

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E  
VETERINÁRIAS  
CAMPUS JABOTICABAL**

**DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA,  
QUALIDADE DA CARNE E ANÁLISE DO PROTEOMA DE  
BOVINOS CRUZADOS F1 MONTANA-NELORE  
SUPLEMENTADOS COM VITAMINA A**

**Rayssa Santucci Scapol**  
Zootecnista

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS JABOTICABAL**

**DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA,  
QUALIDADE DA CARNE E ANÁLISE DO PROTEOMA  
DE BOVINOS CRUZADOS F1 MONTANA-NELORE  
SUPLEMENTADOS COM VITAMINA A**

**Raysssa Santucci Scapol**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Artur Loyola**

**Chardulo**

**Coorientador: Prof. Dr. Welder Angelo**

**Baldassini**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

S284d

Scapol, Rayssa Santucci

Desempenho, Característica de Carcaça, Qualidade da Carne e Análise do Proteoma de Bovinos Cruzados F1 Montana-Nelore Suplementados com Vitamina A / Rayssa Santucci Scapol. -- Jaboticabal, 2023

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Luis Artur Loyola Chardulo

Coorientador: Welder Angelo Baldassini

1. Ácido retinoico. 2. Adipogênese. 3. Confinamento. 4. Força de cisalhamento. 5. Lipogênese. 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.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, QUALIDADE DA CARNE E ANÁLISE DO PROTEOMA DE BOVINOS CRUZADOS F1 MONTANA-NELORE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA A

**AUTORA: RAYSSA SANTUCCI SCAPOL**

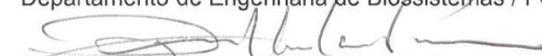
**ORIENTADOR: LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO**

**COORDENADOR: WELDER ANGELO BALDASSINI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Participação Presencial)  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

  
Prof. Dr. FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS (Participação Presencial)  
Departamento de Engenharia de Biosistemas / FCE UNESP Tupã

  
Prof. Dr. GUILHERME LUIS PEREIRA (Participação Presencial)  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 01 de março de 2023

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

RAYSSA SANTUCCI SCAPOL – Nascida em 30 de dezembro de 1992, na cidade de Botucatu (SP), filha de Mauro Santos Scapol e Lilian Aparecida Santucci Scapol. Em dezembro de 2019 obteve o título de Zootecnista pela Faculdade Eduvale de Avaré. Em agosto de 2020 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (UNESP), Campus Jaboticabal, como bolsista FAPESP, sob orientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo e Coorientação do Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

## **Dedico...**

Aos meus pais Lilian Ap. Santucci Scapol e Mauro Santos Scapol por serem o alicerce da minha caminhada, sempre me ensinando e incentivando. Obrigada por todo carinho e amor!

A toda a minha família! Por toda a força e descontração. É muito bom ter vocês nessa jornada!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter pegado em minhas mãos e me conduzido durante toda essa trajetória. Pela fé que me ensinaste a ter e a nunca desistir.

Aos meus pais Lilian e Mauro pelo apoio nos momentos difíceis, me ofertando força, confiança, amor, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando a alcançá-los.

A minha irmã Rachelle pelo carinho, companheirismo e por sempre torcer pelas minhas conquistas.

A minha avó Rosalina, pelas orações, amor, atenção, preocupação e pelo exemplo de mulher forte e guerreira que eu quero seguir.

Aos meus tios Lucimara e Leandro e minha prima Caroline pelos conselhos, por sempre estarem presentes e por torcerem por mim.

Ao meu namorado Leonardo por estar sempre presente nos bons e maus momentos, me confortando e ajudando a superar as dificuldades com confiança, amor, incentivo e por sempre acreditar no meu trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo, e ao coorientador Welder Angelo Baldassini, pela oportunidade, incentivo e ensinamentos.

À Prof. Dra. Juliana Akamine Torrecilhas, pelas conversas, ideias, sugestões, paciência e ajuda neste trabalho.

À Prof. Dra. Jéssica Moraes Malheiros, pela amizade sincera, pois, mesmo distante, nunca mediu esforços para me ajudar sempre que precisei, acreditando, confiando e torcendo por mim.

À Prof. Dra. Mirele Daiane Poleti, pela parceria e por ter cedido o laboratório para a análise de proteômica.

Aos amigos e colegas Murilo Tagiariolli, Rafaela Rodrigues, Juliana Torrecilhas, Irene Alexandre, Flabiele Soares, Camila Pereira, Maria Júlia Ganga e Ariane Enara, pela convivência agradável no laboratório e por serem companheiros nas horas fáceis e difíceis. A vocês, a gratidão pela amizade, pelo convívio, pelos churrascos e todos os momentos compartilhados.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos (Processo nº 2020/11300-9).

## SUMÁRIO

## Página

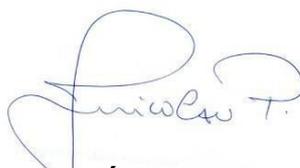
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
1.1 Introdução .....	13
1.2 Revisão de literatura .....	14
1.2.1 <i>Pecuária de corte no Brasil</i> .....	14
1.2.2 <i>Suplementação com vitamina A</i> .....	15
1.2.3 <i>Proteômica na qualidade da carne</i> .....	18
Referências bibliográficas .....	22
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO MÚSCULO E DA CARNE DE BOVINOS CRUZADOS QUE RECEBERAM SUPLEMENTAÇÃO VIA APLICAÇÃO DE VITAMINA A PÓS-NATAL.....	27
2.1 Introdução .....	30
2.2 Material e métodos.....	31
2.2.1 <i>Produção dos animais</i> .....	31
2.2.2 <i>Abate, característica de carcaça e qualidade de carne</i> .....	32
2.2.3 <i>Coleta de amostras do músculo Longissimus thoracis para análises laboratoriais</i> .....	32
2.2.4 <i>Composição química da carne</i> .....	33
2.2.5 <i>Perda por cocção e força de cisalhamento</i> .....	33
2.2.6 <i>Coloração instrumental da carne</i> .....	34
2.2.7 <i>Proteoma do tecido muscular</i> .....	34
2.2.8 <i>Extração de proteínas</i> .....	35
2.2.9 <i>Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)</i> .....	35
2.2.10 <i>Visualização das proteínas</i> .....	36
2.2.11 <i>Análise das Imagens</i> .....	37
2.2.12 <i>Espectrometria de massas (ESI-MS/MS)</i> .....	37
2.2.13 <i>Análises estatísticas</i> .....	38
2.3 Resultados .....	39
2.3.1 <i>Características de carcaça e qualidade da carne</i> .....	39
2.3.2 <i>Proteoma do tecido muscular</i> .....	41
2.4 Discussão.....	52
2.4.1 <i>Características de carcaça e qualidade da carne</i> .....	52
2.4.2 <i>Proteoma do tecido muscular</i> .....	54
2.5 Conclusão .....	57
Referências bibliográficas .....	58

# ATESTADO

**Atesto** que o Projeto "QUALIDADE DE CARNE E EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA ADIPOGÊNESE EM NOVILHOS QUE RECEBERAM VITAMINA A AO NASCIMENTO" **Protocolo CEUA 0107/2018**, a ser conduzido por Mateus Silva Ferreira, responsável/orientador Otávio Rodrigues Machado Neto, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

<b>Finalidade</b>	PESQUISA CIENTÍFICA
<b>Vigência do projeto</b>	01/01/2019 a 10/03/2020
<b>Nome Comum / Espécie / Linhagem</b>	BOVINA / BOS INDICUS /
<b>Raça</b>	F1 NELORE-MONTANA
<b>Nº de animais machos</b>	14
<b>Nº de animais fêmeas</b>	14
<b>Nº de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Peso médio de animais machos</b>	60
<b>Peso médio de animais fêmeas</b>	50
<b>Peso médio de animais sexo indefinido</b>	0
<b>Idade</b>	0 ano(s) e 1 mes(es) e 10 dia(s).
<b>Procedência</b>	Rebanho da FMVZ-UNESP-Botucatu

**Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 21/06/2018**



**JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO**  
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

## DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, QUALIDADE DA CARNE E ANÁLISE DO PROTEOMA DE BOVINOS CRUZADOS F1 MONTANA-NELORE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA A: RELAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE CARNE

**RESUMO** – O presente trabalho objetivou descrever alterações na expressão de proteínas no tecido muscular e seus impactos sobre deposição de gordura intramuscular, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos cruzados que receberam injeção intramuscular de vitamina A após o nascimento. Quarenta bezerros machos, cruzados (F1 Montana × Nelore) foram utilizados desde o nascimento até a fase de terminação em confinamento (vitamina A versus controle). No dia do nascimento, vinte bezerros do tratamento com vitamina A (vit.A) receberam uma dose de 300.000 Unidades Internacionais (UI) via injeção intramuscular. Após o desmame, aos 210 dias, os animais de ambos os tratamentos foram levados ao confinamento e alojados em baias individuais. O abate dos animais ocorreu após 180 dias de confinamento em frigorífico comercial. Foram mensuradas na carcaça peso da carcaça quente (PCq), rendimento total da carcaça quente (RCq), peso da carcaça fria (PCf) e rendimento de carcaça fria (RCf). O músculo *Longissimus thoracis* (LT) foi separado entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas da meia carcaça esquerda do restante da carcaça e antes de ser desossado foi avaliado a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL). Na linha de abate (carcaça quente) foram coletadas amostras da meia carcaça esquerda de todos os animais entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para as análises de biologia molecular (eletroforese bidimensional em gel de poliacríamida e espectrometria de massas). Após período de resfriamento em câmara fria (24h), também foram coletadas amostras do músculo LT de todos os animais entre as 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas da meia carcaça esquerda para a condução de análises físico-químicas de qualidade como cor ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), maciez (FC) e perdas por cocção (PPC). Não houve diferenças entre as características de carcaça de crescimento (PCQ e AOL) e acabamento (EGS) avaliadas ( $P > 0,05$ ). As carnes dos animais que receberam vit.A apresentaram uma tendência ( $P = 0,07$ ) de carne mais macia em comparação ao controle aos 3 dias de maturação. A cor e as PPC da carne não foram afetadas ( $P > 0,05$ ). No tratamento vit.A versus controle foram observados maiores teores de gordura intramuscular ( $P <$

0,05). Por meio de estudo de imagem dos géis, identificou-se 78 *spots* proteicos correspondentes a 17 proteínas diferencialmente expressas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. Após a caracterização das proteínas e estudos de bioinformática, verificou-se que a injeção intramuscular com vit.A afetou o proteoma e a interação proteína-proteína no músculo LT. Observou-se maior abundância de proteínas do metabolismo energético (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1, CKM e COX5A), contração muscular (ACTB, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTA1, ACTA2, ACTN1, ACTN2, ACTN3, TPM1, TPM2, TPM3, MYH1, PDLIM3 e TNNT3), proteínas de choque térmico (DNAJC18), ligação proteica, transporte e sinalização (TUBA4A, VIM, TBA1B e EEF1A2) no tratamento com vit.A. Assim, a maior abundância dessas proteínas em resposta à injeção intramuscular de vit. A pós-natal contribuiu para melhores características de qualidade da carne em bovinos cruzados terminados em confinamento.

**Palavras-chave:** Ácido retinoico, adipogênese, confinamento, força de cisalhamento, lipogênese, nutrigenômica

## PERFORMANCE, CARCASS CHARACTERISTICS, MEAT QUALITY AND PROTEOME ANALYSIS OF F1 MONTANA-NELORE CROSSBRED CATTLE SUPPLEMENTED WITH VITAMIN A: RELATIONSHIPS WITH MEAT QUALITY TRAITS

**ABSTRACT** – This study aimed to describe changes in protein expression in muscle tissue and their impact on intramuscular fat deposition, carcass traits and meat quality of crossbred cattle that received intramuscular injection of vitamin A after birth. Forty male, crossbred (F1 Montana × Nellore) calves were used from birth to finishing in feedlot (vitamin A versus control). On the day of birth, twenty calves from the vitamin A (vit.A) treatment received a dose of 300,000 International Units (IU) via intramuscular injection. After weaning, at 210 days, the animals from both treatments were taken to feedlot and housed in individual stalls. The animals were slaughtered after 180 days of confinement in a commercial slaughterhouse. Hot carcass weight (PCq), total hot carcass yield (RCq), cold carcass weight (PCf) and cold carcass yield (RCf) were measured on the carcass. The Longissimus thoracis (LT) muscle was separated between the 12th and 13th ribs of the left half carcass from the rest of the carcass and before being boned, the subcutaneous fat thickness (EGS) and the ribeye area (AOL) were evaluated. On the slaughter line (hot carcass) samples were collected from the left half carcass of all animals between the 12th and 13th ribs for molecular biology analyzes (two-dimensional electrophoresis in polyacrimide gel and mass spectrometry). After a period of cooling in a cold chamber (24h), samples of the LT muscle were also collected from all animals between the 12th and 13th ribs of the left half carcass to conduct physicochemical analyzes of quality such as color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), softness (FC) and cooking losses (PPC). There were no differences between growth (PCQ and AOL) and finishing (EGS) carcass traits evaluated ( $P > 0.05$ ). Meat from animals that received vit.A showed a tendency ( $P = 0.07$ ) for meat to be more tender compared to the control at 3 days of aging. Meat color and PPC were unaffected ( $P > 0.05$ ). In the vit.A treatment versus control, higher levels of intramuscular fat were observed ( $P < 0.05$ ). Higher levels of intramuscular fat ( $P < 0.05$ ) were observed in the vitamin A treatment versus control (4.10 vs.  $2.57 \pm$

0.27%). By means of imaging the gels, 78 protein spots corresponding to 17 differentially expressed proteins ( $P < 0.05$ ) were identified between treatments. After protein characterization and bioinformatics studies, it was found that intramuscular injection with vitamin A affected the proteome and protein-protein interaction in LT muscle. There was a greater abundance of energy metabolism proteins (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1, CKM and COX5A), muscle contraction (ACTB, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTA1, ACTA2, ACTN1, ACTN2, ACTN3, TPM1, TPM2, TPM3, MYH1, PDLIM3 and TNNT3), heat shock proteins (DNAJC18), protein binding, transport and signaling (TUBA4A, VIM, TBA1B and EEF1A2) in response to vitamin A. Thus, the increased expression of these proteins in response to intramuscular injection of postnatal vitamin A contributed to better meat quality traits in crossbred cattle finished in feedlot.

**Keywords:** Retinoic acid, adipogenesis, carcass, shear force, lipogenesis, nutrigenomics

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** *Spots* de proteínas selecionados para caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise das imagens. Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Amostras de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore do grupo experimental controle.....43

**Figura 2:** *Spots* de proteínas selecionados para caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise das imagens. Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Amostras de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore do grupo experimental vitamina A.....44

**Figura 3:** Análise das interações proteína-proteína usando as proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore terminados do grupo experimental controle.....51

**Figura 4:** Análise das interações proteína-proteína usando as proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore terminados do grupo experimental vitamina A.51



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Características de carcaça de bovinos F1 Montana × Nelore suplementados ou não com vitamina A injetável ao nascimento e terminados em confinamento.....41
- Tabela 2:** Efeito da suplementação de vitamina A sobre a qualidade de carne de bovinos F1 Montana × Nelore.....41
- Tabela 3:** Efeito da suplementação ou não com vitamina A sobre a composição química da carne de bovinos F1 Montana × Nelore terminados em confinamento...42
- Tabela 4:** Proteínas diferencialmente expressas de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana × Nelore identificadas por espectrometria de massas no tratamento controle.....45
- Tabela 5:** Proteínas diferencialmente expressas de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana × Nelore identificadas por espectrometria de massas no tratamento vitamina A.....46

## CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

### 1.1 Introdução

A pecuária de corte brasileira, formada principalmente por animais zebuínos (*Bos indicus*) e cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*), possibilitou ao Brasil tornar-se o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne bovina (USDA, 2020). A utilização do cruzamento industrial, realizado entre duas raças com características complementares, tem sido utilizado como estratégia para obter animais com melhor desempenho, características de carcaça e qualidade de carne.

O mercado de carnes está se esforçando cada vez mais para fornecer aos consumidores carnes com qualidade superior. Segundo Lyforda et al. (2010), os consumidores estão dispostos a pagar mais por uma carne com melhores características de qualidade. A baixa quantidade de gordura intramuscular na carne está associada a perdas de aspectos sensoriais, como suculência e maciez, o que impacta a percepção e a aprovação do consumidor (WYRWISZ et al., 2016). Diante disso, a utilização de animais cruzados é uma das estratégias adotadas pelos produtores para a produção de carne com mais gordura intramuscular e melhor maciez, agregando valor ao produto final e permitindo atender demandas de mercados especializados em carne de melhor qualidade.

Adicionalmente, estratégias nutricionais têm sido empregadas para aumentar a produção de adipócitos e elevar a deposição de gordura intramuscular, com o objetivo de melhorar a qualidade do produto. Estudos recentes apontam o uso da vitamina A intramuscular em bezerros jovens como uma estratégia capaz de aumentar a adipogênese e, posteriormente, a lipogênese intramuscular sem prejuízos em desempenho animal e crescimento do tecido muscular esquelético (BAZILE et al., 2019; DU et al., 2017; KRUK et al., 2018; WANG et al., 2016). Em trabalho com bovinos de corte, Harris et al. (2018) testaram a utilização de duas doses (injeções) intramusculares de vitamina A em bezerros Aberdeen Angus (*Bos taurus*), ao nascimento e aos 30 dias de idade, percebendo que animais receptores de vitamina A apresentaram maior teor de gordura intramuscular.

Desta forma, hipotetizou-se que a injeção de vitamina A logo após o

nascimento pode aumentar a gordura intramuscular em animais cruzados (*Bos taurus* × *Bos indicus*) terminados em confinamento, o que pode estar relacionado ao aumento da abundância de proteínas no tecido muscular que regula os processos de adipogênese e lipogênese.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação intramuscular de vitamina A logo após o nascimento sobre o proteoma do músculo *Longissimus thoracis* e a qualidade da carne de bovinos F1 Montana × Nelore.

## 1.2 Revisão de literatura

### 1.2.1 Pecuária de corte no Brasil

O Brasil se destaca como um dos líderes mundiais na produção e na comercialização de carne bovina, resultado de um sistema estruturado e bem desenvolvido que tem aumentado significativamente a produtividade e melhorado a qualidade do produto oferecido (NAVOLAR et al., 2018).

O rebanho brasileiro é formado principalmente por animais zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos. Os animais *Bos indicus* geralmente são relatados por não apresentarem carne macia quando comparados a bovinos da subespécie *Bos taurus* (LAGE et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Esse quesito diminui a atratividade da carne de animais zebu, pois os consumidores consideram a maciez uma das características de palatabilidade mais importantes (FONT-I-FURNOL; GUERRERO, 2014). Dessa forma, o baixo teor de gordura intramuscular, ou marmoreio, está associado a uma experiência não tão positiva no consumo da carne devido à gordura intramuscular ser uma importante característica para o desenvolvimento do sabor, da suculência e da maciez da carne (DODSON et al., 2010).

Diante disso, estratégias nutricionais e a crescente utilização de animais cruzados para a produção de carne têm sido propostas visando aumentar o grau de deposição de gordura intramuscular, características de carcaça e melhor maciez,

buscando agregar valor ao produto e atender demandas de mercados especializados em carne de melhor qualidade. A deposição de gordura intramuscular na carne pode influenciar positivamente os atributos sensoriais, incluindo gosto, sabor, suculência e maciez (HOCQUETTE et al., 2010). Do contrário, com menor quantidade de gordura intramuscular (marmorização), observa-se prejuízo sobre aspectos sensoriais, como suculência e maciez.

O marmoreio se desenvolve por meio de um aumento no número de células adiposas (hiperplasia), um aumento no tamanho das células adiposas (hiperplasia) ou uma combinação de ambos os processos (CIANZIO et al., 1985). A hiperplasia, ou seja, o aumento do número de células por meio de seu recrutamento na linhagem adipogênica, é mais acentuada no tecido adiposo intramuscular desde o final da gestação até os 250 dias de idade (DU et al., 2017). O uso de nutrientes dietéticos que possam impulsionar a produção de adipócitos nesse período se demonstra como alternativa viável para aumentar o teor de gordura intramuscular nos animais.

Nesse contexto, a vitamina A aparece como um regulador-chave da expressão gênica e proteica influenciando a adipogênese e o metabolismo lipídico nos tecidos animais (CAMPOS et al., 2020). A vitamina A é capaz de provocar alterações no recrutamento de células indiferenciadas durante os estágios iniciais da vida de um bovino por meio de seu metabólito, o ácido retinoico, fazendo com que haja maior direcionamento dessas células para a linhagem adipogênica, especialmente para os adipócitos intramusculares (HARRIS et al., 2018). No entanto, ainda não existem estudos que relatem a maciez da carne e investiguem a abundância de proteínas induzidas pela vitamina A em bovinos que receberam injeção intramuscular de vitamina A após o nascimento. Além disso, são poucos os estudos que retratam as características de qualidade da carne. Nesse sentido, tornam-se necessárias mais pesquisas para determinar o efeito da vitamina A nas análises físico-químicas e proteômicas.

### *1.2.2 Suplementação com vitamina A*

Revisando os efeitos da vitamina A na qualidade da carne de bovinos, pesquisadores da Universidade de Illinois – Urbana (EUA) destacaram os possíveis mecanismos regulatórios de diferenciação de adipócitos em resposta à suplementação com vitamina A e D (PYATT; BERGER, 2005). Estes autores reportaram que as concentrações séricas de retinol ou ácido retinoico na fase de terminação de novilhos foram negativamente correlacionadas com o escore de marmoreio, tal como anteriormente observado por Oka et al. (1998).

Nesse contexto, outro estudo utilizou novilhos Angus alimentados com ração com baixa concentração de  $\beta$ -caroteno e vitamina A durante 308 dias de confinamento (KRUK et al., 2008). Neste, dez animais foram suplementados com vitamina A (60 UI / 100 kg de peso corporal/dia) e comparados a um grupo controle. Os resultados desse estudo demonstraram que a restrição da ingestão de vitamina A mudou a deposição intramuscular de gordura sem alterar os depósitos de gordura subcutânea.

Em outra pesquisa com bovinos Limousin suplementados com vitamina A na terminação (0,1100, 2200 4400IU/kg MS dietética) não foram encontrados efeitos sobre a gordura intramuscular avaliada nos músculos *Gluteos medius* e *Longissimus thoracis* (WANG et al., 2007). Nenhum mecanismo de sinalização celular foi investigado ou proposto nos estudos de Kruk et al. (2008) e Wang et al. (2007).

Espera-se que ao promover maior formação de adipócitos intramusculares ocorra maior acúmulo de lipídeos e, conseqüentemente, maior escore de marmoreio. No entanto, as vias de sinalização celular desses processos ainda não foram completamente descritas na literatura. No estudo de Duarte et al. (2013) foram comparados bovinos Wagyu e Angus, sendo reportado que animais com maior teor de gordura intramuscular apresentaram maior expressão do fator de transcrição *Zinc finger protein 423* (Zfp423), que induziu a adipogênese e regulou positivamente a expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma (PPARG). Além disso, esses animais apresentaram maior expressão do *CCAAT/enhancer-binding proteins beta* (C/EBPB) e da *fatty acid binding protein 4* (FABP4), levando a uma maior densidade de pré-adipócitos e adipócitos diferenciados.

Em bovinos na fase de terminação, é possível constatar, pela maioria dos

trabalhos publicados, que a restrição de vitamina A pode melhorar o marmoreio da carne. No geral, quando excede as exigências nutricionais, a vitamina A parece prejudicar a hipertrofia dos adipócitos, o que pode reduzir o marmoreio da carne. As dietas típicas de confinamentos contêm excesso de vitamina A devido à quantidade presente nos grãos de cereais e núcleos comerciais. O sistema americano NRC descreve que as exigências de vitamina A para bovinos de corte confinados, com idade superior a 12 meses, é de 2205 UI/kg MS dietética ou menos (NASEM, 2016).

Contudo, os resultados da suplementação com vitamina A são diferentes ou controversos entre as fases de crescimento e terminação de bovinos. Isso possivelmente ocorre porque a densidade de células multipotentes (células-tronco embrionárias) é reduzida quase que linearmente do nascimento aos 210 dias de idade dos bovinos (DU et al., 2017). Sabe-se que, em teoria, só é possível modular o número de adipócitos intramusculares em três momentos da vida do animal: i) pré-natal/terço final da gestação; ii) ao nascimento do bezerro; e iii) durante a fase de crescimento (normalmente até 210 dias de idade).

A estratégia de suplementar vitamina A na fase pós-natal (logo após o nascimento) visando aumento da gordura intramuscular parece ter mais relação com o aumento do número de adipócitos (efeito hiperplásico) do que com o tamanho destes (KRUK et al., 2018). Nesse contexto, o ácido retinoico pode aumentar o recrutamento de células indiferenciadas para a linhagem adipogênica (para que se tornem adipócitos). Adicionalmente, a vitamina A na fase de cria, em animais jovens, pode também modular o tipo de fibra muscular, alterando a expressão das miosinas de cadeia pesadas (MyHC), conforme reportado na literatura (KIM et al., 2018).

A vitamina A é absorvida pelos animais e convertida em ácido retinoico (RA). O RA é transportado pela proteína de ligação celular do ácido retinoico II (CRABP-II) e se liga ao receptor de ácido retinoico (RAR). A vitamina A e o RA são importantes reguladores da diferenciação celular e da morfogênese dos órgãos. Seu impacto no crescimento muscular de bovinos permanece indefinido (WANG et al., 2018). Já o RAR funciona como heterodímero com o receptor retinoide X (RXR), que se ligam a elementos específicos nas regiões promotoras dos genes alvo (DEL MAR VIVANCO-RUIZ et al., 1990; SHAW et al., 2003), como, por exemplo, o fator de transcrição Zfp423, estimulando sua expressão (GUPTA et al., 2012; WANG et al.,

2016). Em estudo recente que avaliou a administração de vitamina A em bezerros Aberdeen Angus (WANG et al., 2018), os autores descreveram aumento do crescimento muscular pós-natal dos animais, promovendo a miogênese e aumentando a densidade de células satélites, acompanhada de uma mudança para as fibras musculares oxidativas.

Entretanto, a administração de vitamina A em animais tem sido pouco investigada, embora haja evidências do seu papel na alteração da adipogênese (WANG et al., 2016). Em trabalho com bovinos de corte, Harris et al. (2018) testaram a utilização de duas doses (injeções) intramusculares de vitamina A em bezerros Aberdeen Angus (*Bos taurus*), ao nascimento e aos 30 dias de idade, e encontraram que animais receptores de vitamina A apresentaram maior teor de gordura intramuscular, o que parece estar associado às alterações na expressão gênica, principalmente de fatores de transcrição. Assim, são escassas as investigações dos efeitos da vitamina A sobre a fisiologia de bezerros que serão destinados ao abate, sobretudo em animais constituídos de genética zebuína e suplementados com dieta rica em energia e proteína na fase de cria.

Ainda existe uma grande lacuna no tocante ao papel do ácido retinoico sobre mecanismos moleculares do tecido muscular bovino. Inexistem experimentos que investiguem os efeitos da suplementação de vitamina A (injetável) e as possíveis alterações dos mecanismos moleculares (i.e., abundância de proteínas) responsáveis pela maior deposição de gordura intramuscular em bovinos machos terminados em confinamento.

### *1.2.3 Proteômica na qualidade da carne*

A proteômica corresponde à área de estudos de proteínas de um tecido quando são colhidas as amostras. Metodologicamente, os procedimentos separam e identificam proteínas, o que permite ao pesquisador comparar grupos extremos para características de interesse econômico, como deposição de gordura intramuscular,

maciez, cor, descrevendo moléculas como biomarcadores que possibilitem o entendimento da ocorrência dos diferentes fenótipos estudados (BJARNADÓTTIR et al., 2012; MAO et al., 2016; PICARD; GAGAOUA, 2017; PICARD et al., 2018).

Estudos proteômicos incluem técnicas que permitem visualizar e analisar milhares de proteínas em determinado tempo. Entre essas técnicas destaca-se a eletroforese bidimensional (2D), em que a taxa de migração é influenciada pela carga proteica, forma, tamanho e associação com compostos ionizáveis no meio eletroforético, permitindo separar simultaneamente centenas de proteínas (RABILLOUD; LELONG, 2011). Sequencialmente, a caracterização das proteínas identificadas pode ser realizada por meio da espectrometria de massa, que, quando combinada à eletroforese bidimensional, a análises computacionais de imagens e base de dados, se tornam poderosas ferramentas para identificação e caracterização de proteínas em estudos proteômicos (ROCHA et al., 2005).

Os estudos buscam biomarcadores que possam ser utilizados em programas de melhoramento genético bovino ou identificados em respostas às estratégias nutricionais. Além disso, os biomarcadores podem fornecer suporte científico à indústria da carne e desenvolver estratégias para melhorar a qualidade da carne (PAREDI et al., 2012; OUALI et al., 2013; PICARD et al., 2015). Por meio da proteômica, é possível entender também os mecanismos moleculares envolvidos na deposição de tecido adiposo e identificar proteínas que são diferencialmente abundantes relacionadas ao tecido adiposo ou deposição de gordura intramuscular e podem ser usadas como biomarcadores. Entretanto, ainda há poucas análises proteômicas que foram publicadas para compreender ou prognosticar a capacidade bovina de depositar tecido adiposo nos níveis muscular e corporal total (CECILIANI et al., 2018).

Para animais da mesma raça, sexo, idade semelhante e alimentados com a mesma dieta, o conteúdo de gordura intramuscular é regulado por diferentes genes (POLETI et al., 2018). Shin e Chung (2016), em estudo com bovinos Hanwoo, relataram que o gene da triosefosfato isomerase 1 (TPI1) do grupo de animais com alto marmoreio foi altamente expresso, enquanto que o grupo de animais com baixo marmoreio, os genes troponina T tipo 1 (TNNT1), actina alfa 1 (ACTA1) e malato desidrogenase 2 (MDH2) foram altamente expressos. Em contraste, Mao et al.

(2016) revelaram que o gene TPI1 foi regulado negativamente no grupo de gordura intramuscular de bovinos cruzados Xiangxi × Angus. No estudo de Keady et al. (2013), foram encontrados três genes, enolase 3 (ENO3), piruvato quinase M2 (PKM2) e glicose fosfato isomerase (GPI), em maior abundância no músculo *longissimus* do grupo de novilhos Angus com maior conteúdo de gordura intramuscular.

Em estudo recente com bovinos cruzados, Severino et al., (2022) relataram a abundância das proteínas de transporte (ALVA e GLNG), metabolismo de carboidratos (ALDOA, GAPDH, PKM, CA3), defesa celular (HSPA8) e glicogenólise (PYGM e PGM1), relacionados à maior eficiência energética e melhor resposta ao estresse. Nesse estudo, a alteração na abundância dessas proteínas e vias metabólicas ajudou a explicar o maior teor de gordura intramuscular encontrado na carne das novilhas.

Gagaoua, Bonnet e Picard (2020) identificaram biomarcadores de proteínas para explicar a variação de duas importantes características de qualidade da carne de vacas Rouge des Prés, maciez e gordura intramuscular. Sete proteínas foram relacionadas a ambas as características: ALDH1A1, CRYAB, HSP27, HSP20, MYH1, FHL1 e MDH1. Essas proteínas pertencem à superfamília de proteínas de choque térmico, metabolismo energético (especialmente a via oxidativa) e proteínas estruturais (incluindo FHL1), desempenhando papéis na morte celular, metabolismo e regulação da homeostase do cálcio. Os autores sugerem que essas descobertas destacam ainda mais a existência de semelhanças nas vias biológicas que sustentam a maciez e a determinação do marmoreio.

Campos et al. (2020) avaliaram animais que receberam suplementação de vitamina A na fase de engorda e reportaram mudanças nos níveis de duas HSPs. Os autores revelaram que os animais não suplementados com vitamina A apresentaram maior abundância de HSP70-2 e HSBP1 em comparação com os animais suplementados com vitamina A. O papel da HSP70 é auxiliar no dobramento de polipeptídeos recém-sintetizados ou proteínas mal dobradas, a montagem de complexos multiproteicos e no transporte de proteínas por meio das membranas celulares (CAMPOS et al., 2020). Diante disso, os autores sugerem com os resultados obtidos que a suplementação de vitamina A na fase de terminação pode

prejudicar a produção de HSP70 e, conseqüentemente, causar o comprometimento da deposição de gordura intramuscular. Até o momento não há estudos sobre a injeção intramuscular de vitamina A em bovinos de corte recém-nascidos utilizando-se a proteômica, visando elucidar as principais vias e proteínas que regulam a deposição de gordura intramuscular e maciez da carne. Essas pesquisas podem ajudar a entender melhor as possíveis alterações dos mecanismos moleculares que levam ao maior acúmulo de gordura intramuscular e menor força de cisalhamento em bovinos em resposta à vitamina A.

## Referências bibliográficas

BAZILE, J., PICARD, B., CHAMBON, C., VALAIS, A., BONNET, M., 2019. Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses. **Meat Sci.** 156, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.018>.

BJARNADÓTTIR, S.G., HOLLUNG, K., HØY, M., BENDIXEN, E., CODREA, M.C., VEISETH-KENT, E., 2012. Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine Longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. **J. Anim. Sci.** <https://doi.org/10.2527/jas.2011-472>.

CAMPOS, C. F., COSTA, T. C., RODRIGUES, R. T., GUIMARAES, S. E., MOURA, F. H., SILVA, W., ... SILVA, F. F. (2020). Proteomic analysis reveals changes in energy metabolism of skeletal muscle in beef cattle supplemented with vitamin A. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100(8), 3536–3543. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10401>.

CARVALHO ME, GASPARIN G, POLETI MD, ROSA AF, BALIEIRO JC, LABATE CA, NASSU RT, TULLIO RR, REGITANO LC, MOURÃO GB, COUTINHO LL. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Sci.** 2014 Mar;96(3):1318-24. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.11.014. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24342181.

CECILIANI, F., LECCHI, C., BAZILE, J., & BONNET, M. (2018). Proteomics research in the adipose tissue. *Proteomics in domestic animals: From farm to systems biology* (pp. 233–254). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69682-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69682-9_12).

CIANZIO, D. S.; TOPEL, D. G.; WHITEHURST, G. B.; BEITZ, D. C. et al. Adipose Tissue Growth and Cellularity: Changes in Bovine Adipocyte Size and Number. **Journal of Animal Science**, 60, n. 4, p. 970-976, 1985.

DEL MAR VIVANCO-RUIZ, M., TIOLLAIS, P., STUNNENBERG, H., DEJEAN, A., 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor & beta; gene. **Nature**. <https://doi.org/10.1038/343177a0>.

DODSON, M. V.; HAUSMAN, G. J.; GUAN, L.; DU, M. et al. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. **Int J Biol Sci**, 6, n. 7, p. 691-699, Nov 22 2010.

DU, M., FORD, S.P., ZHU, M.-J., 2017. Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Anim. Front.** <https://doi.org/10.2527/af.2017-0122>.

DUARTE, M.S., PAULINO, P.V.R., DAS, A.K., WEI, S., SERÃO, N.V.L., FU, X.,

HARRIS, S.M., DODSON, M. V., DU, M., 2013. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **J. Anim. Sci.** 91, 2938–2946. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5892>.

FONT-I-FURNOL, S. M. & GUERRERO, L. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. **Meat Science**, v. 98, p. 361-371, 2014.

GAGAOUA, M., BONNET, M., & PICARD, B. (2020). Protein array-based approach to evaluate biomarkers of beef tenderness and marbling in cows: Understanding of the underlying mechanisms and prediction. **Foods**, 9(9), 1180.

GUPTA, R.K., MEPANI, R.J., KLEINER, S., LO, J.C., KHANDEKAR, M.J., COHEN, P., FRONTINI, A., BHOWMICK, D.C., YE, L., CINTI, S., Spiegelman, B.M., 2012. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. **Cell Metab.** <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.010>.

HARRIS, C. L., WANG, B., DEAVILA, J. M., BUSBOOM, J. R., MAQUIVAR, M., PARISH, S. M., DU, M. Vitamin A administration at birth promotes calf growth and intramuscular fat development in Angus beef cattle. **Journal of animal science and biotechnology**, 9(1), 1-9. 2018.

HOCQUETTE, J.F., GONDRET, F., BAZA, E., MDALE, F., JURIE, C., PETHICK, D.W., 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal** 4, 303–319. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991091>.

KEADY, S. M., KENNY, D. A., OHLENDIECK, K., DOYLE, S., KEANE, M. G., & WATERS, S. M. (2013). Proteomic profiling of bovine M. longissimus lumborum from Crossbred Aberdeen Angus and Belgian Blue sired steers varying in genetic merit for carcass weight. **Journal of animal science**, 91(2), 654-665.

KIM, J., WELLMANN, K.B., SMITH, Z.K., JOHNSON, B.J., 2018. All-trans retinoic acid increases the expression of oxidative myosin heavy chain through the PPAR $\delta$  pathway in bovine muscle cells derived from satellite cells. **J. Anim. Sci.** 96, 2763–2776. <https://doi.org/10.1093/jas/sky155>.

KRUK Z., BOTTEMA C., DAVIS J., SIEBERT B., HARPER G., DI J., PITCHFORD W. Effects of vitamin A on growth performance and carcass quality in steers. **Livestock Science**, 119 (2008), pp. 12-21.

KRUK, Z. A., BOTTEMA, M. J., REYES-VELIZ, L., FORDER, R., PITCHFORD, W., & BOTTEMA, C. D. (2018). Vitamin A and marbling attributes: Intramuscular fat hyperplasia effects in cattle. **Meat Science**, 137, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.024>.

LAGE J. F.; PAULINO, P. V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, E. J. O.;

DUARTE, M. S.; BENEDETI, P. D. B.; SOUZA, N. K. P.; COX, R. B. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, v. 90, p. 770-774, 2012.

LYFORDA, C.; THOMPSONB, J.; POLKINGHORNEC, R.; MILLERD, M.; NISHIMURAE, T.; NEATHF, K.; ALLENG, P.; BELASCO, E. Is willingness to pay (WTP) for beef quality grades affected by consumer demographics and meat consumption preferences? *Australasian Agribusiness Review*. v18, 2010.

MAO, Y., HOPKINS, D.L., ZHANG, Y., LI, P., ZHU, L., DONG, P., LIANG, R., DAI, J., WANG, X., LUO, X., 2016. Beef quality with different intramuscular fat content and proteomic analysis using isobaric tag for relative and absolute quantitation of differentially expressed proteins. **Meat Sci.** 118, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.028>.

NAVOLAR, F. M. N.; DE PAULA, G. R.; PEREIRA, T. P. S.; CARVALHO, R. H. Bem-estar em animais de produção. *Ciência Veterinária UniFil*, v. 1, n. 2, 2018.

OKA A., MARUO Y., MIKI T., YAMASAKI T., SAITO T. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. **Meat Science**, 48 (1998), pp. 159-167.

OUALI A, GAGAOUA M, BOUDIDA Y, BECILA S, BOUDJELLAL A, HERRERAMENDEZ CH, ET AL. Biomarcadores de maciez da carne: conhecimento atual e perspectivas em relação ao nosso entendimento atual dos mecanismos envolvidos. **Ciência da Carne**. 2013;95:854–70. pmid:23790743.

PAREDI G, RABONI S, BENDIXEN E, DE ALMEIDA AM, MOZZARELLI A. Eventos moleculares “músculo para carne” e transformações tecnológicas: o insight da proteômica. **J Proteômica**. 2012;75:4275–89. pmid:22543183.

PEREIRA, A. S. C.; BALDI, F.; SAINZ, R. D.; UTEMBERGUE, B. L.; CHIAIA, H. L. J.; MAGNABOSCO, C. U.; MANICARDI, R.; ARAUJO, F. R. C.; GUESDES, C. F.; MARGARIDO, R. C.; LEME, P. R.; SOBRAL, P. J. A. Growth performance, and carcass and meat quality traits in progeny of Poll Nellore, Angus and Brahman sires under tropical conditions. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1295-1302, 2015.

PICARD, B., BONNET, M., VALAIS, A., GAGAOUA, M., DE KONING, L., ALJAMMAS, M., 2018. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect, **PeerJ. Elsevier B.V.** <https://doi.org/10.7717/peerj.4891>.

PICARD, B., GAGAOUA, M., 2017. Proteomic Investigations of Beef Tenderness. **Proteomics Food Sci**. From Farm to Fork 177–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4>.

PICARD B, LEBRET B, CASSAR-MALEK I, LIAUBET L, BERRI C, LE BIHANDUVAL E, ET AL. Avanços recentes em tecnologias ômicas para gestão da qualidade da carne. **Ciência da Carne**. 2015;109:18–26. pmid:26002117.

POLETI M. D., REGITANO L. C., SOUZA G. H., A.S. CESAR, R.C. SIMAS, B. SILVAVIGNATO, ET AL. Longissimus dorsi muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. **Journal of Proteomics**, 179 (2018), pp. 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.028>.

PYATT, N. A., AND L. L. BERGER. 2005. Potential Effects of Vitamins A and D on Marbling Deposition in Beef Cattle. Prof. **Anim. Sci.** Disponível: [http://www.findarticles.com/p/articles/mi\\_qa4035/is\\_200506/ai\\_n13643735](http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa4035/is_200506/ai_n13643735).

RABILLOUD, T. & LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of Proteomic**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.

ROCHA, J. C. M. C.; NEVES, M. F.; LOBO, R. B. "Experiências com alianças verticais na coordenação da cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. In: Congresso internacional de economia e gestão de redes agroalimentares. v. 4, 2003.

SEVERINO M, GAGAOUA M, BALDASSINI W, RIBEIRO R, TORRECILHAS J, PEREIRA G, CURI R, CHARDULO LA, PADILHA P, NETO OM. Proteomics Unveils Post-Mortem Changes in Beef Muscle Proteins and Provides Insight into Variations in Meat Quality Traits of Crossbred Young Steers and Heifers Raised in Feedlot. **Int J Mol Sci.** 2022 Oct 14;23(20):12259. doi: 10.3390/ijms232012259. PMID: 36293120; PMCID: PMC9603352.

SHAW, N., ELHOLM, M., NOY, N., 2003. Retinoic Acid is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator activated Receptor  $\beta/\delta$ . **J. Biol. Chem.** <https://doi.org/10.1074/jbc.C300368200>.

SHIN S., CHUNG E. Identification of differentially expressed genes between high and low marbling score grades of the longissimus lumborum muscle in Hanwoo (Korean cattle). **Meat Science**, 121 (2016), pp. 114 – 118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.05.018>.

USDA, 2020. In: Livestock and Poultry: World Markets and Trade. In United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service.

WANG, B., NIE, W., FU, X., DE AVILA, J.M., MA, Y., ZHU, M.J., MAQUIVAR, M., PARISH, S.M., BUSBOOM, J.R., NELSON, M.L., DU, M., 2018. Neonatal vitamin A injection promotes cattle muscle growth and increases oxidative muscle fibers. **J. Anim. Sci. Biotechnol.** 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0296-3>.

WANG, B., YANG, Q., HARRIS, C.L., NELSON, M.L., BUSBOOM, J.R., ZHU, M.J., DU, M., 2016. Nutrigenomic regulation of adipose tissue development — role of retinoic acid: A review. **Meat Sci.** 120, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.003>.

WANG, W.J., WANG, S.P., GONG, Y.S., WANG, J.Q., TAN, Z.L., 2007. Effects of vitamin A supplementation on growth performance, carcass characteristics and meat

quality in Limosin × Luxi crossbreed steers fed a wheat straw-based diet. **Meat Sci.** <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.019>.

WYRWISZ, J., MOCZKOWSKA, M., KUREK, M., STELMASIAK, A., PÓLTORAK, A. & WIERZBICKA, A. Influence of 21 days of vacuum-aging on color, bloom development, and WBSF of beef semimembranosus. **Meat Science**, v. 122, n., p.48-54, 2016.

## CAPÍTULO 2 – DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, QUALIDADE DA CARNE E ANÁLISE DO PROTEOMA DE BOVINOS CRUZADOS F1 MONTANA-NELORE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA A

**Resumo** - Objetivou-se avaliar o proteoma do tecido muscular de bovinos cruzados que receberam aplicação intramuscular de vitamina A pós-natal e seus impactos sobre características de carcaça e qualidade da carne. Quarenta bezerros machos, cruzados (F1 Montana x Nelore) foram utilizados desde o nascimento até a fase de terminação em confinamento (vitamina A versus controle). No dia do nascimento, vinte bezerros do tratamento com vitamina A (vit.A) receberam uma dose de 300.000 Unidades Internacionais (UI) via injeção intramuscular. Após o abate em frigorífico comercial foram mensuradas características de carcaça como peso, rendimento, espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL). Logo após o abate (carcaça quente) foram coletadas amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT) para as análises de biologia molecular (eletroforese bidimensional em gel de poliácridamida e espectrometria de massas). Na desossa, amostras do LT entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas foram coletadas para análises físicas de qualidade como coloração instrumental da carne, força de cisalhamento (FC) e perdas por cocção (PPC). A injeção intramuscular de vit.A não impactou nas características de carcaça de crescimento (PCQ e AOL), acabamento (EGS) e nas análises físicas de qualidade (cor e PPC). Uma tendência ( $P=0,07$ ) de carne mais macia foi observada nos animais que receberam vitamina A em comparação ao controle ( $FC = 53,1$  vs.  $58,7 \pm 2,14$  N) aos 3 dias de maturação. Maiores teores de gordura intramuscular ( $P<0,05$ ) foram observados no tratamento vitamina A versus controle ( $4,10$  vs.  $2,57 \pm 0,27\%$ ). Após a caracterização das proteínas e estudos de bioinformática, verificou-se que a injeção intramuscular com vitamina A afetou o proteoma e a interação proteína-proteína no músculo LT. A maior expressão das proteínas do metabolismo energético (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1 e CKM), contração muscular (ACTA1, ACTB, ACTG1, TPM2, MYH1 e TNNT3), ligação proteica, transporte e sinalização (TUBA4A) e alterações no proteoma do tecido muscular em resposta a injeção intramuscular de vitamina A pós-natal contribuiu para melhores características de qualidade da carne em bovinos cruzados terminados em confinamento.

**Palavras-chave:** Acido retinoico, adipogênese, confinamento, lipogênese, 2D-PAGE.

## PERFORMANCE, CARCASS CHARACTERISTICS, MEAT QUALITY AND PROTEOME ANALYSIS OF F1 MONTANA-NELORE CROSSBRED CATTLE BOVINE SUPPLEMENTED WITH VITAMIN A

**Abstract** - The objective was to evaluate the muscle tissue proteome of crossbred cattle that received intramuscular application of postnatal vitamin A and its impacts on carcass traits and meat quality. Forty male, crossbred (F1 Montana × Nelore) calves were used from birth to finishing in feedlot (vitamin A versus control). On the day of birth, twenty calves from the vitamin A (vit.A) treatment received a dose of 300,000 International Units (IU) via intramuscular injection. After slaughter in a commercial slaughterhouse, carcass characteristics such as weight, yield, subcutaneous fat thickness (EGS) and ribeye area (AOL) were measured. Shortly after slaughter (hot carcass) samples of the Longissimus thoracis (LT) muscle were collected for molecular biology analysis (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry). At deboning, TL samples between the 12th and 13th ribs were collected for physical quality analyzes such as instrumental meat color, shear force (FC) and cooking losses (PPC). The intramuscular injection of vit.A did not affect carcass growth characteristics (PCQ and AOL), finishing (EGS) and physical quality analyzes (color and PPC). A tendency ( $P=0.07$ ) for more tender meat was observed in animals that received vitamin A compared to the control ( $FC = 53.1$  vs.  $58.7 \pm 2.14$  N) at 3 days of maturation. Higher levels of intramuscular fat ( $P<0.05$ ) were observed in the vitamin A treatment versus control ( $4.10$  vs.  $2.57 \pm 0.27\%$ ). After protein characterization and bioinformatics studies, it was found that intramuscular injection of vitamin A affected the proteome and protein-protein interaction in the LT muscle. Increased expression of energy metabolism proteins (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1 and CKM), muscle contraction (ACTA1, ACTB, ACTG1, TPM2, MYH1 and TNNT3), protein binding, transport and signaling (TUBA4A) and changes in Muscle tissue proteome in response to intramuscular injection of postnatal vitamin A contributed to improved meat quality traits in feedlot finished crossbred cattle.

**Keywords:** Retinoic acid, adipogenesis, confinement, lipogenesis, 2D-PAGE.

## 2.1 Introdução

A exigência dos consumidores é um aspecto perceptível na relação entre produção e consumo. Dessa forma, as demandas do mercado por produtos cárneos com alto valor nutricional e características de qualidade são fundamentais (MWANGI et al., 2019). A maciez é considerada a característica mais importante da qualidade da carne; no entanto, os consumidores também avaliam outras características, como a cor, o marmoreio, o tamanho do corte, o teor de gordura intramuscular, a subcutânea e a palatabilidade (MALHEIROS et al., 2020).

Além disso, devido a melhorias nos padrões de vida das pessoas e nos níveis de consumo, a demanda por carne de alta qualidade aumentou (WAN et al., 2016). Para Senra, Bánkuti e Vieira (2021), os resultados dos principais aspectos considerados pelos consumidores mostram uma avaliação das seguintes características da carne bovina: aparência, teor de gordura, local de compra (estabelecimento), preço e tipo de armazenamento.

A gordura intramuscular, ou marmoreio, é um critério importante na determinação de parâmetros que contribuem para a qualidade da carne, como suculência e sabor, sendo relacionada à maciez da carne, uma das características fundamentais de qualidade em sistemas internacionais de classificação (ALVES; MANCIO, 2007). Portanto, aumentar o grau de deposição de tecido adiposo intramuscular no músculo *longissimus* (marmoreio) é um importante fator de pesquisa para a pecuária de corte atual e para a determinação do grau de qualidade da carne bovina (MANNEN, 2011; YAMADA, 2022).

A suplementação com vitamina A tem sido uma estratégia empregada em bovinos de corte para aumentar o marmoreio, pois tem sido relatada como um fator que influencia a deposição de gordura intramuscular na carne bovina (CAMPOS et al., 2020). A vitamina A promove a formação de novas células de gordura (adipogênese) por meio de seu metabólito ativo, o ácido retinoico. Os adipócitos se desenvolvem principalmente nos estágios fetal e neonatal (HARRIS et al., 2018).

Assim, hipotetizou-se que a injeção de vitamina A logo após o nascimento (janela adipogênica muito importante na formação dos adipócitos – efeito hiperplásico) pode aumentar a gordura intramuscular em animais terminados em

confinamento, pelo aumento hiperplásico do tecido em função de alterações de mecanismos lipogênicos sem, contudo, alterar o desenvolvimento do tecido muscular na carcaça. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o proteoma do tecido muscular de bovinos cruzados que receberam aplicação intramuscular de vitamina A pós-natal e seus impactos sobre características de carcaça e qualidade da carne.

## **2.2 Material e métodos**

### *2.2.1 Produção dos animais*

Todos os procedimentos com os animais seguiram os padrões éticos de pesquisa, estabelecidos pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), protocolo 0107/2018, Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA).

O experimento foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. Quarenta bezerros machos cruzados (F1 Montana × Nelore) foram utilizados desde o nascimento até a fase de terminação.

No dia do nascimento, 20 bezerros do tratamento com vitamina A receberam uma dose de 300.000 Unidades Internacionais (UI) de Vitamina A (Monovin A, Bravet, Rio de Janeiro) via injeção intramuscular. Durante a fase de cria, os animais de ambos os tratamentos foram mantidos com suas respectivas mães no mesmo piquete e a partir dos 40 dias de idade, aproximadamente, estes receberam suplemento de *creep feeding* até o desmame, com o fornecimento próximo de 1% do peso corporal.

Todos os animais foram imunocastrados por meio da aplicação de três doses de vacina anti-GnRF – fator liberador das gonadotropinas (Bopriva®, Zoetis Brasil), sendo a primeira aplicada ao desmame, a segunda dose após 30 dias e a terceira aos 90 dias subsequentes. Após o desmame, aos 210 dias, aproximadamente, os animais foram levados ao confinamento e alojados em baias individuais cobertas, com piso de concreto, com comedouros e bebedouros individuais. Os dois grupos de

animais receberam dieta formulada com *software* RLM 3.2 (LANNA et al., 2011) contendo milho moído (73,8% MS), farelo de algodão (10% MS), bagaço de cana (12,7% MS), cloreto de potássio (0,5% MS) e núcleo mineral (3% MS). A dieta foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 8h e às 16h. Para determinação do ganho de peso médio diário, os animais foram pesados no início e no final do período experimental, após jejum de 16 horas.

### 2.2.2 Abate, característica de carcaça e qualidade de carne

Após 180 dias de confinamento e com peso aproximado de 400 kg, os animais foram abatidos em frigorífico comercial inspecionado e cadastrado no SISP (Boituva – SP), utilizando-se a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do couro e evisceração. As carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo pesadas individualmente e levadas à câmara fria por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1 °C.

Decorrido o resfriamento, as carcaças foram retiradas da câmara e pesadas para a obtenção do peso de carcaça fria. As mensurações nas carcaças foram: peso da carcaça quente (PCq), rendimento total da carcaça quente (RCq), peso da carcaça fria (PCf) e rendimento de carcaça fria (RCf). Após isso, entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela da meia carcaça esquerda foi separado o músculo *Longissimus thoracis* (LT) do restante da carcaça, e antes de ser desossado foram avaliadas a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL).

### 2.2.3 Coleta de amostras do músculo *Longissimus thoracis* para análises laboratoriais

Na linha de abate (carcaça quente) foram coletadas amostras individuais (aproximadamente 2 g) do músculo LT da meia carcaça esquerda de todos os animais entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela, sendo congeladas em nitrogênio líquido. Essas alíquotas foram armazenadas posteriormente em ultrafreezer (-80 °C) até a

utilização para análises proteômicas. Após o período de resfriamento em câmara fria (24h), também foram coletadas amostras do músculo LT de todos os animais entre as 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela da meia carcaça esquerda para a condução de análises físico-químicas de qualidade, sendo devidamente identificadas.

As amostras de carne foram submetidas à maturação por três dias. Para tanto, foram retirados bifes do músculo LT com espessura de 2,54 cm, embalados a vácuo e mantidos em temperatura de 0 a 2 °C em BOD (*Biological Oxygen Demand*), modelo TE – 371 da TECNAL, em sacos plásticos especiais para alto vácuo e baixa permeabilidade ao oxigênio. Atingido o tempo de maturação de cada bife, estes foram congelados para posterior determinação das demais análises de qualidade de carne (maciez, perdas por cocção, cor, entre outras).

#### *2.2.4 Composição química da carne*

A análise de composição centesimal do presente estudo foi previamente conduzida por meio de espectroscopia de infravermelho próximo, de acordo com o método 2007-04 (AOAC, 2000). Nessa etapa utilizou-se o equipamento FoodScan LabTM (Foss NIRSystems, Inc., USA), no qual foram determinados os teores de umidade, proteína, gordura, matéria mineral e colágeno total, seguindo procedimentos descritos na literatura (ANDERSON, 2007).

#### *2.2.5 Perda por cocção e força de cisalhamento*

Para a avaliação da perda por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC) adotou-se o procedimento proposto por Wheeler et al. (1994), seguindo as recomendações da American Meat Science Association (AMSA, 2015). As amostras foram colocadas numa grelha acoplada a um refratário de vidro e um termopar acoplado a um termômetro digital modelo DT-612 (ATP Instrumentation, Ashby-de-laZouch, England) no centro de cada amostra, para monitoramento da temperatura interna.

As amostras foram assadas em forno industrial elétrico modelo Feri90

Venâncio (Venâncio Aires, Rio Grande do Sul, Brasil), pré-aquecido a 170 °C e equipado com termostato para minimizar variações na temperatura. Quando a temperatura interna dos bifes atingiu 40 °C, estes eram virados e permaneciam no forno até atingir 71 °C. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, pesadas e refrigeradas a 4 °C por 24 horas. A perda por cocção (PPC) foi dividida em perda por evaporação (PPE) e perda por gotejamento (PPG), determinadas em percentagem. A PPG foi obtida pesando-se somente o refratário antes e após a cocção da amostra. A PPE foi obtida pesando-se a amostra antes (PI) e após (PF) a cocção, pelo cálculo ( $PPE = PF - PI / PF \times 100$ ).

Para a determinação da força de cisalhamento (FC) foram retirados oito cilindros com 1,27 cm de diâmetro no sentido paralelo à fibra muscular, com um vazador acoplado a uma furadeira. Os cilindros foram seccionados em equipamento Brookfield CT-3 Texture Analyzer (AMETEK Brookfield, Middleborough, EUA). Os resultados foram reportados pela média de oito valores por amostra, em Newton (N).

#### 2.2.6 Coloração instrumental da carne

A coloração da carne ( $L^*$  – luminosidade/claro ao escuro;  $a^*$  – coloração vermelho ao verde;  $b^*$  – coloração amarelo ao azul) foi mensurada a partir do sistema CIELAB, utilizando-se um colorímetro KONICA MINOLTA – CR 400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Tokyo, Japan), com padrão de fonte de luz D65, ângulo de observação 10°, abertura de 5,0 cm e display Y: 0,01 a 160% de reflectância. A unidade foi calibrada utilizando-se uma placa para o padrão preto e branco e assim foi determinada a média de três medidas tomadas em diferentes regiões do músculo LT, sempre com pelo menos 30 minutos de exposição da amostra sob refrigeração de 2 a 5 °C - *blooming time*.

#### 2.2.7 Proteoma do tecido muscular

No estudo do proteoma foram utilizadas amostras do músculo LT coletadas

após o abate (na carcaça quente). Assim, 6 animais foram escolhidos aleatoriamente de cada grupo experimental (controle *versus* vitamina A), totalizando 12 amostras nessas análises.

#### 2.2.8 Extração de proteínas

A preparação da amostra foi baseada nas metodologias propostas por Lametsch et al. (2003) e Bouley, Chambon e Picard (2004). Amostras de músculo congelado dos animais pertencentes ao mesmo grupo genético foram picotadas com uma tesoura e misturadas. Dessa mistura, pesou-se 0,5g e homogeneizou com um homogeneizador *Turrtec (TE-102, Tecna)* em tampão de lise contendo 8 M Uréia, 2 M Tiouréia, 1% Ditioneitol (DTT), 2% CHAPS, 2% tampão de IPG pH 4-7. Em seguida, os extratos foram vigorosamente agitados por 30 min no gelo e, centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi armazenado e, posteriormente, utilizado para determinação da concentração de proteína total com o *kit PlusOne 2-D Quant (GE Healthcare)*.

#### 2.2.9 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Para a primeira dimensão, tiras de IPG de 13 cm com gradiente imobilizado de pH 3-10 foram reidratadas por 14 horas com uma alíquota de 375 µg de proteína extraído do músculo, solubilizada no volume final de 250 µl de uma solução de reidratação (“DeStreak” : 7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol – Amersham Bioscience) acrescida de 0,5% de tampão de IPG pH 3-10 e 1% inibidores de protease (Amersham Bioscience). A reidratação das tiras foi passiva e a temperatura ambiente dentro do IPG Box (GE Healthcare).

Posteriormente, as tiras foram submetidas à focalização isoeletrica no aparelho Etnan IPGphor 3 (GE Healthcare) a temperatura de 20°C por aproximadamente 5:30 h. O programa constituiu de corrente de 50 µA/tira e diferentes voltagens. O perfil utilizado de voltagem foi: 500 V por 500 Vh, gradiente

1000 V por 800 Vh, gradiente 8000 V por 11300 Vh e a fase final de 8000 V por 7000 Vh. O produto total de tempo x voltagem foi de 19.603 Vh.

As tiras focalizadas foram equilibradas por 15 min sob leve agitação em tampão de equilíbrio I (6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 1% DTT) e, subsequentemente, 15 min em tampão de equilíbrio II, o qual era o mesmo tampão do equilíbrio I, porém o DTT foi substituído por 5% Iodoacetamida.

Depois do equilíbrio, as tiras de IPG e o marcador de peso molecular, aplicado em pequenos retângulos de papel de filtro para blotting, foram sobrepostos ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). Ambos foram fixados sobre o gel com uma solução selante de agarose (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol).

O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli (1970) 1x concentrado para o anodo (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS) e 3 x concentrado para o catodo.

As proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando a cuba eletroforética SE 600 Ruby (Amersham Biosciences) a 15 mA/gel, 100 V por 30 min e posteriormente, 50 mA/gel, 600 V por aproximadamente 3h ou até o corante sair do gel. A corrida foi mantida a 10°C com um banho-maria termostático circulador (MultiTemp 3, GE Healthcare).

#### 2.2.10 Visualização das proteínas

Coomassie G-250 Colloidal, o qual consiste primeiramente numa etapa de fixação das proteínas no gel em 40% etanol e 10% ácido acético por 30 min e, posteriormente, na coloração com solução corante (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% de azul de coomassie G-250, 20% Metanol) overnight. Para visualização dos *spots* o excesso do corante foi retirado por meio de lavagens com água destilada. Os géis foram escaneados no Image Scanner III (GE Healthcare) e as imagens armazenadas para posterior análise. Ao final da corrida, os géis foram corados com o procedimento de coloração.

### 2.2.11 Análise das Imagens

A detecção dos *spots* e quantificação foi realizada no software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) automaticamente.

Para avaliar as diferenças na quantidade de cada *spot* foi utilizado o volume relativo (% volume), o qual é um valor normalizado que permanece relativamente independente de variações.

Após a detecção dos *spots* foram realizadas automaticamente análises de comparação (análise de “Match”), isto é, avaliar se o *spot* presente em um gel é correspondente em outro gel. Primeiramente, foram sobrepostas e comparadas imagens pertencentes à mesma amostra, e subsequentemente, as imagens de amostras diferentes. Logo em seguida, toda a análise de comparação foi conferida manualmente.

### 2.2.12 Espectrometria de massas (ESI-MS/MS)

Os *spots* protéicos foram selecionados por meio da massa molar e ponto isoelétrico obtidos no tratamento das imagens em relação à diferença de expressão entre os tratamentos (controle e vitamina A) e posteriormente, cortados (segmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) e preparados de acordo a metodologia de (SHEVCHENKO et al., 2007).

Os sedimentos foram transferidos para microtubos e submetidos a quatro etapas: a) remoção do corante usando 25 mM bicarbonato de amônia (Ambic)/acetonitrila (ACN) (50:50 v/v); b) redução e alquilação, onde os fragmentos de gel foram reidratados com solução de redução e incubados a 56 °C por 40 min; após a solução de redução foi removida, adicionou-se solução de alquilação e posteriormente os fragmentos foram incubado na ausência de luz por 30 min à temperatura ambiente; c) digestão trípica (incubado overnight a 37 °C com 10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> tripsina em 25 mM Ambic por 15 min; Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, USA); d) eluição de peptídeos (extraído do gel com adição de tampão de extração).

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QT-MS (Waters, Manchester, UK). A identificação das proteínas foi obtida utilizando o banco de dados UniProt (UniProtKB/Swiss-Prot - [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) e a análise de interação proteína-proteína foi realizada usando o software STRING 10.0. para o genoma de *Bos taurus*.

### 2.2.13 Análises estatísticas

Os resultados (características de carcaça e carne) foram analisados quanto à presença de dados discrepantes, homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos. Os dados foram expressos por médias e seus respectivos erros. As diferenças entre os tratamentos foram examinadas pelo Teste F, pelo procedimento GLM do SAS (versão 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC, United States) e, quando detectadas diferenças significativas, comparados por teste t de Student. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = m + t_i + \varepsilon_{ij},$$

em que,  $Y_{ij}$  é o valor observado para a unidade experimental referente ao tratamento  $i$  na repetição  $j$ ;  $m$  é o efeito geral da média;  $t$  é o efeito do tratamento (controle ou vitamina A) e  $\varepsilon$  é o erro experimental.

Para os dados de proteômica, o volume de *spot* de proteína foi importado para o *software* Image Master 2D Platinum (v.7.0) (GE Healthcare) e a média e o desvio padrão dos *spots* selecionados foram calculados. As imagens foram comparadas entre os tratamentos (controle e vitamina A) combinando *matching* para distribuição, volume, intensidade relativa, ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW). Os dados dos *spots* foram testados quanto à homogeneidade de variâncias e normalidade empregando-se os testes Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Em seguida, as diferenças nas médias entre os tratamentos foram analisadas pelo teste

t de Student. Além disso, o teste de Mann-Whitney (teste Wilcoxon) foi utilizado quando os critérios de normalidade foram violados em cada um dos tratamentos.

Diferenças no valor de  $P < 0,05$  foram consideradas significativas. Tendências foram consideradas quando o valor de  $P$  esteve entre  $0,05 \leq P < 0,10$ .

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Características de carcaça e qualidade da carne

O peso ao nascimento dos animais do tratamento controle e do tratamento com vitamina A foi de 28 kg e 26 kg, respectivamente. O peso ao desmame dos animais na fase de cria do tratamento controle foi de 237 kg e do tratamento com vitamina A foi de 236 kg. O ganho médio diário na fase de cria dos animais foi de 0,787 kg (tratamento controle) e 0,770 kg (vitamina A). O peso vivo inicial dos animais na fase de terminação foi de 237 kg (tratamento controle) e 236 kg (vitamina A) e o peso vivo final foi de 393 kg (tratamento controle) e 415 kg (vitamina A). O ganho médio diário na fase de terminação foi de 0,955 kg (tratamento controle) e 0,954 kg (vitamina A).

Não houve efeito significativo da injeção intramuscular de vitamina A (vit.A) para as variáveis peso ao nascimento, peso ao desmame e ganho médio diário (GMD) durante a fase de cria ( $P \geq 0,05$ ). Da mesma forma, na fase de terminação, não houve efeito nas características de carcaça quando os animais receberam vit.A ( $P \geq 0,43$ ).

O RC, AOL e EGS não foram influenciados pela injeção intramuscular de vit.A ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características de carcaça de bovinos F1 Montana × Nelore suplementados ou não com vitamina A injetável ao nascimento e terminados em confinamento

	Controle	Vitamina A	EPM <sup>1</sup>	Valor de P
<b>Variáveis</b>				
<b>Características de Carcaça</b>				
Peso de carcaça quente (kg)	218,8	231,24	25,98	0,298
Rendimento de carcaça (%)	55,55	55,7	1,22	0,794
Área de olho de lombo (cm <sup>2</sup> )	60,51	64,3	7,33	0,263
Espessura de gordura subcutânea (mm)	10,87	10,96	1,58	0,901

<sup>1</sup>Erro padrão das médias.

Uma tendência ( $P = 0,07$ ) de carne mais macia foi observada nos animais que receberam vit.A em comparação ao controle (FC = 53,1 vs. 58,7 ± 2,14 N), avaliada 3 dias *post-mortem* (Tabela 2). Não foram observadas diferenças sobre as características perdidas por cozimento e cor (L\*, a\*, b\*) entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Efeito da suplementação de vitamina A sobre a qualidade de carne de bovinos F1 Montana × Nelore

Variáveis <sup>2</sup>	Controle	Vitamina A	EPM <sup>1</sup>	Valor de P
Força de cisalhamento (N)	58,7	53,1	2,14	0,07
L*	34,7	35,1	0,40	0,88
a*	16,4	16,7	0,21	0,14
b*	6,20	6,40	0,13	0,15
Perdas por cozimento (%)	26,7	26,1	0,67	0,77

<sup>1</sup>Erro padrão das médias; <sup>2</sup>Luminosidade, intensidade de vermelho; intensidade de amarelo.

A carne dos animais que receberam vit.A no nascimento apresentou maiores teores de gordura ( $P = 0,05$ ) em comparação à carne dos animais que não foram suplementados (4,10% vs. 2,57%, respectivamente: Tabela 3).

A vit.A não alterou os componentes de umidade, proteína e colágeno da carne, os quais apresentaram valores semelhantes ( $P > 0,05$ ) em ambos os

tratamentos (valores médios de 0,418, 0,560 e 0,915, respectivamente; Tabela 3).

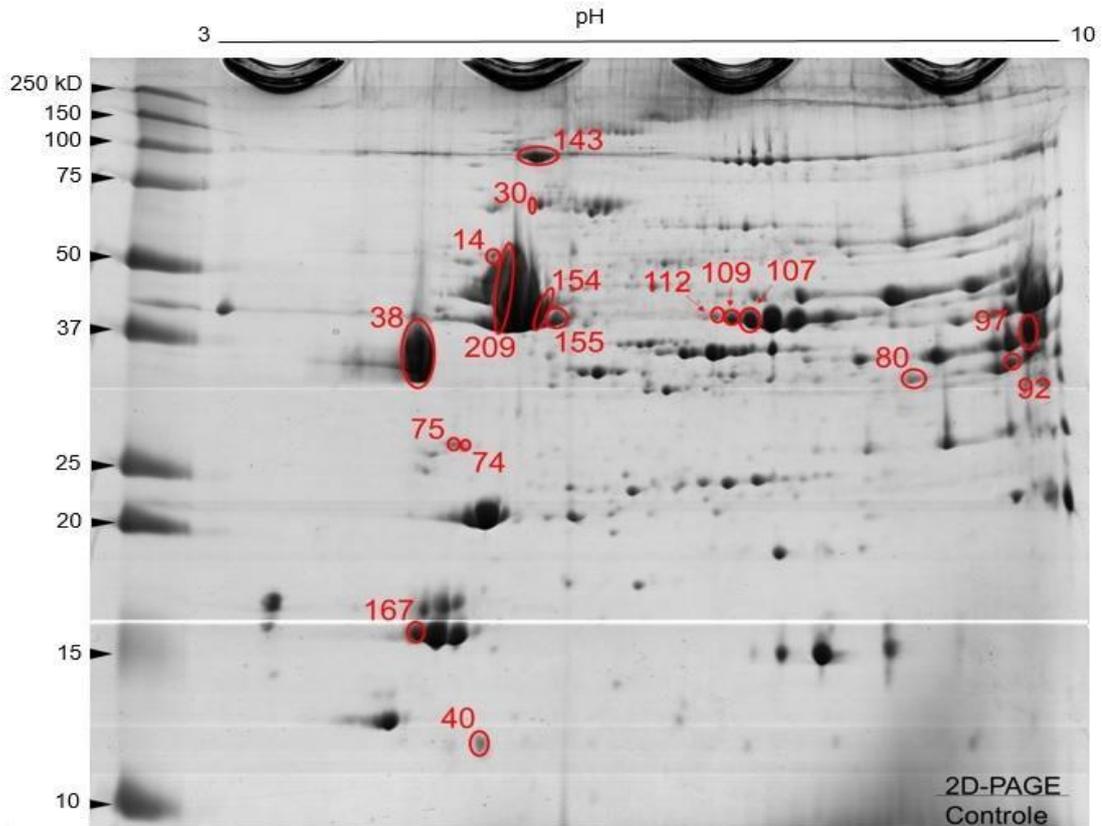
**Tabela 3.** Efeito da suplementação ou não com vitamina A sobre a composição química da carne de bovinos F1 Montana x Nelore terminados em confinamento

Variáveis	Controle	Vitamina A	EPM <sup>1</sup>	Valor de P
Umidade (%)	74,04	73,57	0,184	0,418
Proteína (%)	22,54	22,60	0,110	0,056
Gordura (%)	2,57 <sup>b</sup>	4,10 <sup>a</sup>	0,275	0,002
Colágeno (%)	1,21	1,20	0,013	0,915

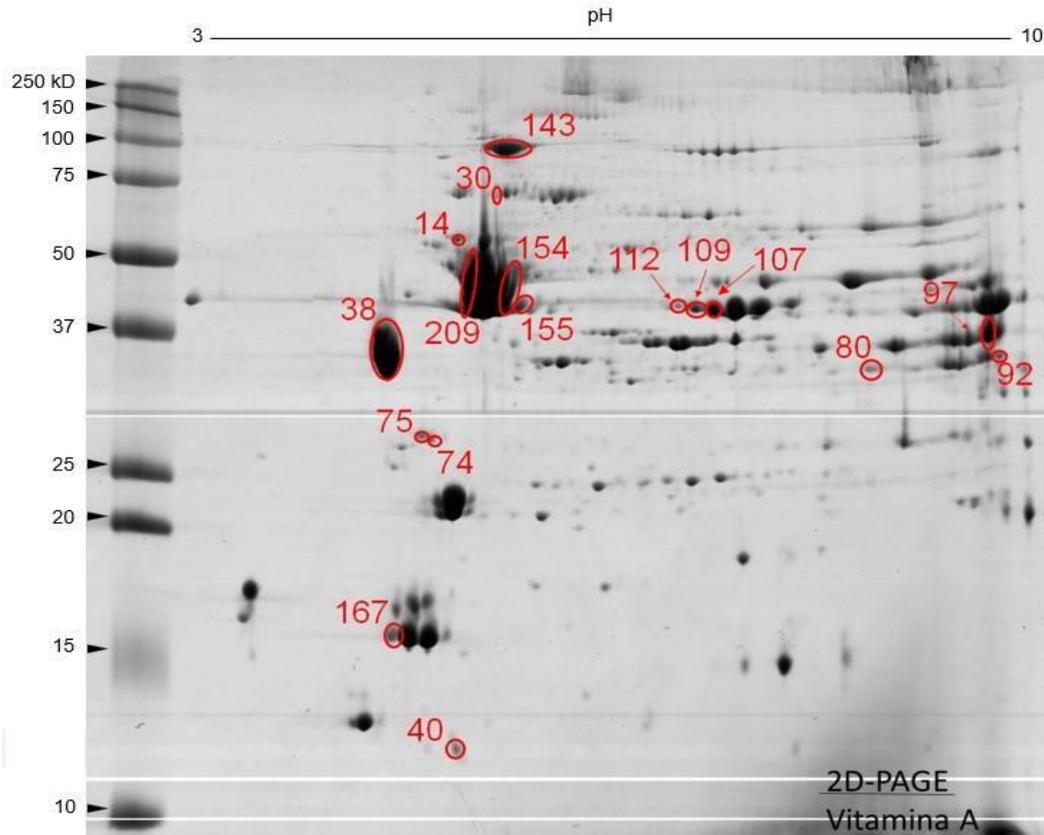
<sup>1</sup>Erro padrão das médias

### 2.3.2 Proteoma do tecido muscular

A comparação dos géis 2DE permitiu verificar que o número médio de *spots* proteicos por tratamento foi de 273±45 para tratamento controle e 266±44 vit.A. O número de *spots* dos géis de referência foi de 230 para tratamento controle e 251 para vit.A. Desse total, após análise das imagem, 22 *spots* foram selecionados como diferencialmente expressos ( $P < 0,05$ ) no tratamento controle (Figura 1) e vit.A (Figura 2).



**Figura 1.** Spots de proteínas selecionados para caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise das imagens. Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Amostras de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore do grupo experimental controle.



**Figura 2.** Spots de proteínas selecionados para caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise das imagens. Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Amostras de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore do grupo experimental vitamina A.

Foram identificadas com sucesso 78 proteínas correspondentes a 17 proteínas distintas. As proteínas identificadas estão listadas na Tabela 4 (controle) e Tabela 5 (vit.A).

Observou-se maior abundância no tratamento vit.A de proteínas do metabolismo energético (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1, CKM e COX5A), contração muscular (ACTB, ACTC1, ACTG1, ACTG2, ACTA1, ACTA2, ACTN1, ACTN2, ACTN3, TPM1, TPM2, TPM3, MYH1, PDLIM3 e TNNT3), proteínas de choque térmico (DNAJC18), ligação proteica (STXBP6, LGALS1, H4, MYOZ1, H31, H2BC12, GUCA1A, CNBP), transporte e sinalização (TUBA4A, VIM, TBA1B e EEF1A2).

**Tabela 4.** Proteínas diferencialmente expressas de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore identificadas por espectrometria de massas no tratamento controle

Spot ID <sup>a</sup>	Proteína ID <sup>b</sup>	ABV <sup>c</sup>	Proteína	Score <sup>d</sup>	Coverage (%) <sup>e</sup>	pI/Mw experimental	pI/Mw teórico
Proteínas de contração							
<b>30</b>	Q3ZC07	ACTC1	Actina, músculo cardíaco alfa 1	2480,315	51,4589	5.54/71,363.64	5.0713/41991
<b>92</b>	Q5E9B5	ACTG2	Actina, músculo liso gama-entérico	2047,881	47,3404	9.65/34,555,56	5.1606/41849
<b>167</b>	Q0P571	MYLPF	Cadeia leve reguladora de miosina 2, isoforma do músculo esquelético	489,3139	54,7059	4.71/15,8	4.6802/19000
Metabolismo energético							
<b>92</b>	P19858	LDHA	Cadeia A da L-lactato desidrogenase	9107,656	83,7349	9.65/34,555,56	8.0039/36574
	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	510,7673	42,3077	9.65/34,555,56	8.6426/35645
	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	394,7593	36,036	9.65/34,555,56	8.5151/35845
Proteínas de choque térmico							
<b>30</b>	P19120	HSPA8	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	8712,229	59,8461	5.54/71,363.64	5.2002/71196
Ligação proteica							
<b>92</b>	Q8SQ24	MYOZ1	Miozenina-1	10975,69	69,3603	9.65/34,555,56	9.5317/31653
	Q3SZX4	CA3	Anidrase carbônica 3	238,4126	56,1538	9.65/34,555,56	7.7783/29351
Transporte e sinalização							
<b>92</b>	Q861R0	SOCS2	Supressor da sinalização de citocinas 2	148,0309	25,7576	9.65/34,555,56	8.3818/22200

<sup>a</sup>ID Spot corresponde aos números mostrados na Figura 1.

<sup>b</sup>Abreviatura das proteínas de com acordo com a abreviatura do genes em UniProt.

<sup>c</sup>Proteína ID Proteomic databasesUniProt.

<sup>d</sup>Score significativo.

<sup>e</sup>Converge das proteínas calculadas por Scaffold (aminoácidos/total de aminoácidos).

**Tabela 5.** Proteínas diferencialmente expressas de tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore identificadas por espectrometria de massas no tratamento vitamina A

Spot ID <sup>a</sup>	Proteína ID <sup>b</sup>	ABV <sup>c</sup>	Proteína	Score <sup>d</sup>	Coverage (%) <sup>e</sup>	pI/Mw experimental	pI/Mw teórico
Proteínas de contração							
<b>14</b>	Q3ZC07	ACTC1	Actina, músculo cardíaco alfa 1	2528,468	48,5411	5.23/ 55,818.18	5.0713/41991
<b>38</b>	Q5KR48	TPM2	Cadeia beta da tropomiosina	7021,083	88,3803	4.68/34,846.15	4.4575/32816
	Q5KR49	TPM1	Cadeia alfa 1 da tropomiosina	4352,101	56,338	4.68/34,846.15	4.4897/32674
	Q5KR47	TPM3	Cadeia alfa 3 da tropomiosina	1905,464	49,6479	4.68/34,846.15	4.4868/32798
<b>74</b>	Q3ZC07	ACTC1	Actina, músculo cardíaco alfa 1	4033,7	37,1353	5.03/27,461,54	5.0713/41991
	Q5KR49	TPM1	Cadeia alfa 1 da tropomiosina	414,3358	59,8592	5.03/27,461,54	4.4897/32674
<b>75</b>	Q5E9B5	ACTG2	Actina, músculo liso gama-entérico	944,8882	37,766	4.95/27,923,08	5.1606/41849
<b>80</b>	Q8MKI3	TNNT3	Troponina T, músculo esquelético rápido	473,3224	38,3764	8.60/32,615.38	5.9282/32106
<b>97</b>	Q8MKI3	TNNT3	Troponina T, músculo esquelético rápido	2636,316	49,0775	9.60/36,230.77	5.9282/32106
<b>107</b>	Q3SYZ8	PDLIM3	Proteína Domínio PDZ e LIM 3	848,494	55,0633	7.30/39,692,31	7.8604/34331
<b>109</b>	P68138	ACTA1	Actina, alfa, músculo esquelético	10469,11	72,4138	7.15/40,153.85	5.0713/42023
	Q3SYZ8	PDLIM3	Proteína Domínio PDZ e LIM 3	5431,459	47,1519	7.15/40,153.85	7.8604/34331
<b>112</b>	Q3SYZ8	PDLIM3	Proteína Domínio PDZ e LIM 3	1169,761	58,5443	7.01/40,615.38	7.8604/34331
	P60712	ACTB	Actina, citoplasmática 1	1082,348	54,6667	7.01/40,615.38	5.1431/41709
	P68138	ACTA1	Actina, músculo esquelético alfa	303,4092	27,321	7.01/40,615.38	5.0713/42023
<b>143</b>	Q0III9	ACTN3	Alfa-actinina-3	21469,2	86,7924	5.58/99,384.62	5.1519/103086
	Q3ZC55	ACTN2	Alfa-actinina-2	11696,69	67,4497	5.58/99,384.62	5.1533/103713

	P62739	ACTA2	Actina, músculo liso aórtico	485,5888	46,6844	5.58/99,384.62	5.0771/41981
	Q3B7N2	ACTN1	Alfa-actinina-1	398,6213	17,9372	5.58/99,384.62	5.0933/102915
	Q9BE40	MYH1	Miosina 1	320,7703	33,4365	5.58/99,384.62	5.4316/222850
<b>154</b>	Q3ZC07	ACTC1	Actina, músculo cardíaco alfa 1	21499,1	79,8409	5.62/40,846.15	5.0713/41991
	P60712	ACTB	Actina, citoplasmática 1	251,4295	63,2	5.62/40,846.15	5.1431/41709
<b>155</b>	P68138	ACTA1	Actina, músculo esquelético alfa	23305,23	75,3316	5.74/41,076.92	5.0713/42023
	P63258	ACTG1	Actina, citoplasmática 2	147,8195	26,6667	5.74/41,076.92	5.1606/41765
Metabolismo energético							
<b>14</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	724,686	61,1549	5.23/55,818.18	6.6782/42961
<b>40</b>	Q5E956	TPI1	Triose-fosfato isomerase	475,6502	49,3976	5.22/11,923,08	6.5112/26672
	P00426	COX5A	Citocromo C Oxidase Subunidade 5A, Mitocondrial	255,1726	27,6316	5.22/11,923,08	6.4995/16724
<b>74</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	141,5909	53,5433	5.03/27,461,54	6.6782/42961
<b>75</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	215,1218	46,1942	4.95/27,923,08	6.6782/42961
<b>80</b>	P19858	LDHA	Cadeia A da L - lactato desidrogenase	3946,7	65,9639	8.60/32,615.38	8.0039/36574
<b>97</b>	P10096	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	19205,01	86,1862	9.60/36,230.77	8.5151/35845
	P19858	LDHA	Cadeia A da L - lactato desidrogenase	2573,859	56,9277	9.60/36,230.77	8.0039/36574
	Q32LG3	MDH2	Malato desidrogenase, mitocondrial	1835,295	62,426	9.60/36,230.77	8.6426/35645
	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	447,596	62,7297	9.60/36,230.77	6.6782/42961
<b>107</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	6539,832	84,5144	7.30/39,692,31	6.6782/42961
<b>109</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	13043,97	88,4514	7.15/40,153.85	6.6782/42961

<b>112</b>	Q9XSC6	CKM	Creatina quinase tipo M	8775,531	89,5013	7.01/40,615.38	6.6782/42961
<b>154</b>	Q3ZC09	ENO3	Beta-enolase	3075,726	60,3687	5.62/40,846.15	7.667/47066
Proteínas de choque térmico							
<b>80</b>	Q5EA26	DNAJC18	DnaJ homólogo da subfamília C membro 18	247,768	18,1564	8.60/32,615.38	8.0435/41576
Ligação proteica							
<b>38</b>	Q2YDL1	STXBP6	Proteína de ligação de syntaxina 6	500,6852	26,6667	4.68/34,846.15	9.6929/23652
<b>40</b>	P11116	LGALS1	Galectina 1	14888,66	71,1111	5.22/11,923.08	5.1621/14734
	P62803	H4	Histona H4	460,3494	49,5146	5.22/11,923.08	11.7671/11360
	O97680	TXN	Tiorredoxina	203,4148	36,1905	5.22/11,923.08	4.7783/11804
<b>80</b>	Q8SQ24	MYOZ1	Miozenina 1	973,7123	32,3232	8.60/32,615.38	9.5317/31653
<b>97</b>	Q8SQ24	MYOZ1	Miozenina 1	755,83	60,6061	9.60/36,230.77	9.5317/31653
<b>112</b>	P68432	H31	Histona H3.1	1328,632	33,0882	7.01/40,615.38	11.5415/15394
	Q2M2T1	H2BC12	Histona H2B tipo 1-K	548,1394	11,9048	7.01/40,615.38	10.7095/13866
<b>155</b>	P46065	GUCA1A	Proteína ativadora da guanilil ciclase 1	155,5674	50,7317	5.74/41,076.92	4.1997/23495
<b>209</b>	Q3T0Q6	CNBP	Proteína de ligação do ácido nucleico do dedo de zinco	364,5128	67,6471	5.30/42,384.62	7.5586/18729
Transporte e sinalização							
<b>14</b>	P81948	TUBA4A	Cadeia de tubulina alfa-4A	10080,27	76,3393	5.23/55,818.18	4.752/49892
	P48616	VIM	Vimentina	8105,088	82,618	5.23/55,818.18	4.8689/53695
	P81947	TBA1B	Cadeia de tubulina alfa-1B	1203,786	28,8248	5.23/55,818.18	4.7622/50119
	Q32PH8	EEF1A2	Fator de alongamento 1 - alfa 2	289,2056	8,6393	5.22/11,923.08	9.3472/50438

---

112	P68103	EEF1A1	Fator de alongamento 1 - alfa 1	3367,631	16,4502	7.01/40,615.38	9.3428/50109
-----	--------	--------	---------------------------------	----------	---------	----------------	--------------

---

<sup>a</sup>ID Spot corresponde aos números mostrados na Figura 2.

<sup>b</sup>Abreviatura das proteínas de com acordo com a abreviatura do genes em UniProt.

<sup>c</sup>Proteína ID Proteomic databasesUniProt.

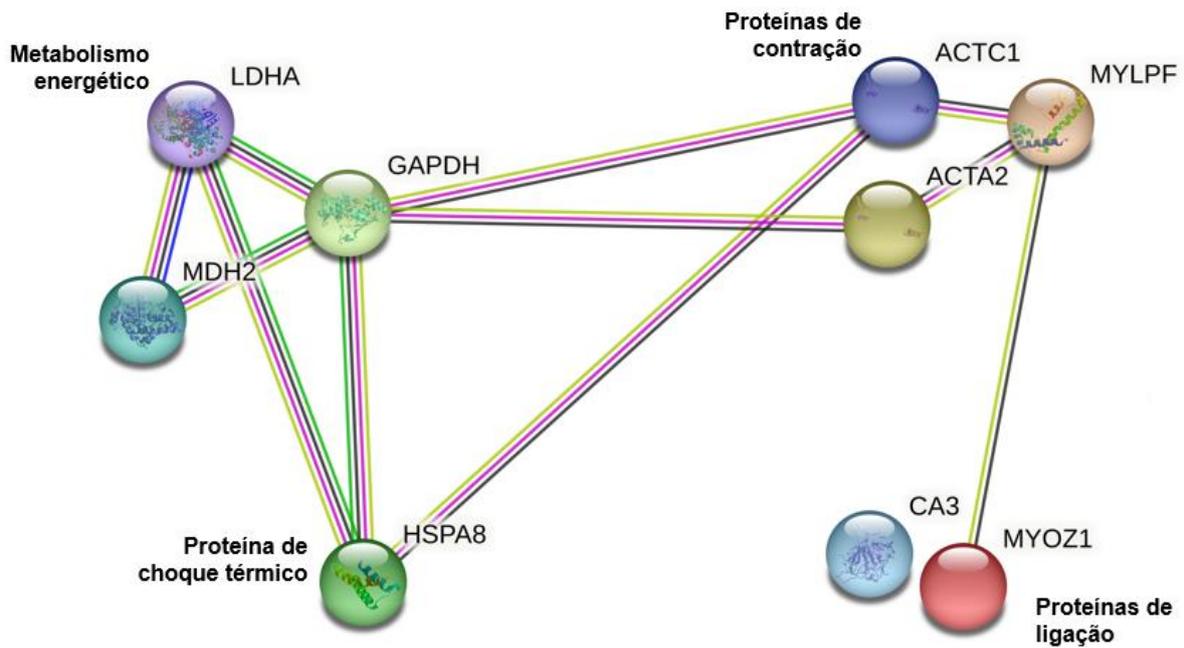
<sup>d</sup>Score significativo.

<sup>e</sup>Converge das proteínas calculadas por Scaffold (aminoácidos/total de aminoácidos).

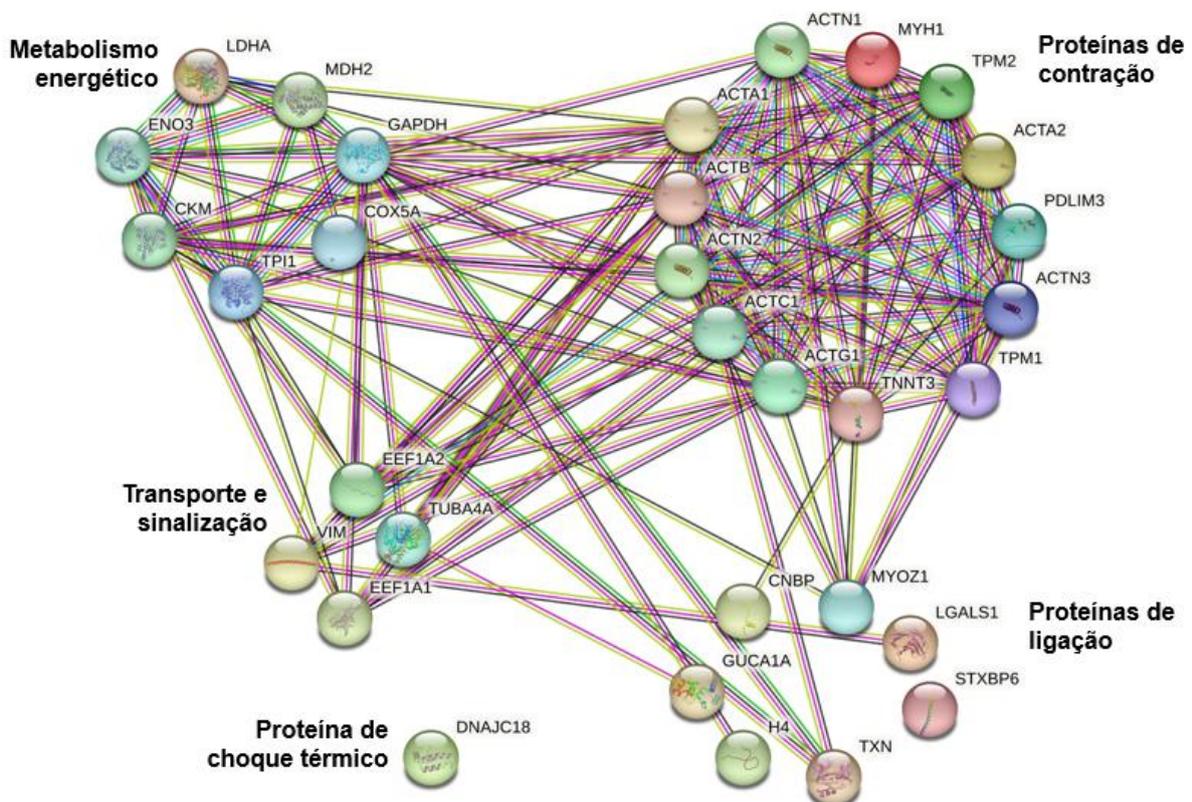
As interações proteína-proteína foram analisadas nos tratamentos controle (Figura 3) e vit.A (Figura 4).

As interações proteína-proteína no tratamento controle (Figura 3) demonstraram interações consistentes entre as proteínas caracterizadas nas amostras de tecido muscular bovino. Verificou-se dois grupos principais (*clusters*): proteínas relacionadas ao metabolismo energético (LDHA, GAPDH, MDH2) e proteínas relacionadas à contração muscular (ACTA2, ACTC1, MYLPP). Adicionalmente, no tratamento controle, identificou-se uma pequena rede de interação envolvendo proteínas de ligação (CA3 e MYOZ1) e proteína de choque térmico (HSPA8).

Os mesmos dois grupos (*clusters*) também foram identificados no grupo de tratamento vit.A (Figura 4), contudo, envolvendo um maior número de proteínas relacionadas ao metabolismo energético (LDHA, GAPDH, MDH2, ENO3, TPI1, CKM e COX5A) e às proteínas relacionadas à contração muscular (ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTN2, ACTN3, ACTN1, ACTB, ACTG1, MYH1, PDLIM3, TNNT3, TPM1 e TPM2). Além disso, foi identificada uma rede de interação envolvendo outras proteínas de ligação (MYOZ1, H4, TXN e LGALS1, CNBP, GUCA1A e STXBP6), proteínas de transporte e sinalização (TUBA4A, VIM, EEF1A1 e EEF1A2) e proteína de choque térmico (DNAJC18).



**Figura 3.** Análise das interações proteína-proteína usando as proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de bovinos F1 Montana x Nelore terminados do grupo experimental controle.



**Figura 4.** Análise das interações proteína-proteína usando as proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular (*Longissimus thoracis*) de

bovinos F1 Montana × Nelore terminados do grupo experimental vitamina A.

## **2.4 Discussão**

### *2.4.1 Características de carcaça e qualidade da carne*

A injeção intramuscular de vit.A pós-natal não impactou as características de carcaça, observando-se nenhum efeito sobre características de crescimento (PCQ e AOL) e acabamento (EGS), o que pode estar relacionado à ausência de efeitos sobre o desempenho dos animais na fase de terminação. Em outros estudos descritos na literatura, pesquisadores relataram que não houve efeitos da vitamina A nas características PCQ (ARNETT et al., 2009; KRUK et al., 2018; KNUSTON et al., 2020) e AOL (ARNETT et al., 2009; WANG et al., 2007) de qualidade da carne.

A maciez desempenha papel importante na avaliação da carne bovina, sendo considerada a característica sensorial mais importante em relação aos atributos de qualidade e relacionando-se à satisfação dos consumidores e, conseqüentemente, ao aumento do consumo (ALVES; MANCIO, 2007). No presente estudo, a maciez da carne dos animais que receberam injeção intramuscular de vit.A pós-natal foi ligeiramente melhorada, com redução de aproximadamente 5,6 N de FC. Na literatura, em estudo de Wang et al., (2007), nos “experimentos 1, 2 e 3” com bovinos cruzados Limosin x Luxi, os animais foram separados em 4 grupos com 4 animais em cada. Cada grupo recebeu um tipo de dieta, sendo dieta controle (sem vitamina A), VA1 = dieta basal enriquecida com 1100 UI de vitamina A/kg MS; VA2 = dieta basal enriquecida com 2200 UI de vitamina A/kg MS e VA3 = dieta basal enriquecida com 4400 UI de vitamina A/kg MS. Os autores relataram menor FC da carne dos animais que receberam as dietas VA1 e VA2 de ambos os tratamentos. Esses resultados sugerem que a injeção intramuscular de vit.A na fase de cria pode ser uma estratégia nutricional que auxilia na melhoria da maciez da carne, muito provavelmente por afetar a deposição de IMF. Entretanto, ainda não existem relatos

sobre os efeitos da suplementação de vitamina A pós-natal em bovinos pra FC, nesse sentido, são necessários mais estudos para investigar os efeitos da vitamina A na maciez da carne.

No estudo atual, a ausência de diferenças na composição química da carne (umidade, proteína e colágeno) nos diferentes tratamentos (controle e vit.A) era esperada, pois a dieta foi a mesma em todos os tratamentos e os animais receberam a mesma disponibilidade de energia e proteína. Esses valores estão dentro do considerado normal pela literatura (MONTESCHIO et al. 2019; TORRECILHAS et al., 2021). Porém, os animais do tratamento com vit.A apresentaram maior percentual de gordura em relação ao tratamento controle. A quantidade de IMF também é considerada um indicador da qualidade da carne bovina, pois altos níveis de IMF têm sido relacionados à maior maciez, suculência e sabor (CORBIN et al., 2015; HOCQUETTE et al., 2014; WEBB; O'NEILL, 2008).

A hipótese do estudo considerou que a injeção intramuscular de vit.A no nascimento de bovinos aumentaria a IMF, e isso foi atestado nesta pesquisa. A injeção intramuscular de vit.A no nascimento aumentou em 59,5% o teor de IMF da carne dos bovinos em comparação ao grupo que não recebeu a injeção de vit.A. Esse resultado pode ser explicado pela capacidade de a vit.A na fase pós-natal estimular a angiogênese. Assim, por meio de seu metabólito, o ácido retinoico, a vit.A pode induzir alterações no recrutamento de células indiferenciadas, resultando em maior direcionamento dessas células para a linhagem adipogênica, principalmente os adipócitos intramusculares (HARRIS et al., 2018). A hiperplasia, ou seja, o aumento no número de células por meio de seu recrutamento na linhagem adipogênica, é mais evidente no tecido adiposo intramuscular desde o final da gestação até os 250 dias de idade (DU et al., 2017).

Dessa forma, na fase neonatal, a injeção intramuscular de vit.A pode aumentar o teor de IMF, promovendo maior acúmulo de marmoreio na fase de terminação (MACIEL et al., 2022). Resultados semelhantes ao do presente estudo também foram verificados por pesquisadores utilizando-se bezerros Aberdeen Angus (HARRIS et al., 2018). Neste estudo, foram aplicadas duas doses intramusculares (injeções) de vit.A (nascimento e aos 30 dias de idade), verificando-se que os animais que receberam vit.A apresentaram níveis mais elevados de IMF. De acordo

com os pesquisadores, as alterações na expressão gênica, principalmente fatores de em transcrição, explicaram a maior deposição de IMF, tal como também verificado por Maciel et al. (2022). Ambos as pesquisas reportaram resultados semelhantes aos descritos no presente estudo sobre a IMF.

#### *2.4.2 Proteoma do tecido muscular*

As proteínas diferencialmente expressas no músculo LT de bovinos F1 Montana x Nelore possuem funções de contração muscular, metabolismo energético, proteínas de choque térmico, ligação proteica, transporte e sinalização. Várias proteínas encontradas neste trabalho (GAPDH, CA3, MDH2, CKM, TPM2, HSPA8, ENO3, TPI1, TUBA4A, TNNT3) foram relatadas em outros estudos relacionados às características de qualidade da carne, como maciez e IMF (BALDASSINI et al., 2022; SANTIAGO 2021; CAMPOS et al., 2020; CHO et al., 2016; GAGAGOUA et al., 2020; POLETI et al., 2018; SEVERINO et al., 2022; SHEN et al., 2012; SHIN; CHUNG, 2016; SILVA et al., 2019).

Nesta pesquisa, o maior IMF no grupo dos animais que receberam injeção intramuscular de vit.A após o nascimento pode estar relacionado com a maior abundância de proteínas envolvidas no metabolismo energético (GAPDH, CKM, ENO3, TPI1) e proteção celular e resposta ao estresse (HSPA8). De fato, sabe-se que essas proteínas estão associadas a uma maior capacidade de deposição de IMF. Proteínas diferencialmente expressas no músculo LT dos animais do grupo tratamento controle também revelaram o enriquecimento da via de atividade oxidativa (proteína CA3). Além disso, a proteína GAPDH é uma enzima das vias da glicólise e da gliconeogênese. A enzima GAPDH também converte reversivelmente o gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. Nesse sentido, Silva et al., (2019) relataram maior abundância da enzima GAPDH no proteoma de novilhos, com maior teor de IMF, quando comparados a touros Nelore. No presente estudo, essa enzima também foi mais abundante nos bovinos que receberam a suplementação com vit.A, de forma a explicar, possivelmente, o maior IMF encontrado nesses animais.

A anidrase carbônica (CA3) tem a função de hidratação reversível do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e está intimamente relacionada ao aumento do metabolismo oxidativo (SEVERINO et al., 2022). Em estudos proteômicos realizados com novilhos de origem asiática, Qinchuan (ZHANG et al., 2010) e Hanwoo (SHEN et al., 2012), o CA3 foi menos expresso em animais com mais IMF. Esses resultados corroboram o presente estudo no qual a proteína CA3 foi mais expressa no grupo dos animais com menor grau de marmoreio (tratamento controle). Outras enzimas relacionadas à produção de carne com marmoreio, como a miosina, a mioglobina e o colágeno, também apresentam baixa abundância em animais com alto marmoreio (SHEN et al., 2012).

Além disso, a creatina quinase Tipo M (CKM) desempenha um papel central na transformação de energia em tecidos que demandam energia, como o músculo esquelético (HORNEMANN et al., 2003). A maior abundância de CKM no LT do tratamento com vit.A pode ter contribuído para a tendência observada na variável FC (maciez da carne). Os resultados desta pesquisa estão de acordo com o estudo de Santiago (2021), em que o autor investigou o proteoma muscular *post-mortem* em touros e novilhos mestiços e encontrou a maior abundância de CKM em novilhos, o que pode ter favorecido a menor FC nesses animais quando comparados aos touros.

Relatou-se que a vit.A estimula o metabolismo oxidativo do músculo esquelético em bovinos de corte (WANG et al., 2018), o que está associado a um aumento da deposição de IMF (HWANG et al., 2010). Portanto, como os bovinos suplementados e não suplementados com vit.A foram alimentados com a mesma dieta, as quantidades de propionato e glicose disponíveis para o metabolismo do músculo esquelético foram provavelmente semelhantes. Assim, a maior abundância da proteína MDH2 no músculo esquelético de animais suplementados com vit.A pode indicar um aumento da conversão de malato em oxaloacetato dentro da mitocôndria, sugerindo um maior metabolismo oxidativo do músculo esquelético, o que pode ter contribuído para o aumento da IMF nesses animais.

Cho et al., (2016) analisaram a abundância de proteínas relacionadas ao IMF e à gordura visceral em vacas e touros e relataram que a abundância de TPM2 em tecidos adiposos foi menor em touros em comparação com as vacas, sugerindo que

TPM2 está positivamente associado ao escore de marmoreio. Os dados referido trabalho demonstraram que a TPM2 foi mais abundante nos animais que apresentaram maior teor de IMF (vit.A), o que indica que a TPM2 pode contribuir para o acúmulo de lipídios na carne.

De acordo com estudos presentes na literatura (BALDASSINI et al., 2015; GOBERT et al., 2014), proteínas da família HSPs são potenciais biomarcadores de proteólise, assim, as proteínas HSP60 e HSPA8, quando mais abundantes em bovinos machos não castrados, prejudicaram a maciez da carne (SANTIAGO, 2021). Nesse sentido, as proteínas de choque térmico têm diversas funções e propriedades antiapoptóticas e podem contribuir para retardar a apoptose *post mortem* (OUALI et al., 2013) e, portanto, também influenciar a maciez e a conversão do músculo em carne (GAGAOUA et al., 2021). No presente estudo, a HSPA8 foi expressa no grupo controle, o que pode ter contribuído para a maior força de cisalhamento na carne desses animais.

As proteínas miofibrilares  $\alpha$ -actina (ACTA1),  $\beta$ -actina (ACTB),  $\gamma$ -actina (ACTG1) e MYH1 foram significativamente abundantes no grupo dos animais que apresentaram uma tendência ( $P = 0,07$ ) para carne mais macia (vit.A). Normalmente, estas proteínas têm sido associadas com a maciez da carne de bovinos. Por exemplo, a  $\alpha$ -actina foi proposta como preditor precoce e adequado da proteólise *post mortem* para a maciez da carne em bovinos da raça Norwegian Red (BJARNADÓTTIR et al., 2012) e também foi observada e associada à maciez da carne de bovinos da raça Nelore (ROSA et al., 2018). Da mesma forma, conforme observado neste trabalho, estudos têm relacionado a MYH1 como um bom biomarcador de maciez da carne bovina (GAGAOUA et al., 2019; GAGAOUA; BONNET; PICARD 2020; ZHAO et al., 2014; PICARD et al., 2014).

A proteína TUBA4A (cadeia Tubulina alfa-4A) é uma proteína estrutural do citoesqueleto. As tubulinas são o principal bloco de construção dos microtúbulos, que desempenham um papel essencial na manutenção da estrutura celular e realizam o transporte intra e intercelular (KILNER et al., 2016). Foi demonstrado que alterações nas proteínas do citoesqueleto participam da deposição de IMF em frangos (CUI et al., 2012) e bovinos (POLETI et al., 2018; TAYE et al., 2017). Assim, acredita-se que a variação da TUBA4A pode influenciar a deposição de IMF em

frangos e bovinos. Além disso, encontramos a proteína TUBA4A expressa no grupo vit.A e pode ter influenciado a maior deposição de IMF nesses animais.

Entre as várias proteínas que foram mais expressas no tratamento vit.A, destacam-se aquelas relacionadas ao metabolismo energético (LDHA, GAPDH, ENO3, TPI1 e CKM). Os genes que codificam essas moléculas foram descritos em outros estudos em bovinos de corte como biomarcadores de características de carcaça e qualidade da carne, como crescimento muscular (SILVA-VIGNATO et al., 2017), IMF (GAGAOUA et al. 2020), maciez (GAGAOUA et al., 2021) e cor (PICARD; GAGAOUA, 2017). No presente estudo, proteínas como TPI1, CKM, ENO3, LDHA e GAPDH foram mais abundantes no músculo LT dos animais do tratamento vit.A. Esse resultado também pode ser relacionado ao maior IMF na carne desses animais.

## 2.5 Conclusão

A administração de vitamina A na fase neonatal em bezerros aumentou a deposição de IMF no músculo LT dos bovinos sem alterar outras características de carcaça (PCQ, AOL e EGS) e cor da carne. A tendência do amaciamento da carne dos animais que receberam injeção intramuscular de vitamina A pós-natal, nesse sentido, pode estar relacionada com a maior deposição de gordura intramuscular.

A maior abundância das proteínas do metabolismo energético (LDHA, MDH2, GAPDH, ENO3, TPI1 e CKM), contração muscular (ACTA1, ACTB, ACTG1, TPM2, MYH1 e TNNT3), ligação proteica, transporte e sinalização (TUBA4A), bem como alterações no proteoma do tecido muscular em resposta à injeção intramuscular de vitamina A pós-natal contribuiu para melhores características de qualidade da carne em bovinos cruzados terminados em confinamento. Diversas proteínas encontradas como mais abundantes no tratamento com vitamina A são marcadores robustos de características de interesse econômico na carne bovina, tais como gordura intramuscular (marmoreio) e maciez.

## Referências bibliográficas

ALVES, D. D.; MANCIO, A. B. Maciez da Carne bovina - uma revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 193-216, 2007.

AMSA. 1995. Research Guidelines for cookery, Sensory Evaluation and Instrumental Measurements of Fresh Meat. **American Meat Science Association and National Livestock and Meat Board**, Chicago, IL.

ANDERSON, S., 2007. Determination of Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan™ Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated Database: **Collaborative Study**. **J. AOAC Int.** 90, 1073–1083.

AOAC, 2000. The Association of Official Analytical Chemists. **Off. Methods Anal.** (17th ed.). <https://doi.org/10.3109/15563657608988149>.

ARNETT, A. M., DIKEMAN, M. E., DANIEL, M. J., OLSON, K. C., JAEGER, J., & PERRETT, J. (2009). Effects of vitamin A supplementation and weaning age on serum and liver retinol concentrations, carcass traits, and lipid composition in market beef cattle. **Meat science**, 81(4), 596-606.

BALDASSINI, W.A., BRAGA, C.P., CHARDULO, L.A.L., SILVA, J.A.I.V., MALHEIROS, J.M., DE ALBUQUERQUE, L.G., FERNANDES, T.T., PADILHA, P.D.M., 2015. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). **Food Chem.** 169, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.131>.

BALDASSINI, W., GAGAOUA, M., SANTIAGO, B., ROCHA, L., TORRECILHAS, J., TORRES, R., ... & CHARDULO, L. A. (2022). Meat quality and muscle tissue proteome of crossbred bulls finished under feedlot using wet distiller grains by-product. **Foods**, 11(20), 3233.

BJARNADÓTTIR, S. G.; HOLLUNG, K.; HOY, M.; BENDIXEN, E.; CODREA, M. C.; VEISETH-KENT, E. Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine Longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2035–2043, 2012.

BOULEY, J.; CHAMBON, C.; PICARD, B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v.4, p.1811-1824, 2004.

CAMPOS, C. F., COSTA, T. C., RODRIGUES, R. T., GUIMARAES, S. E., MOURA, F. H., SILVA, W., ... SILVA, F. F. (2020). Proteomic analysis reveals changes in energy metabolism of skeletal muscle in beef cattle supplemented with vitamin A. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 100(8), 3536–3543. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10401>.

CHO, J. H., JEONG, J. Y., LEE, R. H., PARK, M. N., KIM, S. H., PARK, S. M., ... & LEE, H. J. (2016). Regional differences of proteins expressing in adipose depots isolated from cows, steers and bulls as identified by a proteomic approach. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 29(8), 1197.

CORBIN, C. H., O'QUINN, T. G., GARMYN, A. J., LEGAKO, J. F., HUNT, M. R., DINH, T. T. N., ... MILLER, M. F. (2015). Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments. **Meat Science**, 100, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.09.009>.

CUI, HX, LIU, RR, ZHAO, GP, ZHENG, MQ, CHEN, JL E WEN, J. (2012). Identificação de genes expressos diferencialmente e vias para deposição de gordura intramuscular em tecidos peitorais maiores de frangos de crescimento rápido e lento. **BMC genomics**, 13 , 1-12.

DU, M., FORD, S.P., ZHU, M.-J., 2017. Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Anim. Front.** <https://doi.org/10.2527/af.2017-0122>.

GAGAOUA, M., BONNET, M., & PICARD, B. (2020). Protein array-based approach to evaluate biomarkers of beef tenderness and marbling in cows: Understanding of the underlying mechanisms and prediction. **Foods**, 9(9), 1180.

GAGAOUA, M.; MONTEILS, V.; COUVREUR, S.; PICARD, B. Beef Tenderness Prediction by a Combination of Statistical Methods: Chemometrics and Supervised Learning to Manage Integrative Farm-To-Meat Continuum Data. **Foods** 2019, 8, 274.

GAGAOUA, M.; TERLOUW, E.C.; MULLEN, A.M.; FRANCO, D.; WARNER, R.D.; LORENZO, J.M.; PURSLOW, P.P.; GERRARD, D.; HOPKINS, D.L.; TROY, D.; et al. Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. **Meat Sci.** 2021, 172, 108311.

GOBERT, M., SAYD, T., GATELLIER, P., & SANTE-LHOUTELLIER, V. (2014). Application to proteomics to understand and modify meat quality. **Meat science**, 98(3), 539-543.

HARRIS, C.L., WANG, B., DEAVILA, J.M., BUSBOOM, J.R., MAQUIVAR, M., PARISH, S.M., MCCANN, B., NELSON, M.L., DU, M., 2018. Vitamin A administration at birth promotes calf growth and intramuscular fat development in Angus beef cattle. **J. Anim. Sci. Biotechnol.** 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0268-7>.

HOCQUETTE, J.-F., VAN WEZEMAEL, L., CHRICKI, S., LEGRAND, I., VERBEKE, W., FARMER, L., ... PETHICK, D. W. (2014). Modelling of beef sensory quality for a better prediction of palatability. **Meat Science**, 97(3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.031>.

HORNEMANN, T., KEMPA, S., HIMMEL, M., HAYEß, K., FÜRST, D. O., & WALLIMANN, T. (2003). Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. **Journal of molecular biology**, 332(4), 877-887.

HWANG Y. H., KIM G. D., JEONG J. Y., HUR, S. J. AND, JOO S. T. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. **Meat Sci.** 2010;86:456–461. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.05.034.

KILNER, J., CORFE, B. M., MCAULEY, M. T., & WILKINSON, S. J. (2016). A deterministic oscillatory model of microtubule growth and shrinkage for differential actions of short chain fatty acids. **Molecular BioSystems**, 12(1), 93-101.

KNUTSON, E. E., MENEZES, A. C. B., SUN, X., FONTOURA, A. B. P., LIU, J. H., BAUER, M. L., ... & WARD, A. K. (2020). Effect of feeding a low-vitamin A diet on carcass and production characteristics of steers with a high or low propensity for marbling. **animal**, 14(11), 2308-2314.

KRUK, Z. A., BOTTEMA, M. J., REYES-VELIZ, L., FORDER, R. E. A., PITCHFORD, W. S., & BOTTEMA, C. D. K. (2018). Vitamin A and marbling attributes: Intramuscular fat hyperplasia effects in cattle. **Meat Science**, 137, 139-146.

LANNA, D.P.D., BARIONI, L.G., NEPOMUCENO, N.H., ALMEIDA, R. DE, TEDESCHI, L.O., 2011. Ração de Lucro Máximo – RLM 3.2.

LAMETSCH, R. et al. Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6992-6997, 2003.

SHACKELFORD, S.D., WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M., 1999. Evaluation of slice shear force as an objective method of assessing beef longissimus tenderness. **J. Anim. Sci.** 77.

MACIEL, FELIPE C.; MACHADO NETO, OTÁVIO R.; DUARTE, MARCIO S.; DU, MIN; LAGE, JOSIANE FONSECA; TEIXEIRA, PRISCILLA D.; MARTINS, CYNTIA L.; DOMINGUES, EDMILSON H.R.; FOGAÇA, LUIZ A.; LADEIRA, MARCIO M. Effect of vitamin A injection at birth on intramuscular fat development and meat quality in beef cattle. **Meat Science**, v. 184, p. 108676, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108676>.

MALHEIROS, J. M., ENRIQUEZ-VALENCIA, C. E., DE VASCONCELOS SILVA, J. A. I., CURI, R. A., DE OLIVEIRA, H. N., DE ALBUQUERQUE, L. G., & CHARDULO,

L. A. L. (2020). Carcass and meat quality of Nellore cattle (*Bos taurus indicus*) belonging to the breeding programs. **Livestock Science**, 242, 104277.

MANNEN, H. (2011). Identification and utilization of genes associated with beef qualities. **Animal Science Journal**, 82(1), 1-7.

MONTESCHIO, J. O., VARGAS-JUNIOR, F. M., ALMEIDA, F. L., PINTO, L. A. D. M., KANEKO, I. N., ALMEIDA, A. A., ... & PRADO, I. N. (2019). The effect of encapsulated active principles (eugenol, thymol and vanillin) and clove and rosemary essential oils on the structure, collagen content, chemical composition and fatty acid profile of Nellore heifers muscle. **Meat Science**, 155, 27-35.

MWANGI, F. W., CHARMLEY, E., GARDINER, C. P., MALAU-ADULI, B. S., KINOBE, R. T., & MALAU-ADULI, A. E. Diet and genetics influence beef cattle performance and meat quality characteristics. **Foods**, 8(12), 648. 2019.

OUALI, A.; GAGAOUA, M.; BOUDIDA, Y.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; SENTANDREU, M.A. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat Sci**. 2013, 95, 854–870.

PICARD, B.; GAGAOUA, M. Chapter 11—Proteomic Investigations of Beef Tenderness. In *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork*; Colgrave, M.L., Ed.; Academic Press: London, UK, 2017; pp. 177–197.

PICARD, B.; GAGAOUA, M.; MICOL, D.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J.F.; TERLOUW, C.E. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 9808–9818.

POLETI M. D., REGITANO L. C., SOUZA G. H., A.S. CESAR, R.C. SIMAS, B. SILVAVIGNATO, ET AL. Longissimus dorsi muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. *Journal of Proteomics*, 179 (2018), pp. 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.028>.

ROSA, A. F.; MONCAU, C. T.; POLETI, M. D.; FONSECA, L. D.; BALIEIRO, J. C. C.; SILVA, S. L. E.; ELER, J. P. Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. **Meat Science**, v. 138, p.1–9, 2018.

SANTIAGO, B. M. Desempenho, características de carcaça, qualidade de carne, expressão gênica e perfil proteômico do músculo em bovinos f1 Angus-Nelore inteiros e castrados. 2021. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2021.

SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIŠ, J., OLSEN, J.V., MANN, M., 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.** 1. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006>.

SENRA, K. B; BÂNKUTI, S. M. S; VIEIRA, F. G. D. *Supply Chain Management e Valorização de Atributos de Qualidade por Consumidores de Carne Bovina. Administração de Empresas em Revista*, v. 3, n. 25, p. 324-352, 2021.

SEVERINO M, GAGAOUA M, BALDASSINI W, RIBEIRO R, TORRECILHAS J, PEREIRA G, CURI R, CHARDULO LA, PADILHA P, NETO OM. Proteomics Unveils Post-Mortem Changes in Beef Muscle Proteins and Provides Insight into Variations in Meat Quality Traits of Crossbred Young Steers and Heifers Raised in Feedlot. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 14;23(20):12259. doi: 10.3390/ijms232012259. PMID: 36293120; PMCID: PMC9603352.

SHEN, Y.N.; KIM, S.H.; YOON, D.H.; LEE, H.G.; KANG, H.S.; SEO, K.S. Proteome Analysis of Bovine Longissimus dorsi Muscle Associated with the Marbling Score. *Asian-Australasian J. Anim. Sci*. 2012, 25, 1083–1088.

SILVA, LH, RODRIGUES, RT, ASSIS, DE, BENEDETI, PD, DUARTE, MS, & CHIZZOTTI, ML (2019). Explicando a qualidade da carne de touros e novilhos pela análise diferencial de proteoma e fosfoproteoma do músculo esquelético. *Journal of proteomics*, 199, 51-66.

SILVA-VIGNATO, B., COUTINHO, LL, CESAR, AS, POLETI, MD, REGITANO, LC, & BALIEIRO, JC (2017). Transcriptoma muscular comparativo associado a características de carcaça de bovinos Nelore. *BMC genomics* , 18 , 1-13.

SHIN S., E. CHUNG. Identificação de genes diferencialmente expressos entre altos e baixos escores de marmoreio do músculo longissimus lumborum em Hanwoo (gado coreano). *Meat Science*, 121 (2016), pp. 114 – 118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.05.018>.

TAYE, M., KIM, J., YOON, S. H., LEE, W., HANOTTE, O., DESSIE, T., ... & KIM, H. (2017). Whole genome scan reveals the genetic signature of African Ankole cattle breed and potential for higher quality beef. *BMC genetics*, 18(1), 1-14.

TORRECILHAS, J. A., ORNAGHI, M. G., PASSETTI, R. A. C., MOTTIN, C., GUERRERO, A., RAMOS, T. R., ... & DO PRADO, I. N. (2021). Meat quality of young bulls finished in a feedlot and supplemented with clove or cinnamon essential oils. *Meat Science*, 174, 108412.

Wan, X., Wang, D., Xiong, Q., Xiang, H., Li, H., Wang, H., ... & Chai, J. (2016). Elucidating a molecular mechanism that the deterioration of porcine meat quality responds to increased cortisol based on transcriptome sequencing. *Scientific reports*, 6(1), 36589.

WANG, B., NIE, W., FU, X., DE AVILA, J.M., MA, Y., ZHU, M.J., MAQUIVAR, M., PARISH, S.M., BUSBOOM, J.R., NELSON, M.L., DU, M., 2018. Neonatal vitamin A injection promotes cattle muscle growth and increases oxidative muscle fibers. *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0296-3>.

WANG, W. J., WANG, S. P., GONG, Y. S., WANG, J. Q., & TAN, Z. L. (2007). Effects of vitamin A supplementation on growth performance, carcass characteristics and meat quality in Limosin× Luxi crossbred steers fed a wheat straw-based diet. **Meat Science**, 77(4), 450-458.

WEBB, E. C., & O'NEILL, H. A. (2008). The animal fat paradox and meat quality. **Meat Science**, 80(1), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.029>.

WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M., CUNDIFF, L. V., DIKEMAN, M.E., 1994. Effects of cooking and shearing methodology on variation in Warner-Bratzler shear force values in beef. **J. Anim. Sci.** 72, 2325–2330. <https://doi.org/10.2527/1994.7292325x>.

YAMADA, T. (2022). Intramuscular adipogenesis in cattle: Effects of body fat distribution and macrophage infiltration. **Animal Science Journal**, 93(1), e13785.

ZHAO C., ZAN L., Wang Y., UPDIKE M. S., LIU G., BEQUETTE B. J., BALDWIN VI R. L., SONG J., Functional proteomic and interactome analysis of proteins associated with beef tenderness in Angus cattle. **Livestock Science**, v. 161, 2014. Pages 201-209, ISSN 1871-1413, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.030>.

ZHANG, Y.Y.; ZAN LSEN WANG, H.B.; XIN, Y.P.; Adoligbe, C.M.; Ujan, J.A. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. **Afr. J. Biotechnol.** 2010, 9, 28.