (Rodrigues et al., 2020; Arruda et al., 2021), estes ácidos graxos

são rapidamente atacados por oxigênio devido as suas duplas ligações. A reação de oxidação não é espontânea, portanto, o estado do oxigênio deve ser oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) ou radical hidroxila (OH) (Dominguez et al., 2019). Como discutido acima, o tratamento CON demonstrou maior atividade de fosforilação oxidativa, onde há liberação de radicais livres como superóxido, além de maior β -oxidação onde há liberação de peróxidos de hidrogênio pelos peroxissomos (Alberts et al., 2010), o que proporciona maior atividade de oxidação da carne. Rakita et al. (2021) também relatou a presença de isoflavonas, com propriedades de agir sobre a atividade de enzimas antioxidantes em aves, o que faz do MSO duplamente atrativo, reduz a oxidação lipídica e presença de antioxidantes naturais.

Conclusão

A inclusão do MSO na dieta de cordeiros machos castrados aumenta a deposição de gordura na carcaça mediante a redução na oxidação lipídica muscular, evidenciada pela concentração de malonaldeído na carne e corroborada com maiores expressões na dieta CON de genes como *LPL* e *ACOX2*, relacionados com a oxidação de triglicerídeos.

Referências

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2010) **Conversão da energia: Mitocôndrias e Cloroplastos**. In.: Biologia Molecular da Célula. 5th edition. Artmed.
- AMSA - American Meat Science Association (1995) **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and tenderness measurements of fresh meat**. National Livestock and Meat Board, ChicagoIL.
- AMSA American Meat Science Association (2012) **Meat Color Measurement Guidelines**. American Meat Science Association. Champaign, Illinois
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Washington, DC.

AOAC, 1995. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). Washington, DC.

Arruda MCG, Almeida MTC, Bertoco JPA, Pereira-Junior SA, Castro-Filho ES, Feliciano AL, Rodrigues JL, Torres RNS, Costa RV, Grilo LMSFSS, Ezequiel JM (2021) Soybean molasses to replace corn for feedlot lambs on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. **Translational Animal Science** 5(1), txaa230.

Baik M, Jeong JY, Vu TTT, Piao MY, Kang HJ (2014) Effects of castration on the adiposity and expression of lipid metabolism genes in various fat depots of Korean cattle. **Livestock Science** 168, 168-176.

Biagi Junior CO, Nociti RP, Brotto DB (2021) CeTF: an R/Bioconductor package for transcription factor co-expression networks using regulatory impact factors (RIF) and partial correlation and information (PCIT) analysis. **BMC Genomics** 22, 624

Bitencourt LL (2012) **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. 131f. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemical Physiology** 37 (8), 911–917.

Bonneau M, Weiler U (2019) Pros and cons of alternatives to piglet castration: Welfare, boar taint, and other meat quality traits. **Animals** 9(11), 884.

Broderick GA, Luchini ND, Reynal SM, Varga GA, Ishler VA (2008) Effect on production of replacing dietary starch with sucrose in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 91(12), 4801-4810.

Cesar ASM, Regitano LCA, Poleti MD, Andrade SCS, Tizioto PC, Oliveira PSN, Felício AM, do Nascimento ML, Chaves AS, Lanna DPD (2016) Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genom** 17, 961.

CIE - International Commission on Illumination (2004) Colorimetry technical report. In.: DeFrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Jardon PW Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science** 87, 4195–4206.

Chen L, Mi H, Li B, Liu Y, Zhou C, Ren A, Zhang G (2021) Offering soybean molasses adsorbed to agricultural by-products improved lactation performance through modulating plasma metabolic enzyme pool of lactating cows. **Food Science & Nutrition** 9(12), 6447-6457.

Detmann E, Costa e Silva LF, Rocha GC, Palma MNN, Rodrigues JPP (2021) **Métodos para Análise de Alimento**. 2nd ed. Suprema: Visconde do Rio Branco, Brazil.

Domínguez R, Pateiro M, Gagaoua M, Barba FJ, Zhang W, Lorenzo JM (2019) A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants** 8(10), 429.

Etherton TD, Thompson EH, Allen CE (1977) Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism. **Journal of Lipid Research** 18(4), 552-557.

Faustman C, Suman SP (2017) **The eating quality of meat: Color**. In.: Lawrie's Meat Science, Woodhead Publishing, p. 329-356.

Fernandez EE, Oltjen JW, Sainz RD (2020) Mitochondrial abundance and function in muscle from beef steers with divergent residual feed intakes. **Animal** 14(3), 560-565.

Gilbert CD, Lunt DK, Miller RK, Smith SB (2003) Carcass, sensory, and adipose tissue traits of Brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. **Journal of Animal Science** 81(10), 2457–2468.

Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC (2006) Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. **Journal of Dairy Science** 89(11), 4404-4413.

Gravador RS, Pace E, Mooney BR, Jaeger SR, Gkarane V, Fahey AG, Monahan FJ (2018) A consumer study of the effect of castration and slaughter age of lambs on the sensory quality of meat. **Small Ruminant Research** 169, 148-153.

Hall MB (2000). **Neutral Detergent-Soluble Carbohydrates Nutritional Relevance and Analysis**. University of Florida, Gainesville.

Hamm R (1986) **Functional properties of the myofibrillar system and their measurement**. In.: Bechtel, P.J. (Ed.), Muscle as Food Orlando. Academic Press, p. 135–199.

Hapeta P, Szczepańska P, Witkowski T, Nicaud JM, Crutz-Le Coq AM, Lazar Z (2021) The role of hexokinase and hexose transporters in preferential use of glucose over fructose and downstream metabolic pathways in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Molecular Sciences** 22(17), 9282.

Houben JH, van Dijk A, Eikelenboom G, Hoving-Bolink AH (2000) Effect of dietary vitamin E supplementation, fat level and packaging on colour stability and lipid oxidation in minced beef. **Meat Science** 55 (3), 331–336.

Lawrence TLJ, Fowler VR (2002) **Compensatory growth**. Growth of farm animals, (Ed. 2), p.229-254.

Liao Y, Smyth GK, Shi W (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. **Nucleic Acids Research** 47, e47.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol** 15, 550

Membrive CMB (2016) **Anatomy and physiology of the rumen**. In.: Rumenology. Millen DD, Arrigoni MDB, Pacheco RDL (Eds.) Springer, p. 1-38

Moharrery A, Larsen MOGENS, Weisbjerg MR (2014) Starch digestion in the rumen, small intestine, and hind gut of dairy cows—A meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology** 192, 1-14.

Moon JS, Jin WJ, Kwak JH, Kim HJ, Yun MJ, Kim JW, Kim KS (2011) Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. **Biochemical Journal** 433(1), 225-233.

Nagaraja TG, Lechtenberg KF (2007) Acidosis in feedlot cattle. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice** 23(2), 333-350.

National Research Council - NRC (2001) **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. (7th ed.). National Academic Press, Washington, DC.

National Research Council - NRC (2007) **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. (7th ed.). National Academic Press, Washington, DC.

Pereira Junior SAG (2019) **Melaço de soja na terminação e metabolismo de ovinos em confinamento**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Prior RL (1983) Lipogenesis and adipose tissue cellularity in steers switched from alfalfa hay to high concentrate diets. **Journal of Animal Science** 56(2), 483-492.

Rakita S, Banjac V, Djuragic O, Cheli F, Pinotti L (2021) Soybean molasses in animal nutrition. **Animals** 11(2), 514.

Reverter A, Chan E (2008) Combining partial correlation and an information theory approach to the reversed engineering of gene co-expression networks. **Bioinformatics** 24(21):2491–7.

Reverter A, Hudson N, Nagaraj S, Pérez-Enciso M, Dalrymple B (2010) Regulatory impact factors: unraveling the transcriptional regulation of complex traits from expression data. **Bioinformatics** 26(7):896–904.

Rodrigues JL, Pereira-Junior SAG, Castro Filho ES, Costa RV, Barducci RS, van Cleef EHCB, Ezequiel JMB (2020) Effects of elevated concentrations of soybean molasses on feedlot performance and meat quality of lambs. **Livestock Science** 240, 104155.

Santiago BM, Baldassini WA, Chiaratti MR, Pandey AK, Torrecilhas JA, Torres RN, Neto ORM (2023) Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nellore young steers and bulls feedlot finished. **Livestock Science** 268, 105151.

Seideman SC, Cross HR, Oltjen RR, Schanbacher BD (1982) Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science** 55(4), 826-840.

Sharifabadi HR, Zamiri MJ, Rowghani E, Bottje WG (2012) Relationship between the activity of mitochondrial respiratory chain complexes and feed efficiency in fat-tailed Ghezel lambs. **Journal of Animal Science** 90(6), 1807-1815.

Silva Sobrinho AG (1999) **Body composition and characteristics of carcass from lambs of different genotypes and ages at slaughter**. Palmerston North. Massey University.

Souza FN, Monteiro AM, dos Santos PR, Sanchez EMR, Blagitz MG, Latorre AO, Figueiredo Neto AM, Gidlund M, Della Libera AM (2011) Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in bovine leukemia virus-infected dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 143(1-2), 162-166.

Valadares Filho SC, Lopes, SA (2018) CQBAL 4.0. **Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes**.

van Cleef E, Almeida M, Paschoaloto J, Castro Filho E, Barducci R, Soragni G, Ezequiel J (2018) PSXV-17 Effects of increasing concentrations of soybean molasses on feed intake, growth performance, carcass and meat traits of feedlot lambs. **Journal of Animal Science** 96:3, 471-471.

Van Der Merwe DA, Brand TS, Hoffman LC (2020) Precision finishing of South African lambs in feedlots: a review. **Tropical Animal Health and Production** 52, 2769-2786.

Vaquerizas J, Kummerfeld S, Teichmann S, Luscombe N. (2009) A census of human transcription factors: function, expression and evolution. **Nat Ver Genet** 10(4):252–63.

Vyncke W (1970) Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichm** 72:1084–1087.

Zhao JX, Hu J, Zhu MJ, Du M (2011) Trenbolone enhances myogenic differentiation by enhancing β -catenin signaling in muscle-derived stem cells of cattle. **Domestic Animal Endocrinology** 40(4), 222-229.

Tabela S1 – Lista completa dos genes diferencialmente expressos identificados no contraste CON *versus* MS20 em cordeiros machos castrados.

Ensembl	Gene	log2 FoldChange	FDR	Ensembl	Gene	log2 FoldChange	FDR
ENSG00000134698	AGO4	-0.739	0,003	ENSG00000124406	ATP8A1	-0.747	0,049
ENSG00000165029	ABCA1	-1,05	0,017	ENSG00000081923	ATP8B1	0.882	0,031
ENSG00000154265	ABCA5	-0.652	0,098	ENSG00000011114	BTBD7	-0.847	0,001
ENSG00000139826	ABHD13	-0.667	0,098	ENSG00000181904	C5orf24	-0.768	0,006
ENSG00000142303	ADAMTS10	0.826	0,010	ENSG00000167434	CA4	2,09	0,028
ENSG00000172493	AFF1	-0.639	0,100	ENSG00000158966	CACHD1	-0.620	0,002
ENSG00000159423	ALDH4A1	0.778	0,040	ENSG00000153956	CACNA2D1	-0.802	2,3x10 ⁻⁹
ENSG00000125652	ALKBH7	0.813	0,020	ENSG00000100065	CARD10	0.718	0,060
ENSG00000178038	ALS2CL	0.625	0,097	ENSG00000127995	CASD1	-0.701	0,017
ENSG00000184675	AMER1	-1,14	0,021	ENSG00000239282	CASTOR1	0.645	0,033
ENSG00000013523	ANGEL1	-0.632	0,097	ENSG00000118523	CCN2	-1,02	0,089
ENSG00000185009	AP3M1	-0.667	0,028	ENSG00000138764	CCNG2	-0.853	0,057
ENSG00000081014	AP4E1	-0.764	0,012	ENSG00000129315	CCNT1	-0.812	0,009
ENSG00000125843	AP5S1	0.716	0,033	ENSG00000111860	CEP85L	-1,04	0,015
ENSG00000120318	ARAP3	0.635	0,045	ENSG00000166596	CFAP52	1,05	0,042
ENSG00000164144	ARFIP1	-0.808	0,018	ENSG00000250479	CHCHD10	0.759	0,017
ENSG00000100852	ARHGAP5	-0.646	0,046	ENSG00000153922	CHD1	-0.644	0,040
ENSG00000102401	ARMCX3	-0.601	0,020	ENSG00000188419	CHM	-0.619	0,020
ENSG00000116539	ASH1L	-0.672	0,037	ENSG00000108556	CHRNE	0.702	0,046
ENSG00000143970	ASXL2	-0.913	0,005	ENSG00000182022	CHST15	0.695	0,088
ENSG00000107669	ATE1	-0.671	0,023	ENSG00000130779	CLIP1	-0.615	0,032

ENSG00000070961	ATP2B1	-0.602	0,042	ENSG000000138767	CNOT6L	-0.785	0,058
ENSG00000099624	ATP5F1D	0.625	0,006	ENSG000000106603	COA1	0.649	0,039
ENSG000000169020	ATP5ME	0.714	0,045	ENSG000000167186	COQ7	0.768	0,040
ENSG000000165240	ATP7A	-0.735	0,050	ENSG000000198938	COX3	0.681	0,054
ENSG000000156885	COX6A2	0.742	0,034	ENSG000000075618	FSCN1	0.757	0,100
ENSG000000161281	COX7A1	0.772	0,011	ENSG000000106701	FSD1L	-0.817	0,039
ENSG000000140848	CPNE2	0.771	0,072	ENSG000000130005	GAMT	1,03	6,1x10 ⁻⁹
ENSG000000182158	CREB3L2	-0.711	0,072	ENSG000000160221	GATD3A	0.636	0,020
ENSG000000166266	CUL5	-0.639	0,003	ENSG000000187513	GJA4	0.916	0,043
ENSG000000051523	CYBA	0.839	0,037	ENSG000000135677	GNS	-0.759	0,011
ENSG000000179091	CYC1	0.632	0,018	ENSG000000119927	GPAM	-0.719	0,086
ENSG000000179958	DCTPP1	0.996	0,018	ENSG000000167701	GPT	0.600	0,053
ENSG000000110367	DDX6	-0.740	0,003	ENSG000000197448	GSTK1	0.741	0,100
ENSG000000155011	DKK2	3,12	0,073	ENSG000000165417	GTF2A1	-0.721	0,090
ENSG000000198719	DLL1	0.827	0,078	ENSG000000143774	GUK1	0.752	0,009
ENSG000000172869	DMXL1	-0.603	0,034	ENSG000000008869	HEATR5B	-0.701	0,034
ENSG000000130159	ECSIT	0.656	0,001	ENSG000000137133	HINT2	0.761	0,017
ENSG000000116406	EDEM3	-0.780	0,006	ENSG000000159399	HK2	-1,01	0,076
ENSG000000102189	EEA1	-0.813	0,002	ENSG000000117305	HMGCL	0.660	0,040
ENSG000000159658	EFCAB14	-0.617	0,025	ENSG000000168172	HOOK3	-0.788	0,010
ENSG000000090776	EFNB1	0.767	0,038	ENSG000000102878	HSF4	0.618	0,079
ENSG000000172889	EGFL7	0.841	0,028	ENSG000000132622	HSPA12B	0.920	0,050
ENSG000000149499	EML3	0.680	0,016	ENSG000000068001	HYAL2	1,07	0,034
ENSG000000152223	EPG5	-0.753	0,006	ENSG000000182054	IDH2	0.736	0,012
ENSG000000196482	ESRRG	-2,04	0,039	ENSG000000100360	IFT27	0.619	0,062
ENSG000000162585	FAAP20	0.643	0,032	ENSG000000104998	IL27RA	0.682	0,014
ENSG000000221968	FADS3	1,16	0,069	ENSG000000137033	IL33	-0.749	0,039

ENSG00000164896	FASTK	0.624	0,040	ENSG00000063241	ISOC2	0.712	0,002
ENSG00000159069	FBXW5	0.873	0,037	ENSG00000186994	KANK3	1,03	2x10 ⁻⁹
ENSG00000000938	FGR	0.911	0,073	ENSG00000170852	KBTBD2	-0.650	0,060
ENSG00000170345	FOS	-3,24	0,033	ENSG00000130037	KCNA5	1,23	0,021
ENSG00000170802	FOXN2	-0.812	0,033	ENSG00000129159	KCNC1	-1,75	0,002
ENSG00000138759	FRAS1	-0.743	0,044	ENSG00000073614	KDM5A	-0.729	0,001
ENSG00000006459	KDM7A	-0.852	0,026	ENSG00000135972	MRPS9	0.798	0,039
ENSG00000066735	KIF26A	0.694	0,097	ENSG00000125459	MSTO1	0.636	0,091
ENSG00000128607	KLHDC10	-0.600	0,003	ENSG00000039123	MTREX	-0.618	0,043
ENSG00000114796	KLHL24	-0.678	0,012	ENSG00000110921	MVK	0.826	0,039
ENSG00000179454	KLHL28	-0.938	0,046	ENSG00000166886	NAB2	0.607	0,073
ENSG00000198642	KLHL9	-0.624	0,071	ENSG00000166833	NAV2	-1,17	0,016
ENSG00000102753	KPNA3	-0.618	0,025	ENSG00000144426	NBEAL1	-0.672	0,062
ENSG00000174611	KY	-0.714	0,093	ENSG00000186010	NDUFA13	0.619	0,039
ENSG00000196233	LCOR	-0.642	0,039	ENSG00000267855	NDUFA7	0.676	0,013
ENSG00000121454	LHX4	-0.805	0,020	ENSG00000099795	NDUFB7	0.637	0,017
ENSG00000113594	LIFR	-0.791	0,005	ENSG00000115286	NDUFS7	0.655	0,012
ENSG00000072163	LIMS2	0.666	0,053	ENSG00000110717	NDUFS8	0.648	0,001
ENSG00000189308	LIN54	-0.629	0,032	ENSG00000167792	NDUFV1	0.849	0,003
ENSG00000164187	LMBRD2	-0.951	0,002	ENSG00000183091	NEB	-0.647	0,012
ENSG00000113441	LNPEP	-1,26	0,003	ENSG00000196712	NF1	-0.714	0,019
ENSG00000145012	LPP	-0.969	0,045	ENSG00000102908	NFAT5	-0.934	0,040
ENSG00000188906	LRRK2	-0.653	0,010	ENSG00000196865	NHLRC2	-0.622	0,036
ENSG00000198862	LTN1	-0.712	0,018	ENSG00000171840	NINJ2	0.634	0,067
ENSG00000091436	MAP3K20	-0.680	0,001	ENSG00000163864	NMNAT3	1,05	0,011
ENSG00000107643	MAPK8	-0.685	0,094	ENSG00000089250	NOS1	-1,03	0,034
ENSG00000011258	MBTD1	-0.698	0,025	ENSG00000134250	NOTCH2	-1,09	0,086

ENSG00000225663	MCRIP1	0.614	0,049	ENSG00000204301	NOTCH4	0.954	0,015
ENSG00000172366	MCRIP2	0.769	0,031	ENSG00000113580	NR3C1	-0.789	0,000
ENSG00000139780	METTL21C	-1,33	0,047	ENSG00000185189	NRBP2	0.809	0,034
ENSG00000174197	MGA	-0.966	0,018	ENSG00000169752	NRG4	0.633	0,078
ENSG00000155545	MIER3	-0.719	0,016	ENSG00000180530	NRIP1	-0.915	0,044
ENSG00000008382	MPND	0.882	0,026	ENSG00000074527	NTN4	0.986	0,032
ENSG00000072415	MPP5	-0.634	0,011	ENSG00000074590	NUAK1	-0.730	0,068
ENSG00000185608	MRPL40	0.624	0,006	ENSG00000167799	NUDT8	0.779	0,046
ENSG00000176046	NUPR1	0.674	0,040	ENSG00000108961	RANGRF	0.869	0,020
ENSG00000122126	OCRL	-0.676	0,010	ENSG00000079337	RAPGEF3	0.946	0,018
ENSG00000006025	OSBPL7	0.849	0,026	ENSG00000153179	RASSF3	-0.794	0,092
ENSG00000164164	OTUD4	-0.673	0,000	ENSG00000076067	RBMS2	0.636	0,038
ENSG00000204237	OXLD1	0.814	0,025	ENSG00000157110	RBPM5	0.606	0,049
ENSG00000172939	OXSRI	-0.611	0,010	ENSG00000162944	RFTN2	-0.714	0,044
ENSG00000100266	PACSIN2	0.645	0,067	ENSG00000102760	RGCC	1,14	0,026
ENSG00000107719	PALD1	1,07	0,046	ENSG00000164327	RICTOR	-0.771	0,073
ENSG00000041880	PARP3	1,47	0,010	ENSG00000137275	RIPK1	0.620	0,060
ENSG00000258429	PDF	0.602	0,093	ENSG00000153561	RMND5A	-0.645	0,006
ENSG00000115425	PECR	0.620	0,074	ENSG00000163961	RNF168	-0.690	0,031
ENSG00000179094	PER1	0.972	0,031	ENSG00000158286	RNF207	1,23	0,011
ENSG00000173889	PHC3	-0.846	0,009	ENSG00000160678	S100A1	1,06	0,080
ENSG00000115020	PIKFYVE	-0.713	0,017	ENSG00000139697	SBNO1	-0.702	0,008
ENSG00000198961	PJA2	-0.725	0,031	ENSG00000175356	SCUBE2	0.663	0,045
ENSG00000160447	PKN3	0.680	0,097	ENSG00000113615	SEC24A	-0.760	0,063
ENSG00000165495	PKNOX2	-0.905	0,075	ENSG00000138593	SECISBP2L	-0.810	4,3x10 ⁻⁹
ENSG00000187091	PLCD1	0.789	0,009	ENSG00000198832	SELENOM	0.900	0,031
ENSG00000138193	PLCE1	-0.871	0,052	ENSG00000075223	SEMA3C	-1,04	4,3x10 ⁻⁹

ENSG00000122008	POLK	-0.636	0,088	ENSG00000149257	SERPINH1	0.602	0,044
ENSG00000133110	POSTN	0.991	0,089	ENSG00000149212	SESN3	-0.937	0,000
ENSG00000166387	PPFIBP2	-0.741	0,055	ENSG00000095370	SH2D3C	1,22	0,017
ENSG00000158528	PPP1R9A	-0.691	0,003	ENSG00000147010	SH3KBP1	0.859	0,076
ENSG00000162409	PRKAA2	-0.659	0,001	ENSG00000142082	SIRT3	0.664	0,025
ENSG00000188191	PRKAR1B	0.875	0,031	ENSG00000100625	SIX4	-0.678	0,095
ENSG00000068878	PSME4	-0.679	0,027	ENSG00000113504	SLC12A7	0.732	0,019
ENSG00000070159	PTPN3	-0.820	0,032	ENSG00000112394	SLC16A10	-0.670	0,100
ENSG00000176894	PXMP2	0.908	0,077	ENSG00000134294	SLC38A2	-0.917	0,076
ENSG00000164080	RAD54L2	-0.636	0,073	ENSG00000198689	SLC9A6	-0.609	0,060
ENSG00000119906	SLF2	-0.836	0,003	ENSG00000100815	TRIP11	-0.692	0,057
ENSG00000145147	SLIT2	-0.934	0,093	ENSG00000011105	TSPAN9	-0.641	0,044
ENSG00000113658	SMAD5	-0.785	0,016	ENSG00000184281	TSSC4	0.717	0,039
ENSG00000163029	SMC6	-0.617	0,023	ENSG00000130338	TULP4	-1,40	0,044
ENSG00000176994	SMCR8	-0.826	0,052	ENSG00000184470	TXNRD2	0.651	0,002
ENSG00000143376	SNX27	-0.602	0,054	ENSG00000157741	UBN2	-0.781	0,006
ENSG00000143842	SOX13	1,08	0,028	ENSG00000024048	UBR2	-0.608	0,073
ENSG00000203883	SOX18	1,25	0,060	ENSG00000144357	UBR3	-0.718	$2,8 \times 10^{-7}$
ENSG00000138600	SPPL2A	-0.727	0,000	ENSG00000136731	UGGT1	-0.740	0,015
ENSG00000010327	STAB1	0.713	0,011	ENSG00000152332	UHMK1	-0.653	0,019
ENSG00000101972	STAG2	-0.853	0,001	ENSG00000184076	UQCR10	0.606	0,035
ENSG00000115145	STAM2	-0.670	0,061	ENSG00000164405	UQCRQ	0.736	0,039
ENSG00000160551	TAOK1	-0.769	0,008	ENSG00000176542	USF3	-0.958	$3,8 \times 10^{-8}$
ENSG00000139546	TARBP2	0.679	0,018	ENSG00000058056	USP13	-0.950	0,017
ENSG00000148737	TCF7L2	-0.791	0,100	ENSG00000103404	USP31	-0.811	0,021
ENSG00000168769	TET2	-0.732	0,017	ENSG00000135913	USP37	-0.945	0,014
ENSG00000105329	TGFB1	0.815	0,032	ENSG00000124486	USP9X	-0.639	$9,6 \times 10^{-8}$

ENSG00000140682	TGFB1I1	0.916	0,009	ENSG00000164338	UTP15	-0.715	0,032
ENSG00000106799	TGFBR1	-0.728	0,031	ENSG00000175073	VCPIP1	-0.604	0,089
ENSG00000142910	TINAGL1	1,18	0,010	ENSG00000026025	VIM	0.629	0,010
ENSG00000198586	TLK1	-0.690	0,070	ENSG00000160131	VMA21	-0.870	0,031
ENSG00000127419	TMEM175	0.625	0,034	ENSG00000197969	VPS13A	-0.603	0,017
ENSG00000131634	TMEM204	0.746	0,076	ENSG00000129003	VPS13C	-0.746	0,001
ENSG00000106771	TMEM245	-0.797	0,002	ENSG00000091157	WDR7	-0.620	0,026
ENSG00000109133	TMEM33	-0.863	0,082	ENSG00000101966	XIAP	-0.814	0,038
ENSG00000173273	TNKS	-0.605	0,005	ENSG00000114127	XRN1	-0.725	0,002
ENSG00000083312	TNPO1	-0.629	0,006	ENSG00000126804	ZBTB1	-0.659	0,026
ENSG00000090905	TNRC6A	-0.704	0,039	ENSG00000181722	ZBTB20	-1,08	0,084
ENSG00000197323	TRIM33	-0.656	0,030	ENSG00000196323	ZBTB44	-0.713	0,015
ENSG00000149289	ZC3H12C	-1,21	0,032	ENSG00000131116	ZNF428	0.664	0,086
ENSG00000140836	ZFHX3	-0.687	0,033	ENSG00000168813	ZNF507	-0.746	0,081
ENSG00000005889	ZFX	-0.693	0,011	ENSG00000168916	ZNF608	-0.619	0,060
ENSG00000198315	ZKSCAN8	-0.739	0,036	ENSG00000273611	ZNHIT3	0.767	0,082
ENSG00000163848	ZNF148	-0.658	0,073	ENSG00000214941	ZSWIM7	0.677	0,060
ENSG00000096654	ZNF184	-0.778	0,047	ENSG00000162378	ZYG11B	-0.621	0,088

Tabela S2 – Lista completa dos genes fatores de transcrição identificados por análise de CeTF em contraste CON *versus* MS20 de cordeiros machos castrados

Ensembl	Gene	log2 FoldChange	Biotipo	Ensembl	Gene	log2 FoldChange	Biotipo
ENSG00000090861	AARS1	0.0212	mRNAs	ENSG00000241837	ATP5PO	0.273	mRNAs

ENSG00000077522	ACTN2	-0.043	mRNAs	ENSG00000054793	ATP9A	-0.361	mRNAs
ENSG00000143537	ADAM15	0.253	mRNAs	ENSG00000156735	BAG4	0.263	mRNAs
ENSG00000239900	ADSL	0.102	mRNAs	ENSG00000204463	BAG6	0.075	mRNAs
ENSG00000156709	AIFM1	0.260	mRNAs	ENSG00000104267	CA2	0.485	mRNAs
ENSG00000160746	ANO10	-0.182	mRNAs	ENSG00000164879	CA3	0.181	mRNAs
ENSG00000177119	ANO6	-0.176	mRNAs	ENSG00000108509	CAMTA2	0.178	TFs
ENSG00000042753	AP2S1	0.255	mRNAs	ENSG00000014216	CAPN1	0.081	mRNAs
ENSG00000142192	APP	-0.025	mRNAs	ENSG00000174059	CD34	0.237	mRNAs
ENSG00000100325	ASCC2	-0.116	mRNAs	ENSG00000105401	CDC37	0.207	mRNAs
ENSG00000162772	ATF3	0.945	TFs	ENSG00000079432	CIC	-0.046	mRNAs e TF
ENSG00000167863	ATP5PD	0.331	mRNAs	ENSG00000131730	CKMT2	0.334	mRNAs
ENSG00000163815	CLEC3B	0.509	mRNAs	ENSG00000091483	FH	0.343	mRNAs
ENSG00000166855	CLPX	-0.300	mRNAs	ENSG00000128591	FLNC	-0.346	mRNAs
ENSG00000198612	COPS8	0.138	mRNAs	ENSG00000106105	GARS1	0.250	mRNAs
ENSG00000088682	COQ9	0.574	mRNAs	ENSG00000116906	GNPAT	0.106	mRNAs
ENSG00000178741	COX5A	0.478	mRNAs	ENSG00000111670	GNPTAB	-0.569	mRNAs
ENSG00000126267	COX6B1	0.575	mRNAs	ENSG00000105220	GPI	0.139	mRNAs
ENSG00000095321	CRAT	-0.029	mRNAs	ENSG00000167701	GPT	0.600	mRNAs
ENSG00000121671	CRY2	-0.003	mRNAs	ENSG00000125388	GRK4	0.289	mRNAs
ENSG00000109846	CRYAB	0.007	mRNAs	ENSG00000104812	GYS1	-0.019	mRNAs
ENSG00000141551	CSNK1D	0.047	mRNAs	ENSG00000105323	HNRNPUL1	-0.033	mRNAs
ENSG00000159692	CTBP1	0.279	mRNAs	ENSG00000170606	HSPA4	-0.303	mRNAs
ENSG00000164733	CTSB	0.005	mRNAs	ENSG00000106211	HSPB1	-0.073	mRNAs
ENSG00000112514	CUTA	0.209	mRNAs	ENSG00000067704	IARS2	-0.004	mRNAs
ENSG00000083799	CYLD	-0.285	mRNAs	ENSG00000141753	IGFBP4	-0.040	mRNAs
ENSG00000145358	DDIT4L	0.101	mRNAs	ENSG00000164941	INTS8	-0.535	mRNAs
ENSG00000108654	DDX5	0.299	mRNAs	ENSG00000170871	KIAA0232	-0.366	mRNAs

ENSG00000184544	DHRS7C	0.326	mRNAs	ENSG00000157119	KLHL40	0.284	mRNAs
ENSG00000140403	DNAJA4	-0.135	mRNAs	ENSG00000087299	L2HGDH	-0.086	mRNAs
ENSG00000162616	DNAJB4	0.209	mRNAs	ENSG00000102910	LONP2	0.074	mRNAs
ENSG00000137094	DNAJB5	0.245	mRNAs	ENSG00000175556	LONRF3	0.027	mRNAs
ENSG00000168259	DNAJC7	0.230	mRNAs	ENSG00000175445	LPL	0.513	mRNAs
ENSG00000148730	EIF4EBP2	-0.476	mRNAs	ENSG00000204178	MACO1	-0.291	mRNAs
ENSG00000100664	EIF5	-0.273	mRNAs	ENSG00000178573	MAF	0.040	mRNAs e TF
ENSG00000106991	ENG	0.254	mRNAs	ENSG00000196547	MAN2A2	-0.151	mRNAs
ENSG00000143819	EPHX1	0.012	mRNAs	ENSG00000085511	MAP3K4	-0.002	mRNAs
ENSG00000089248	ERP29	0.259	mRNAs	ENSG00000069020	MAST4	0.029	mRNAs
ENSG00000138640	FAM13A	0.236	mRNAs	ENSG00000146701	MDH2	0.534	mRNAs
ENSG00000118246	FASTKD2	0.025	mRNAs	ENSG00000165487	MICU2	0.111	mRNAs
ENSG00000174099	MSRB3	-0.036	mRNAs	ENSG00000184207	PGP	0.422	mRNAs
ENSG00000164976	MYORG	-0.247	mRNAs	ENSG00000006576	PHTF2	-0.471	mRNAs
ENSG00000184752	NDUFA12	0.455	mRNAs	ENSG00000198961	PJA2	-0.725	mRNAs
ENSG00000128609	NDUFA5	0.399	mRNAs	ENSG00000160539	PLPP7	0.107	mRNAs
ENSG00000267855	NDUFA7	0.676	mRNAs	ENSG00000146278	PNRC1	-0.449	mRNAs
ENSG00000119013	NDUFB3	0.520	mRNAs	ENSG00000255529	POLR2M	0.111	mRNAs
ENSG0000023228	NDUFS1	0.056	mRNAs	ENSG00000138032	PPM1B	-0.434	mRNAs
ENSG00000168653	NDUFS5	0.538	mRNAs	ENSG00000154415	PPP1R3A	-0.370	mRNAs
ENSG00000145494	NDUFS6	0.592	mRNAs	ENSG00000205155	PSENEN	0.158	mRNAs
ENSG00000160194	NDUFV3	0.459	mRNAs	ENSG00000100567	PSMA3	0.007	mRNAs
ENSG00000101158	NELFCD	0.182	mRNAs	ENSG00000161057	PSMC2	0.002	mRNAs
ENSG00000131196	NFATC1	-0.363	mRNAs e TF	ENSG00000125818	PSMF1	0.321	mRNAs
ENSG00000116044	NFE2L2	-0.280	TFs	ENSG00000174915	PTDSS2	0.192	mRNAs
ENSG00000151092	NGLY1	-0.002	mRNAs	ENSG00000179950	PUF60	0.121	mRNAs

ENSG00000225921	NOL7	0.174	mRNAs	ENSG00000172053	QARS1	0.128	mRNAs
ENSG00000074181	NOTCH3	0.105	mRNAs	ENSG00000174903	RAB1B	0.091	mRNAs
ENSG00000197893	NRAP	-0.306	mRNAs	ENSG00000118873	RAB3GAP2	-0.418	mRNAs
ENSG00000115216	NRBP1	-0.014	mRNAs	ENSG00000075785	RAB7A	0.059	mRNAs
ENSG00000272325	NUDT3	-0.002	mRNAs	ENSG00000136144	RCBTB1	0.402	mRNAs
ENSG00000104904	OAZ1	0.181	mRNAs	ENSG00000106615	RHEB	-0.057	mRNAs
ENSG00000105953	OGDH	0.126	mRNAs	ENSG00000134318	ROCK2	-0.175	mRNAs
ENSG00000145730	PAM	0.127	mRNAs	ENSG00000161970	RPL26	0.160	mRNAs
ENSG00000132570	PCBD2	0.280	mRNAs	ENSG00000131469	RPL27	0.255	mRNAs
ENSG00000165494	PCF11	-0.604	mRNAs	ENSG00000118181	RPS25	0.161	mRNAs
ENSG00000168291	PDHB	0.347	mRNAs	ENSG00000167325	RRM1	-0.194	mRNAs
ENSG00000113068	PFDN1	0.190	mRNAs	ENSG00000186350	RXRA	-0.098	mRNAs e TF
ENSG00000164708	PGAM2	0.422	mRNAs	ENSG00000196218	RYS1	-0.344	mRNAs
ENSG00000126461	SCAF1	0.167	mRNAs	ENSG00000182095	TNRC18	-0.094	mRNAs
ENSG00000187764	SEMA4D	0.293	mRNAs	ENSG00000147573	TRIM55	0.272	mRNAs
ENSG00000116560	SFPQ	-0.039	TFs	ENSG00000178952	TUFM	0.401	mRNAs
ENSG00000151729	SLC25A4	0.391	mRNAs	ENSG00000063244	U2AF2	0.212	mRNAs
ENSG00000181856	SLC2A4	-0.067	mRNAs	ENSG00000137073	UBAP2	0.017	mRNAs
ENSG00000170365	SMAD1	-0.062	mRNAs e TF	ENSG00000138629	UBL7	0.385	mRNAs
ENSG00000028528	SNX1	-0.061	mRNAs	ENSG00000127481	UBR4	-0.175	mRNAs
ENSG00000008294	SPAG9	-0.411	mRNAs	ENSG00000156467	UQCRB	0.402	mRNAs
ENSG00000263465	SRSF8	-0.046	mRNAs	ENSG00000173660	UQCRH	0.576	mRNAs
ENSG00000115415	STAT1	-0.412	mRNAs e TF	ENSG00000048028	USP28	-0.290	mRNAs
ENSG00000163541	SUCLG1	0.463	mRNAs	ENSG00000115464	USP34	-0.416	mRNAs
ENSG00000125755	SYMPK	0.064	mRNAs	ENSG00000160948	VPS28	0.411	mRNAs
ENSG00000131652	THOC6	0.300	mRNAs	ENSG00000069329	VPS35	-0.331	mRNAs

ENSG00000137076	TLN1	-0.155	mRNAs	ENSG00000124535	WRNIP1	0.223	mRNAs
ENSG00000178307	TMEM11	0.165	mRNAs	ENSG00000130227	XPO7	-0.324	mRNAs
ENSG00000174695	TMEM167A	0.264	mRNAs	ENSG00000108953	YWHAE	-0.102	mRNAs
ENSG00000137216	TMEM63B	-0.189	mRNAs	ENSG00000136247	ZDHHC4	0.243	mRNAs
ENSG00000177728	TMEM94	0.077	mRNAs	ENSG00000153786	ZDHHC7	0.101	mRNAs

CAPÍTULO 4 – Considerações finais

O delineamento deste estudo foi pensado e projetado para elucidar os efeitos obtidos no estudo anterior, amplamente citado neste trabalho (Pereira Junior, 2019), a exemplo principal do efeito sobre a maciez e gordura intramuscular da carne dos cordeiros. Neste estudo anterior, os animais entraram em confinamento mais leves, ou seja, mais cedo e por consequência demoraram mais tempo para atingir o peso de abate estabelecido pelo grupo de pesquisa (35 kg PC), que por sua vez está relacionado à limitação da movimentação dos animais dentro das baias de confinamento. Sendo assim, os animais tiveram um tempo maior de exposição ao melaço de soja, que pode ou não ter sido a razão para este estudo não ter obtido o mesmo resultado.

Outro ponto seria quanto a categoria sexual, por razões de escolha foi determinado machos inteiros e machos castrados, porém poderia perfeitamente ter sido realizado com borregas, fêmeas possuem maturação sexual mais precoce e por consequência iniciam também o acabamento de carcaça mais cedo, sem a necessidade de recuperação pós cirurgia para o início do experimento. O que proporcionaria mais dias de cocho e exposição ao potencial efeito do subproduto.

No atual estudo, tivemos limitação de mão de obra no momento de abate, por ocorrência da pandemia, impedindo uma possível coleta de gordura visceral para avaliação e assim se obter mais informações quanto ao efeito lipogênico do MSO. Um possível adicional também seria a análise do perfil de expressão gênica do tecido hepático, local que demonstraria com exatidão as diferenças metabólicas que há entre o amido e os carboidratos solúveis do melaço de soja.