

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO  
DE PROTEÍNAS ESTRUTURAS E REGULATÓRIAS DO  
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E SUAS  
RELAÇÕES COM AS CARACTERÍSTICAS DE  
QUALIDADE DA CARNE EM ANIMAIS NELORE (*Bos  
indicus*)**

**Jessica Moraes Malheiros**  
Zootecnista

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO  
DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E REGULATÓRIAS DO  
TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E SUAS  
RELAÇÕES COM AS CARACTERÍSTICAS DE  
QUALIDADE DA CARNE EM ANIMAIS NELORE (*Bos  
indicus*)**

**Jessica Moraes Malheiros**

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

**Coorientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obter o título de Doutora em Genética e Melhoramento Animal.

M249c Malheiros, Jessica Moraes  
Caracterização, quantificação e expressão de proteínas estruturais e regulatórias do tecido muscular esquelético e suas relações com as características de qualidade da carne em animais Nelore (*Bos indicus*) / Jessica Moraes Malheiros. – – Jaboticabal, 2018

iv, 58 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Luis Artur Loyola Chardulo

Co-orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Banca examinadora: Henrique Nunes de Oliveira, Rogério Abdallah Curi, Saulo da Luz e Silva, Simone Cristina Méo Niciura

Bibliografia

1. Carne bovina. 2. Complexo calpaína. 3. Hsps. 4. qRT-PCR. 5. 2D-PAGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E REGULATÓRIAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E SUAS RELAÇÕES COM AS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE EM ANIMAIS

**AUTORA: JÉSSICA MORAES MALHEIROS**  
**ORIENTADOR: LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO**  
**COORIENTADOR: PEDRO DE MAGALHAES PADILHA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu

Pesquisadora Dra. SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA / São Carlos/SP

Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA  
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. SAULO DA LUZ E SILVA  
Departamento de Zootecnia / FZEA/USP - Pirassununga/SP

Prof. Dr. ROGERIO ABDALLAH CURI  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu

Jaboticabal, 02 de março de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

JESSICA MORAES MALHEIROS nasceu em 22 de Fevereiro de 1988 na cidade de Ribeirão Preto – SP, filha de José Carlos Vieira Malheiros e Fátima Aparecida de Moraes Malheiros. Iniciou em Março de 2007 o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu – SP, obtendo o título de Zootecnista em Dezembro de 2011. Durante a graduação foi bolsista FAPESP de Iniciação Científica sob orientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo; possuiu bolsa PIBIC de Iniciação Científica na UNIFESP sob a orientação da Prof. Dra. Luciene Covolan; estagiou na EMBRAPA Pecuária Sudeste sob a orientação da Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano. Em Março de 2012 ingressou no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) obtendo o grau de Mestre em Genética e Melhoramento Animal em 27 de Fevereiro de 2014, sob orientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo e coorientação do Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha. Em Março de 2014, iniciou o Doutorado no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em Março de 2017, iniciou o Doutorado sanduíche por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) com financiamento fornecido por intermédio da CAPES, permanecendo 12 meses na University of Nebraska – Lincoln, Estados Unidos sob a supervisão do Professor PhD. Jiri Adamec. Em 02 de Março de 2018, obteve o grau de Doutor em Genética e Melhoramento Animal sob orientação do Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo e coorientação do Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha.

*“Algo só é impossível até que alguém duvide e  
acabe provando o contrário”*

*Albert Einstein*

***Dedico***

Aos meus pais José Carlos Vieira Malheiros e Fátima Ap. de Moraes Malheiros  
pelo incentivo, esforço e amor em todos os momentos de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando e guiando às escolhas certas.

Aos meus pais José Carlos e Fátima 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 Jackeline, minha sobrinha Julia e meu cunhado Roberson Polli pela companhia e carinho. A minha avó Sebastiana Soares, pelo carinho e preocupação.

Ao meu noivo Mikael Rodrigues 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.

A Família Rodrigues (Sr. Jonas, D. Evânia e Bruno) pelo carinho, torcida, atenção, confiança.

A Cruz Elena Enriquez Valencia e Camila Pereira Braga pelos preciosos ensinamentos, sugestões, carinho e atenção que mantiveram essas amizades.

Aos amigos e colegas, João Paulo Lorenço, Ryan Grove, Renata Coscolin, Érica Barros, Edilson Ramos, José Cavalcante, Ivan Vechetti, Bruno Duran, Ana Paula Ferraz, Tassiana Gutierrez. Agradeço pela amizade, assistência, convívio e todos os momentos compartilhados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo pela oportunidade, orientação, amizade e ensinamentos.

Aos Professores Dr. Henrique Nunes de Oliveira, Rogério Abdallah Curi e Josineudson Augusto II de Vasconcelos Silva pelas idéias, sugestões e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.



Ao assessor administrativo do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal Luis Carlos Fernandes (*in memoriam*) pelas conversas, amizade e ensinamentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, por tornarem o meu dia a dia mais interessante e satisfatório. Especialmente, o Professor Fernando Broetto, pela disponibilidade do laboratório, amizade e ensinamentos.

A Professora Maeli Dal Pai e Professor Pedro de Magalhães Padilha por todo apoio laboratorial e profissional para o desenvolvimento deste projeto.

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

A University of Nebraska e ao Professor Jiri Adamec pela oportunidade do estágio durante o Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo fornecimento das bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do Projeto de Pesquisa (nº processo 2015/13021-1).

## SUMÁRIO

### **Caracterização, quantificação e expressão de proteínas estruturais e regulatórias do tecido muscular esquelético e suas relações com as características de qualidade da carne em animais Nelore (*Bos indicus*)**

Resumo

#### **CAPÍTULO 1 - Considerações gerais**

1.	Introdução	1
2.	Objetivo	2
2.1	Objetivos específicos	2
3.	Revisão de Literatura	3
3.1	Situação da pecuária de corte no Brasil	3
3.2	Transformação do músculo em carne	4
3.3	A maciez da carne bovina	5
3.4	Complexo calpaína e calpastatina	6
3.5	Proteína de choque térmico (Hsps)	7
3.6	Expressão gênica e proteômica no estudo da maciez da carne bovina	8
4.	Referências Bibliográficas	10

#### **CHAPTER 2 – Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nelore cattle**

Abstract

1.	Introduction	21
2.	Material and Methods	22
2.1	Production of experimental animals and sample collection	22
2.2	Warner-Bratzler shear force analysis and selection of the experimental groups	23
2.3	Real-time PCR analysis (RT-qPCR)	23

2.4	Statistical analysis	24
3.	Result and Discussion	25
4.	Conclusion	29
5.	References	30

### **CAPÍTULO 3 - Abordagem proteômica na caracterização de marcadores biológicos para qualidade da carne de bovinos Nelore**

#### Resumo

1.	Introdução	34
2.	Material e Métodos	35
2.1	População animal, colheita das amostras e seleção dos grupos experimentais	35
2.2	Caracterização das proteínas 2D-PAGE	37
2.2.1	Preparação das amostras	37
2.2.2	Corridas eletroforéticas (2D-PAGE) e tratamento das imagens	37
2.2.3	Caracterização dos spots protéicos por Espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS/MS)	38
3.	Resultados e Discussão	39
4.	Conclusão	52
5.	Referências Bibliográficas	52

## **Caracterização, quantificação e expressão de proteínas estruturais e regulatórias do tecido muscular esquelético e suas relações com as características de qualidade da carne em animais Nelore (*Bos indicus*)**

**Resumo** - O presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação da expressão gênica e proteômica com a maciez da carne de bovinos da raça Nelore. A partir de uma população de 90 animais foram selecionados três grupos experimentais por meio da análise de força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI), sendo: carne moderadamente macia, carne moderadamente dura e carne muito dura. A expressão dos genes foi avaliada por meio da análise de PCR em tempo real e a análise proteômica foi realizada com base na separação de proteínas por meio da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e caracterização por espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS/MS). A expressão da isoforma da calpastatina (*CAST2*) mostrou-se *up regulated* ( $P < 0,05$ ) nos grupos de carne moderadamente dura e muito dura. Os genes *HSP90AA1*, *DNAJA1* e *HSPB1*, os quais representam as proteínas de choque térmico Hsp90, Hsp40 e Hsp27, respectivamente, mostraram expressão *down regulated* ( $P < 0,05$ ) no grupo de carne moderadamente macia em relação ao grupo de carne muito dura. Na análise proteômica, a expressão do *spot* proteico das enzimas metabólicas TPI e PGM1, proteína estrutural PFN1 e aminiopeptidase LAP3 se mostraram *up regulated* ( $P < 0,05$ ) no grupo de carne moderadamente macia, enquanto que a expressão das proteínas estruturais (*ACTA1*, *ACTB*, *ACTG1* e *MLC1*), estresse oxidativo (*PRDX6*, *PRDX2*, *PRDX1* and *PARK7*), proteínas de choque térmico (*HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA1L*, *HSPD1* e *HSPB1*), e co-chaperonas e regulação celular (*CD37*, *STIP1* e *ARHGDI1A*) se mostraram *down regulated* ( $P > 0,05$ ) no mesmo grupo experimental. Estes resultados fornecem uma visão importante de novos possíveis marcadores biológicos atuantes no processo de amaciamento da carne, o que pode colaborar para melhor entender e gerar novas estratégias de seleção nos programas de melhoramento genético de bovinos Nelore.

**Palavras-chave:** carne bovina, complexo calpaína, Hsps, qRT-PCR, 2D-PAGE

## **Characterization, quantification and expression of structural and regulatory proteins of skeletal muscle tissue and its relationship with meat quality traits in Nellore cattle (*Bos indicus*)**

**Abstract** - The objective of this study was to evaluate the association of gene expression and proteomics with meat tenderness in Nellore cattle. From population of 90 animals three experimental groups were selected by shear force (SF) and/or myofibrillar fragmentation index (MFI): moderately tender meat, moderately tough meat and very tough meat. Gene expression was evaluated by real-time PCR and proteomics analysis was performed based on protein separation by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and characterisation by eletrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS/MS). Expression of the calpastatin isoform (*CAST2*) was up-regulated ( $P < 0.05$ ) in the moderately tough and very tough meat groups. Expression of the *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes, wich represent the heat shock proteins Hsp90, Hsp40 and Hsp27, respectively, were down-regulated ( $P < 0.05$ ) in the moderately tender meat in relation to the very tough group. In the proteomics analysis, the expression of the protein spots of metabolism TPI1 and PGM1, structural protein PFN1, and aminopeptidase LAP3 were *up regulated* ( $P < 0.05$ ) in the moderately tender meat, while the expression of structural proteins (ACTA1, ACTB, ACTG1 and MLC1), oxidative stress (PRDX6, PRDX2, PRDX1 and PARK7), heat shock protein (HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPD1 and HSPB1) and co-chaperones and cellular regulatory (CD37, STIP1 and ARHGDIA) were *down regulated* ( $P > 0.05$ ) in the same experimental group. The present results suggest an important view of possible new biological markers in the meat tenderization process, wich permit to unsderstand and generate new strategies for selection in Nellore cattle breeding programs.

**Palavras-chave:** beef cattle, calpain complex, Hsps, qRT-PCR, 2D-PAGE

## CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

### 1. Introdução

A produção de bovinos de corte no Brasil permitiu que o país ocupasse posição de destaque no comércio mundial e possibilitou a classificação de segundo maior produtor e maior exportador de carne bovina do mundo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2017). O rebanho brasileiro é composto predominantemente por animais zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzados. Normalmente, animais *Bos indicus* são relatados por não apresentarem carne macia frente a bovinos da subespécie *Bos taurus*, particularmente da raça Angus (LAGE et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Este entrave reduz a atratividade da carne de animais zebu, devido a maciez ser considerada uma das principais características de palatabilidade por meio dos consumidores (FONT-I-FURNOLS & GUERRERO, 2014).

Após a falência sanguínea o músculo sofre uma série de alterações bioquímicas nos processos conhecidos como *rigor mortis* e *postmortem*. O processo de *rigor mortis* pode ser caracterizado como sendo a transformação do músculo em carne. No *postmortem* a degradação proteolítica modifica a arquitetura e integridade das proteínas estruturais e conseqüentemente a maciez da carne (LANA & ZOLLA, 2016). Entre as enzimas envolvidas na proteólise miofibrilar pode-se observar o complexo multi-catalítico de proteases, o sistema lisossomal das catepsinas e o complexo enzimático calpaína/calpastatina considerado o principal mecanismo no processo de amaciamento da carne (HUFF-LONERGAN et al., 2010).

O complexo calpaína representa a família de proteases de cisteína dependentes de cálcio. A  $\mu$ -calpaína, m-calpaína atuam na degradação proteolítica e são codificadas por meio dos genes *CAPN1*, *CAPN2*. A calpastatina possui o papel de inibir a função das calpaínas e apresentam quatro isoformas *CAST1*, *CAST2*, *CAST3* e *CAST4* (RAYNAUD et al., 2005; PINTO et al., 2010; GUILLEMIN et al., 2011; CÔNSOLO et al., 2016). No entanto, outras proteínas atuantes em distintas vias metabólicas como as proteínas de choque térmico

(Hsps) foram propostas como possíveis biomarcadores para o amaciamento da carne de bovinos (OUALI et al., 2006).

As Hsps são chaperonas com função anti-apoptótica subdivididas em subfamílias de acordo com seu peso molecular (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp20). Após o estresse oxidativo gerado por meio do aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) as Hsps auxiliam na preservação das proteínas estruturais contra a desnaturação. Estas proteínas foram relacionadas ao processo de maciez da carne por meio da formação de um complexo ativo, o qual bloqueia as caspases (GUILLERMIN et al., 2011; YANG et al., 2012; LANA & ZOLLA, 2016). No entanto, outros genes e proteínas foram nomeados como possíveis marcadores biológicos para o amaciamento da carne por meio de técnicas de expressão gênica e proteômica (GUILLEMIN, 2011; PICARD & GAGAOUA, 2017, ZHANG et al., 2017).

Contudo, a maciez da carne esta relacionadas à multifatores decorrentes durante a vida do animal como raça, tecido muscular e condição ambiental, os quais influenciam na atuação de distintos genes e proteínas no período *postmortem*. Portanto, a abordagem genética e proteômica específica em bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) se tornam necessárias no intuito de obter informações dos mecanismos relacionados ao amaciamento da carne.

## **2. Objetivo**

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma abordagem gênica e proteômica do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore, visando o aprofundamento dos conhecimentos referentes aos mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na maciez da carne.

### **2.1 Objetivos específicos**

(1) Analisar e identificar a expressão gênica da  $\mu$ -calpaína (*CAPN1*), m-calpaína (*CAPN2*), calpastatina (*CAST*, *CAST1*, *CAST2*) e das proteínas de choque térmico (*HSP90AA1*, *DNAJA1* e *HSPB1*) em distintos grupos experimentais para a maciez.

(2) Relacionar as informações obtidas por meio da expressão gênica dos distintos tratamentos, no intuito de obter uma melhor compreensão da afinidade do complexo calpaína e proteínas de choque térmico com o amaciamento da carne.

(3) Analisar, identificar e caracterizar os *spots* peptídicos por meio da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e do sequenciamento de peptídios por espectrometria de massa nos distintos grupos experimentais para a maciez.

(4) Relacionar as informações obtidas por meio da proteômica, visando um melhor entendimento dos principais eventos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na maciez da carne de bovinos Nelore.

### **3. Revisão de Literatura**

#### **3.1 Situação da pecuária de corte no Brasil**

O rebanho nacional, constituído principalmente por animais zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*) e cruzados, permitiu ao Brasil se tornar o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina do mundo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2017).

A importância das raças zebuínas está relacionada às características de rusticidade e adaptação ao sistema de criação extensiva, elevada capacidade de digestão de fibras de baixa qualidade, resistência natural aos parasitas externos e internos e baixo metabolismo quando comparado aos *Bos taurus* (ACNB, 2014).

Os animais *Bos indicus* geralmente são relatados por não apresentarem carne macia frente a bovinos da subespécie *Bos taurus*, particularmente a raça Angus (LAGE et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015). Apesar da proximidade filogenética, estas subespécies apresentam características fenotípicas distintas com reflexos marcantes na eficiência produtiva, reprodutiva e na qualidade da carne produzida. A diferença na maciez da carne entre as subespécies pode estar relacionada à reduzida taxa de proteólise *postmortem* em animais *Bos indicus* (CURI et al., 2010).

Contudo, a pecuária de corte nacional caracteriza-se por apresentar variação na qualidade da carne produzida, fato que compromete a



competitividade do setor no mercado globalizado. Portanto, identificar os mecanismos relacionados à definição de qualidade da carne de animais zebuínos torna-se necessário, possibilitando assim, a compreensão e intervenção no processo de amaciamento da carne.

### 3.2 Transformação do músculo em carne

Após o sacrifício dos animais e a falência sanguínea o músculo sofre uma série de alterações bioquímicas nos processos conhecidos como *rigor mortis* e *postmortem*. O *rigor mortis* pode ser definido como processo de conversão do músculo esquelético em carne, o qual ocorre devido a modificações metabólicas, físicas e estruturais que auxiliam na determinação da maciez da carne (MIR et al., 2017). Deste modo, o entendimento da sequência de eventos bioquímicos que ocorrem neste período se torna essencial para compreensão da maciez da carne no período *postmortem*.

Devido à falência sanguínea, o aporte de oxigênio e nutrientes é cessado nas células do tecido muscular. Porém, o músculo continua suas atividades adaptando-se a um ambiente com redução de oxigênio e reservas energéticas. As células musculares passam a utilizar como fonte de energia o glicogênio, por meio da glicólise anaeróbica na formação do ácido láctico (LANA & ZOLLA, 2016). A produção do ácido láctico continua até acabar os estoques de glicogênio, resultando na queda de pH do músculo (HOLLUNG & VESETH-KENT 2012). A capacidade de retenção de água do músculo reduz por meio da desnaturação das proteínas musculares, ocasionando modificações na coloração da carne.

No intuito de manter o relaxamento muscular a produção de ATP torna-se necessária. O ADP se liga à fosfocreatina no sarcoplasma e é convertido em ATP. Os níveis de ATP tornam-se insuficientes para manter actina e miosina separadas. Portanto, ocorre a união destas formando a actomiosina e ocasionando o encurtamento do sarcômero e a rigidez muscular. Desta forma, conclui-se o *rigor mortis*. No entanto, a conversão do músculo em carne continua por meio de degradações enzimáticas e desnaturação protéica (LANA & ZOLLA, 2016).

O estabelecimento da maciez durante o *postmortem* resulta do enfraquecimento das alterações da estrutura miofibrilar por enzimas proteolíticas

(HUANG et al., 2011). Entre as enzimas envolvidas na proteólise pode-se observar o complexo multi-catalítico de proteases, o sistema lisossomal das catepsinas e o complexo enzimático calpaína/calpastatina, considerado o principal mecanismo no processo de amaciamento da carne (HUFF-LONERGAN et al., 2010). No entanto, estudos utilizam tecnologias recentes no intuito de definir e entender de forma mais aprofundada os mecanismos que evidenciam cascatas de centenas de proteínas e vias metabólicas relacionadas à maciez da carne (LANA & ZOLLA, 2016; RODRIGUES et al., 2017).

### **3.3 A maciez da carne bovina**

A carne é uma das principais fontes de proteína animal consumida no mundo. Apesar disso, a qualidade da carne muitas vezes não atende às expectativas dos consumidores e gera problemas para indústria que busca compreender os mecanismos relacionados com a qualidade, no intuito de desenvolver estratégias para fornecer um produto padronizado (HOCQUETTE et al., 2012; PICARD et al., 2015).

A maciez é considerada uma das principais características de qualidade da carne bovina. As características de aparência como cor, gordura intramuscular e cortes, assim como a palatabilidade do produto também são levadas em consideração por meio dos consumidores e cadeia produtiva. Deste modo, a qualidade da carne pode ser definida como o conjunto de propriedades e percepções das características do alimento por meio dos consumidores (HOCQUETTE et al., 2012).

No intuito de avaliar a maciez e selecionar animais que produzam carne com características desejáveis alguns métodos e técnicas laboratoriais são empregados (LIMA JÚNIOR et al., 2011). Entretanto, estes procedimentos são utilizados após o abate dos animais, ou seja, as características avaliadas são de expressão tardia o que dificulta a regulação e progresso genético da população.

Deste modo, com a finalidade de superar estes problemas relacionados a características de qualidade de carne, programas de melhoramento genético de bovinos de corte desenvolvem metodologias alternativas de avaliação genética, genômica e proteômica. Neste sentido, o estudo dos genes e das proteínas envolvidos nos mecanismos de regulação destas características pode trazer

informações relevantes para seleção dos animais produtores de carne de qualidade.

### 3.4 Complexo calpaína e calpastatina

O complexo calpaína representa a família de proteases de cisteína dependentes de cálcio encontradas em diferentes tecidos. Este complexo se constitui principalmente por proteínas  $\mu$ -calpaína, enzima que requer baixa concentração de cálcio, m-calpaína que requer alta concentração deste metal e a calpastatina que também depende do cálcio para inibir a atuação das calpaínas (GOLL et al., 2003).

As proteínas  $\mu$ -calpaína, m-calpaína são codificadas por meio dos genes *CAPN1*, *CAPN2*, respectivamente, e a calpastatina (*CAST*) apresenta quatro isoformas *CAST1*, *CAST2*, *CAST3* e *CAST4* (RAYNAUD et al., 2005; PINTO et al., 2010; GUILLEMIN et al., 2011; CÔNSOLO et al., 2016). Devido à fisiologia proteolítica e sua atuação nas vias metabólicas, os produtos da transcrição destes genes são considerados candidatos funcionais a biomarcadores para características de qualidade de carne, principalmente a maciez em animais de produção.

As calpaínas e calpastatinas possuem importante desempenho nos principais processos intracelulares. Estas proteínas encontram-se localizadas nas organelas subcelulares no interior do sarcoplasma (GOLL et al., 2003). Durante a transformação do músculo em carne, no processo conhecido como *rigor mortis*, ocorre a migração das calpaínas para as regiões do disco Z e da banda I das miofibrilas (HUFF-LONERGAN et al., 1996; RAYNAUD et al. 2005). Devido à sua localização na fibra muscular acredita-se que a ação proteolítica das calpaínas no *postmortem* ocorra devido ao enfraquecimento da interação filamentos finos/disco-Z. As calpaínas concentram-se na degradação especificamente das proteínas titina, nebulina, desmina, troponinas e tropomiosina, em que são observados sítio de ligação nos referidos substratos (LANA & ZOLLA, 2016).

A  $\mu$ -calpaína é considerada essencial na proteólise *postmortem*, devido a sua menor necessidade de íons de cálcio para ser ativada. Além disso, necessita de pH adequado para realização da proteólise, ocorrendo a ativação em uma

faixa ampla entre 6,8 e 5,7 (ANDRIGUETTO et. al., 2006; LONERGAN et. al., 2010).

Evidências demonstraram que a atividade da  $\mu$ -calpaína é inibida devido à expressão de calpastatina resultando na grande redução de proteólise das fibras musculares (KENT et al., 2004; GEESINK, 2006). Desta forma, devido ao rebanho nacional ser constituído em sua maioria por animais *Bos indicus*, o conhecimento real da atuação do sistema proteolítico calpaína/calpastatina em bovinos Nelore se torna necessário no intuito de desvendar e entender a sua relação com a maciez da carne bovina. Entretanto, a maciez da carne pode ser considerada um sistema complexo e uma rede intrínseca de proteínas pode estar relacionada ao amaciamento da carne (GUILLEMIN et al., 2011; LANA & ZOLLA, 2016; PICARD & GAGAOUA, 2017).

### **3.5 Proteína de choque térmico (HSPs)**

As proteínas de choque térmico (Hsps), também nomeadas de chaperonas moleculares são componentes do músculo e desempenham um papel chave na manutenção ou reparação de proteínas desnaturadas (LARKINS et al., 2012). As células reagem ao estresse ao sintetizar Hsps, que auxiliam na manutenção da homeostase das proteínas intracelulares (VALROS et al., 2013). As principais Hsps expressas devido ao estresse são Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e Hsp27 (YOUNG et al., 2004). No entanto, diferentes Hsps podem diferir em relação à capacidade de proteger o tecido em resposta ao estresse (YU, 2008).

As Hsps estão possivelmente relacionadas aos processos de amaciamento ao participar da formação de um complexo ativo com as caspases bloqueando sua atuação e impedindo a degradação de proteínas miofibrilares, que provavelmente sofreriam danos estruturais ou até mesmo ocasionaria a apoptose após o estresse oxidativo gerado por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) (GUILLERMIN et al., 2011; YANG et al., 2012; LANA & ZOLLA, 2016).

Dentre as Hsps induzidas por meio do estresse, a Hsp70 foi estudada extensivamente (VALROS et al., 2013). Esta proteína pode ser considerada a mais proeminente e abundantemente expressa (MAYER & BUKAU, 2005). As Hsp70 atuam com função anti-apoptótica na inibição da formação do ROS (PICARD et al., 2014; LANA & ZOLLA, 2016; PICARD & GAGAOUA, 2017).

Estudos proteômicos relataram a expressão diferencial de Hsp70 em músculos com características variáveis de qualidade da carne (DI LUCA et al., 2011) e características protéicas (BJARNADÓTTIR et al., 2010). Apesar da Hsp70 ser considerada potencial biomarcador para qualidade da carne, o seu papel no *postmortem* necessita ser definido (XING et al., 2017).

A proteína Hsp40 codificada pelo gene *DNAJA1*, atua como co-chaperona da Hsp70 e ajuda no dobramento e proteção de novas proteínas, no intuito de assegurar o bom funcionamento do músculo sob condições de estresse oxidativo (VOSS et al., 2007; GUILLEMIN et al., 2011). Assim o complexo Hsp40/Hsp70 inibe a morte celular programada (apoptose), fato importante para a maciez da carne (OUALI et al., 2006). No entanto, a atuação da Hsp40 no período *postmortem* pode variar entre tipo muscular, indivíduos e raças de bovinos (PULFORD et al., 2008; CASSAR-MALEK et al., 2011; GUILLEMIN et al., 2011).

O estresse ocorrido antes do abate pode influenciar na expressão protéica da Hsp90 sintetizada pelo gene *HSP90AA1* e a diminuição na expressão desta proteína pode ser desvantajoso na recuperação da função celular, ocorrendo uma menor retenção de água da carne (ZHANG et al., 2017). No entanto, o papel da Hsp90 na maciez da carne no período *postmortem* ainda é controverso.

A Hsp27 codificada pelo gene *HSPB1* está relacionada com a regulação e estabilização de proteínas miofibrilares e proteção de filamentos de actina no período *postmortem*, levando a possível variação na qualidade da carne (LOMIWES et al., 2013; BALAN et al., 2014; LOMIWES et al., 2014). Deste modo, membros da família das Hsps por possuírem função anti-apoptótica e ações protetoras em proteínas miofibrilares provavelmente possuem importante papel na conversão do músculo em carne (*rigor mortis*) e no período *postmortem*, cujo mecanismos de regulação necessitam de estudos.

### **3.6 Expressão gênica e proteômica no estudo da maciez da carne bovina**

O estudo da expressão gênica por meio da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR) pode ser considerado método sensível e preciso (GIULIETTI et al., 2001). A quantificação relativa é baseada na expressão do gene de interesse em relação o gene de referência, comparando assim a diferença de expressão gênica entre tratamentos (LIVAK &

SCHIMTTGEN, 2001). A expressão gênica pode ser aplicada para auxiliar na descoberta de biomarcadores específicos, inclusive da maciez da carne de bovinos (GIUSTI et al., 2013; ZHANG et al., 2014; FONSECA et al., 2017). Deste modo, a técnica para determinação da expressão gênica relativa e as técnicas “ômicas” podem auxiliar nas características de qualidade de carne.

Os estudos de “ômica” em larga escala podem ser realizados no intuito de obter uma visão holística dos processos que ocorrem em um sistema dinâmico (SMIRNOVA et al., 2016). Dentre as “ômicas”, a proteômica é uma área da biologia molecular que estuda as proteínas e auxilia na compreensão dos processos biológicos complexos em diversas áreas da ciência (BENDIXEN et al., 2011). Na Ciência da carne a proteômica promove a melhor compreensão das proteínas e vias metabólicas relacionadas à qualidade da carne (D’ALESSANDRO & ZOLLA, 2013; LANA & ZOLLA, 2016; PICARD & GAGAOUA, 2017). Além disso, a proteômica proporcionou o estudo de diversas proteínas que não haviam sido relacionadas com a qualidade da carne (MORZEL et al., 2008; JIA et al., 2009). Deste modo, como as proteínas são os "produtos finais" dos genes, as alterações em sua abundância podem refletir diferenças na expressão gênica e possivelmente explicar como fatores genéticos e ambientais controlam as funções celulares e características fisiológicas (D’ALESSANDRO & ZOLLA, 2013; GOBERT et al., 2014).

Estudos proteômicos incluem técnicas que permitem visualizar e analisar milhares de proteínas em determinado tempo. Entre essas técnicas destaca-se a eletroforese bidimensional (2D), onde a taxa de migração é influenciada pela carga protéica, 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, análises computacionais de imagens e base de dados, tornam-se poderosas ferramentas para identificação e caracterização de proteínas em estudos proteômicos (ROCHA et al., 2005).

A maioria dos estudos sobre proteômica da carne identificam estreita correlação entre a maciez e uma série de proteínas de choque térmico (Hsp), incluindo Hsp90 (YANG et al., 2012; ZANG et al., 2017), Hsp70 (BJARNADOTTIR et al., 2012; GUILLEMIN et al., 2011; GRABEZ et al., 2015), Hsp40 (BERNARD et

al., 2007; BACHI & BONALDI, 2008), Hsp27 (MORZEL et al., 2008; D'ALESSANDRO et al., 2012; CARVALHO et al., 2014),  $\alpha$ -cristalina (GUILLEMIN et al., 2011; POLATI et al., 2012) e outras proteínas chaperonas (GUILLEMIN et al., 2011; PICARD & GAGAOUA, 2017).

Devido aos avanços recentes da proteômica e a disponibilidade de ferramentas de bioinformática, novos progressos na descoberta de biomarcadores vêm sendo realizados na identificação e caracterização de diversas proteínas relacionadas à maciez da carne, incluindo proteínas do metabolismo glicolítico, metabolismo oxidativo, estresse oxidativo, estruturais, proteínas de transporte e proteínas apoptóticas. Deste modo, os estudos proteômicos proporcionaram um aumento do conhecimento aplicado à maciez da carne bovina, confirmando o importante papel do metabolismo energético e proteólise miofibrilar (PICARD & GAGAOUA, 2017).

A avaliação e comparação de fenótipos extremos foram realizadas com sucesso para identificar genes e proteínas relacionadas com a maciez da carne em bovinos (PICARD et al., 2010; CARVALHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2017). Contudo, a identificação de marcadores associados com a maciez, são muitas vezes específicos para determinadas raças, condição ambiental ou tecido muscular. Assim, a importância da abordagem genética e proteômica em bovinos Nelore (*Bos indicus*) visa o aprofundamento dos conhecimentos referentes aos mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na transformação do músculo esquelético em carne e na identificação de possíveis marcadores biológicos para maciez da carne.

#### **4. Referências Bibliográficas**

ACNB – **Associação dos Criadores de Nelore do Brasil**. Histórico da Raça Nelore. Disponíveis em: [www.nelore.org.br/default3.asp](http://www.nelore.org.br/default3.asp)>2014. Acesso em: 30 março. 2016.

ANDRIGHETTO, C.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O.; SARTORI, D. R.; RODRIGUES, E.; BIANCHINI, W. Maturação da carne bovina (Ageing of meat beef). **REDVET Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 7, n. 6, p. 1-6, 2006.

BACHI, A.; BONALDI, T. Quantitative proteomics as a new piece of the systems biology puzzle. **Journal of Proteomics**, v. 71(3), p. 357-67, 2008.

BALAN, B.; KIM, Y. H. B.; BLIJENBURG, R. Small heat shock protein degradation could be an indicator of the extent of myofibrillar protein degradation. **Meat Science**, v. 97, p. 220–222, 2014.

BENDIXEN, E.; DANIELSEND, M.; HOLLUNG, K.; GIANAZZA, E.; MILLER, I. Farm animal proteomics: A review. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 282–293, 2011.

BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5229–5237, 2007.

BJARNADÓTTIR, S. G.; HOLLUNG, K.; FÆRGESTAD, E. M.; VEISETH-KENT, E. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48 h postmortem: shifts in energy status and myofibrillar stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7408–7414, 2010.

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nelore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, v. 96, p. 1318–1324, 2014.

CASSAR-MALEK, I.; GUILLEMIN, N.; HOCQUETTE, J. F.; MICOL, D.; BAUCHART, D.; PICARD, B.; JURIE, C. Expression of DNAJA1 in bovine muscles according to developmental age and management factors. **Animal**, v. 5, p. 867–874, 2011.



CÔNSOLO, N.; FERRARI, V.; MESQUITA, L.; GOULART, R.; SILVA, L. Zilpaterol hydrochloride improves beef yield , changes palatability traits , and increases calpain-calpastatin gene expression in Nellore heifers. **Meat Science**, v. 121, p. 375–381, 2016.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; GIUSTI, J.; SILVEIRA, A. C.; MARTINS, C. L.; OLIVEIRA, H. N. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*–*Bos indicus* cross beef cattle. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 915-920, 2010.

DALESSANDRO, A.; RINALDUCCI, S.; MARROCCO, C.; ZOLLA, V.; NAPOLITANO, F.; ZOLLA, L. Love me tender: an omics window on the bovine meat tenderness network. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4360–4380, 2012.

D’ALESSANDRO, A. & ZOLLA, L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 558-577, 2013.

DI LUCA, A.; MULLEN, A. M.; ELIA, G.; DAVEY, G.; HAMILL, R. M. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. **Meat Science**, v. 88, p. 261–270, 2011.

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.

FONSECA, L. F. S.; GIMENEZ, D. F. J.; SILVA, D. B. S.; BARTHELSON, R.; BALDI, F.; FERRO, J. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. **BMC Genomics**, v. 18, 2017.

GEESINK, G. H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A. H.; KOOHMARAIE, M. Micro-calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2834–2840, 2006.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.

GIUSTI, J.; CASTAN, E.; DAL PAI, M.; ARRIGONI, M. D. B.; BALDIN, S. R.; DE OLIVEIRA, H. N. Expression of genes related to quality of *Longissimus dorsi* muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) cattle. **Meat Science**, v. 94, p. 247-252, 2013.

GOBERT, M.; SAYD, T.; GATELLIER, P.; SANTÉ-LHOUELIER, V. Application to proteomics to understand and modify meat quality. **Meat Science**, v. 98, p. 539–543, 2014.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system, Muscle Biology Group, **University of Arizona**, 2003.

GRABEZ, V.; KATHRI, M.; PHUNG, V.; MOE, K.M.; SLINDE, E.; SKAUGEN, M.; SAAREM, K.; EGELANDSDAL, B. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 1967–1979, 2015.

GUILLEMIN, N.; BONNET, M.; JURIE, C.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, v. 5, p. 885-894, 2011.

HOCQUETTE, J. F.; BOTREAU, R.; PICARD, B.; JACQUET, A.; PETHICK, D. W.; SCOLLAN, N. D. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, v. 92, p. 197-209, 2012.

HOLLUNG, K. & VEISETH-KENT, E. Omics Technologies: Tools for food science. Nouredine Benkeblia, **University of the West Indies**, Kingston, Jamaica. CRC Press, p. 313-338, 2012.

HUANG, Z.; CHEN, X.; CHEN, D. Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. **Cellular Signalling**, v. 23, p. 1441-1446, 2011.

HUFF-LONERGAN, E.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D. D.; PARRISH, F. C.; OLSON, D. G.; ROBSON, R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 993-1008, 1996.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle: lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, p. 184–195, 2010.

KENT, M. P.; SPENCER, M. J.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 794-801, 2004.

JIA, X., VEISETH-KENT, G.; GROVE, H.; KUZIORA, P.; AASS, L.; HILDRUM, K. I.; HOLLUNG, K. Peroxiredoxin-6—A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 2391-2399, 2009.

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.

LANA, A. & ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 85-97, 2016.

LARKINS, N. T.; MURPHY, R. M.; LAMB, G. D. Influences of temperature, oxidative stress, and phosphorylation on binding of heat shock proteins in skeletal muscle fibers. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 303, p. 654–665, 2012.

LIMA JUNIOR, D. M. de; RANGEL, A. H. do N.; URBANO, S. A.; MACIEL, M. do V.; AMARO, L. P. de A. Alguns aspectos qualitativos da carne bovina: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 351-358, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2. CT method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOMIWES, D.; FAROUK, M. M.; FROST, D. A.; DOBBIE, P. M.; YOUNG, O. A. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. **Meat Science**, v. 95, p. 472-479, 2013.

LOMIWES, D.; HURST, S. M.; DOBBIE, P.; FROST, D. A.; HURST, R. D.; YOUNGC, O. A.; FAROUK, M. M. The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins. **Meat Science**, v. 97, p. 548-557, 2014.

LONERGAN, E. H.; ZHANG, W.; LONEERGAN, S. M. Biochemistry of post mortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, p. 184, 2010.

MAYER, M. & BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 670–684, 2005.

MIR, N .A.; RAFIQ, A.; KUMAR, F.; SINGH, V.; SHUKLA, V. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, p. 2997-3009, 2017.

MORZEL, M.; TERLOUW, C.; CHAMBON, C.; MICOL, D.; PICARD, B. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d'Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, v. 78, p. 297-304, 2008.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 44-58, 2006.

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.; BERRI, C.; LEFAUCHEUR, L.; MOLETTE, C.; SAYD, T.; TERLOW, C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, p. 259–278, 2010.

PICARD, B.; LEBRET, B.; CASSAR-MALEK, I.; LIAUBET, L.; BERRI, C.; LE BIHAN-DUVAL, E.; HOCQUETTE, J.F.; RENAND, G. Recent advances in omic technologies for meat quality management. **Meat Science**, v.109, p. 18–26, 2015.

PICARD, B. & GAGAOUA, M. "Proteomic Investigations of Beef Tenderness." Proteomics in food science: From farm 555 to fork. **Academic Publisher**, p. 177-197, 2017.

PINTO, L. F. B.; FERRAZ, J. B. S.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M.; CARVALHO, M. E., ALMEIDA, H. B.; SILVA, R. C. G. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1431–1442, 2010.

POLATI, R.; MENINI, M.; ROBOTTI, E.; MILLIONI, R.; MARENGO, E.; NOVELLI, E.; BALZAN, S.; CECCONI, D. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2052–2069, 2012.

PULFORD, D. J.; FRAGA VAZQUEZ, S.; FROST, D. F.; FRASER-SMITH, E.; DOBBIE, P.; ROSENVOLD, K. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. **Meat Science**, v. 79, p. 623–630, 2008.

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

RAYNAUD, F.; FERNANDEZ, E.; COULIS, G.; AUBRY, L.; VIGNON, X.; BLEIMLING, N.; GAUTEL, M.; BENYAMIN, Y.; OUALI A. Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. **Febs Journal**, v. 272, p. 2578-2590, 2005.

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.

RODRIGUES, R. T. S.; CHIZZOTTI, M. L.; VITAL, C. E.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; BARROS, E.; BUSATO, K. C.; GOMES, R. A.; LADEIRA, M. M.; MARTINS, T. S. Differences in Beef Quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. **PLoS ONE**, v. 12, 2017.

SMIRNOVA, K. S.; MAIERA, T. V.; WALKERA, A.; HEINZMANN, S. S.; FORCISI, S.; MARTINEZ, I., WALTERB, J.; SCHMITT-KOPPLINA, P. Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, p. 266-279, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and poultry: world markets and trade [Internet]. USDA; [updated 2017 Apr; cited 2017 June 25]. [http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)

VALROS, A.; MUNSTERHJELM, C.; PUOLANNE, E.; RUUSUNEN, M.; HEINONEN, M.; PELTONIEMI, O. A.; PÖSÖ, A. R. Physiological indicators of stress and meat and carcass characteristics in tail bitten slaughter pigs. **Acta Vet Scand.**, v. 30, p. 55-75, 2013.

VOSS, O. H.; BATRA, S. KOLATTUKUDY, S. J.; GONZALEZ-MEJIA, M.; SMITH, J. B.; DOSEFF, A. I. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 25088–25099, 2007.

XING, T.; WANG, M. F.; HAN, M. Y.; ZHU, X. S., XU, X. L.; ZHOU, G. H. Expression of heat shock protein 70 in transport-stressed broiler pectoralis major muscle and its relationship with meat quality. **Animal**, v. 12, p. 1-9, 2017.

YANG, Y. B.; PANDURANGAN, M.; HWANG, I. Changes in proteolytic enzymes mRNAs and proteins relevant for meat quality during myogenesis and hypoxia of primary bovine satellite cells. **Animal**, v. 48, p. 359–368, 2012.

YOUNG, J. C.; AGASHE, V. R.; SIEGERS, K.; HARTL, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 781–791, 2004.

YU, J.; BAO, E.; YAN, J.; LEI, L. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. **Cell Stress Chaperon**, v. 13, p. 327–35, 2008.

ZHANG, M.; LIU, Y. L.; FU, C. Y.; WANG, J.; CHEN, S. Y.; YAO, J. Expression of MyHC genes, composition of muscle fiber type and their association with intramuscular fat, tenderness in skeletal muscle of Simmental hybrids. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 833-840, 2014.

ZHANG, M.; WANG, D.; GENG, Z.; SUN, C.; BIAN, H.; XU, W.; ZHU, YONGZHI, LI, P. Differential expression of heat shock protein 90, 70, 60 in chicken muscles postmortem and its relationship with meat quality. **Ausin-Australas Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 94-99, 2017.



## **CHAPTER 2 – Association of *CAST2*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes with meat tenderness in Nellore cattle**

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the association of expression of *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes with meat tenderness in Nellore cattle. Three experimental groups were selected by shear force (SF): moderately tender (SF = 34.3 ± 5.8 N), moderately tough (SF = 56.8 ± 7.8 N), and very tough meat (SF = 80.4 ± 15 N). Gene expression was evaluated by real-time PCR. Expression of the *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST* and *CAST1* genes did not differ between groups. Expression of the *CAST2* was up-regulated ( $P < 0.05$ ) in the moderately tough and very tough meat groups. Down-regulation of the *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes ( $P < 0.05$ ) was observed in the moderately tender meat group. The present results suggest that meat tenderness in Nellore cattle does not directly depend on the expression of the *CAPN1* and *CAPN2* genes, but is associated with the expression of other genes such as *CAST2*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*.

**Keywords:** calpain complex, shear force, HSPs, RT-qPCR

**Published in Meat Science**

## 1. Introduction

The changes in consumers eating habits highlight the need for beef cattle farmers to provide tender meat in order to ensure the continuous growth of the industry (LIU et al., 2016). Biotechnological tools could be useful to identify potential biomarkers for the beef cattle breeding programs and selection of animals that permit the production of tender meat (Ouali et al., 2013). Genes belonging to the calpain complex (*CAPN1*, *CAPN2* and *CAST*) have been shown to play an important role in meat tenderness (Pinto et al., 2010; Guillemin et al., 2011). The  $\mu$  and m-calpain are calcium-dependent cysteine proteases that are involved in the decomposition of myofibrillar proteins and consequent meat tenderization (GOLL et al., 2003). Calpastatin and its four isoforms (*CAST*, *CAST1*, *CAST2*, *CAST3*, and *CAST4*), which are also controlled by calcium, act as endogenous inhibitors of the proteolytic activity of calpains (Raynaud et al., 2005; C nsolo, Ferrari, Mesquita, Goulart, & Silva, 2016). However, meat tenderness is a complex trait that, in addition to calpains and its inhibitor calpastatin, involves an intrinsic network of structural proteins, proteases and heat shock proteins (HSPs), a fact hampering the understanding of their respective functions (LANA; ZOLLA, 2016). Thus, the gene and protein expression of HSPs may also be associated with meat tenderization (Yang, Pandurangan, & Hwang, 2012; Ouali et al., 2013; Baldassini et al., 2015).

Heat shock proteins (HSPs) are induced in response to heat stress. These proteins exert an antiapoptotic function and can also be activated to protect cellular proteins against denaturation (K LTZ, 2003). HSPs are classified into subfamilies based on their molecular weight (kDa): Hsp90, Hsp70, Hsp40, and Hsp27. Some of these proteins act as chaperones during protein assembly, protein folding and unfolding, and refolding of damaged proteins (MARQUES et al., 2007).

Despite this knowledge, the role of HSPs in meat tenderness needs to be further investigated in order to introduce possible biomarkers that could contribute to the selection of quality meat-producing animals (Guillemin, Bonnet, Jurie, & Picard, 2011; Avil s, Mart nez, Domenech, & Pe na, 2015). In this respect, some studies have reported an association of the *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* proteins with meat tenderness in *Bos taurus* cattle (Picard et al., 2010; Guillemin

et al., 2011; Guillemin, Bonnet, Jurie, & Picard, 2011). However, there are no studies evaluating the association of genes expression of the HSP family with meat tenderness in Nellore cattle. Therefore, the objective of this study was to analyze the association of the expression of calpain complex genes (*CAPN1*, *CAPN2* and *CAST*) and the expression of the genes encoding HSPs (*HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*) with meat tenderness in Nellore cattle.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Production of experimental animals and sample collection

A population of 90 contemporaneous uncastrated, male Nellore animals was used. The animals were from a single farm that uses a continuous pasture system and had a mean initial weight of  $390 \pm 37$  kg and age of approximately 24 months. The finishing period in the Experimental Feedlot of Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Botucatu, SP, Brazil, lasted 95 days. The procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of FMVZ, Unesp, Botucatu/SP (Protocol No. 159/2014).

All animals were given the same diet, housing and management. The animals were treated with anthelmintics, weighed, and randomly allocated to 18 collective pens with 5 animals/pen before the beginning of the feedlot period. The animals received a diet twice a day consisting of sugarcane bagasse (9.4%), sunflower meal (69.24%), ground corn (17.93%), urea (0.64%), mineral supplement (2.17%), and Optigen (0.60%).

The animals were sent for slaughter at a final weight of approximately  $550 \pm 75$  kg and 27 months of age and were slaughtered on the same batch of slaughter in accordance with guidelines for the Humane Slaughter of Cattle. During slaughter, the carcasses were properly identified and weighed and *Longissimus thoracis* muscle samples were collected and stored in RNAlater® solution (Ambion, ThermoFisher Scientific, USA) at  $-80$  °C for the gene expression assays. Next, the carcasses were cooled for 24 h and 2.54 cm thick *Longissimus thoracis* muscle samples were collected between the 12<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> rib of the left half-carcass of each animal for shear force (SF) analysis.

## 2.2. Warner-Bratzler shear force analysis and selection of the experimental groups

The meat samples were cooked in a pre-heated oven at 170 °C until they reached an internal temperature of 71 °C and cooled for 12 h at 1 °C. Half-inch cylinders were cut longitudinally from the center of the sample in the direction of the muscle fiber. The cylinders were cut with a Salter Warner-Bratzler Shear Force device with a capacity of 25 kg at a velocity of 20 cm/minute. Eight measurements were obtained per sample (WHEELER; KOOHMARAIE; SHACKELFORD, 1995).

Based on the SF measurement of the 90 *Longissimus thoracis* muscle samples, three contrasting meat tenderness groups were selected: moderately tender meat ( $34.3 \pm 5.8$  N; n = 6), moderately tough meat ( $56.8 \pm 7.8$  N; n = 7), and very tough meat ( $80.4 \pm 15$  N; n = 7).

## 2.3. Real-time PCR analysis (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the three experimental groups by homogenization of 100 mg *Longissimus thoracis* muscle in 1 mL TRIzol® according to manufacturer instructions (Life Technologies Corporation, USA). The concentration, purity and integrity of the extracted total RNA were evaluated in a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA, 2007) and by agarose gel electrophoresis. Genomic DNA was eliminated using the DNA-se TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, USA) and the absence of genomic DNA was confirmed with the Qubit dsDNA Assay Kit (Invitrogen, USA). cDNA was synthesized using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit according to manufacturer instructions (Life Technologies Corporation, USA). Eight probes and six primers were used in the RT-qPCR assays (Table 1). The stability of the reference genes was evaluated with GeNorm™ and NormFinder© softwares. The RT-qPCR assays were performed in duplicate using the QuantStudio 12K Flex system (Applied Biosystems). For the probes, each sample of cDNA was amplified by TaqMan® Universal PCR Mater Mix (Thermo Fisher Scientific, USA, 2007) and for the primers the samples of cDNA were amplified by Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA, 2007) according to manufacturer instructions.

The primers were designed through Primer Express 3.0.1. (Thermo Fisher Scientific, USA, 2007) and produced by Sinapse Biotecnologia Ltda.

**Table 1.** TaqMan® probes and primers used for the RT-qPCR assays.

<b>Gene (GenBank ID)</b>	<b>TaqMan® probe</b>	<b>Manufacturer</b>
<i>CAPN1</i> (281664)	Bt03223357_m1	Thermo Fisher
<i>CAPN2</i> (281662)	Bt03817738_m1	
<i>HSPB1</i> (516099)	Bt03220563_m1	
<i>HSP90AA1</i> (281832)	Bt03218068_g1	
<i>DNAJA1</i> (528862)	Bt03219626_g1	
<i>GAPDH</i> (281181)	Bt03210915_g1	
<i>TBP</i> (516578)	Bt03241947_m1	
<i>ACTB</i> (280979)	Bt03279175_g1	
<b>Gene (GenBank ID)</b>	<b>Primer sequence (5' – 3')</b>	<b>Manufacturer</b>
<i>CAST</i> (281039)	F: ATGAGGAAACAGTCCCATCG	Sinapse Biotecnologia
	R: GGGCTTGGGTTTTTCTTCAG	
<i>CAST 1</i> (NM_001030318.2)	F: CACCCAGGAGCATGTCAGTA	
	R: ACTGCTCCCAAGGCTTGTT	
<i>CAST 2</i> (NM_174003.2)	F: TGCAAGCTGGTGGTACAAGA	
	R: GAGAGCTGACTGCTCCCAAG	
<i>EEF1A2</i> (515233)	F: GCAGCCATTGTGGAGATG	
	R: ACTTGCCCGCCTTCTGTG	
<i>GAPDH</i> (281181)	F: GAAATCGCCAATGCCAAC	
	R: GAGCCTTGTCTGCCTTCA	
<i>RPL-19</i> (510615)	F: CCGTTCGACAGATAGCCGTAA	
	R: CGACCTTCACCATCTTGTCTCA	

F: forward; R: reverse.

#### 2.4. Statistical analysis

The data were analyzed with the SAS statistical program (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2011). The gene data obtained with the TaqMan® probe and primers were analyzed separately. For normalization of the data, the geometric

mean of the cycle threshold (Ct) value obtained for three reference genes (*GAPDH*, *TBP* and *ACTB*) was used as suggested by Vandesompele et al., (2002). The relative expression of the target genes (*CAPN1*, *CAPN2*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*) was calculated as proposed by Steibel, Poletto, Coussens, & Rosa, (2009). The geometric mean of the Ct value of three other reference genes (*EEF1A2*, *GAPDH* and *RPL-19*) was obtained for normalization and relative expression analysis of the *CAST*, *CAST1* and *CAST2* genes. The following model was used for the quantification of relative gene expression:

$$Y_{gijk} = G_{ig} + M_{gk} + D_{ik} + e_{igk},$$

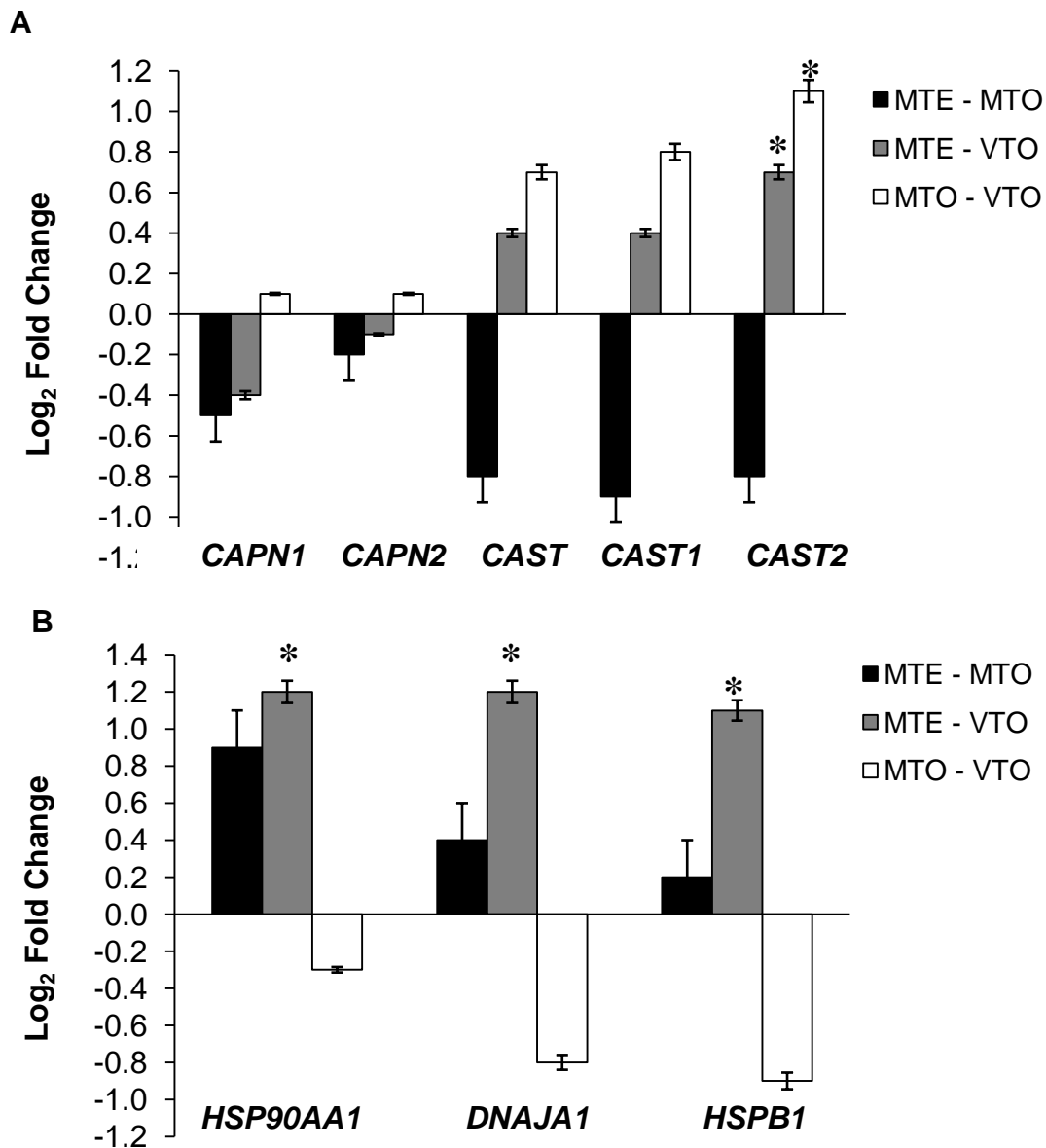
where  $Y_{gijk}$  = Ct obtained with the software of the thermocycler for gene  $g$  (geometric mean of the reference genes and target gene), in well  $tr$  of the plate (technical replicate) for the sample of animal  $k$  of group  $i$ ;  $G_{ig}$  = effect of group  $i$  on the expression of gene  $g$ ;  $M_{gk}$  = specific effect of gene  $g$  on meat tenderness of animal  $k$ ;  $D_{ik}$  = specific effect of the sample;  $e_{igk}$  = residual effect.

### 3. Result and Discussion

Although an association between meat tenderness and calpain genes has been reported in cattle (BARENDSE et al., 2008), no significant difference in the expression of the *CAPN1* and *CAPN2* genes that encode  $\mu$ - and m-calpain was observed between the different meat tenderness groups of Nellore animals (Figure 1). Similar results have been reported by Smith, Thomas, Bidner, Paschal, & Franke, (2009) who found no significant difference in the *CAPN1* genotype between Brahman animals with low SF (3.68 kg) and high SF (9.65 kg). Likewise, Casas et al., (2006) observed no effect of the *CAPN1* gene on meat tenderness in *Bos indicus* animals. However, in the same study, the authors found a positive effect of the *CAPN1* gene on meat tenderness in *Bos taurus* animals (CASAS et al., 2006).

These results suggest that the expression levels of *CAPN1* and *CAPN2* genes do not exert a direct effect on meat tenderness in Nellore animals. According to genome-wide associations studies (GWAS), the Nellore breed (*Bos indicus*) possibly possesses different metabolic pathways related to meat quality,

which have not been observed in *Bos taurus* breeds (TIZIOTO et al., 2013). Thus, the controversies between studies indicate inconsistencies regarding calpain mRNA activity and the phenotypic trait of meat tenderness in Nellore animals.



**Figure 1.** Relative expression ( $\text{Log}_2$  Fold Change) of genes in *Longissimus thoracis* muscle of Nellore animals belonging of groups moderately tender meat (MTE), moderately tough meat (MTO), very tough meat (VTO). A = calpain complex genes (*CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *CAST1* and *CAST2*). B = heat shock protein genes (*HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*). \*Significant difference ( $P < 0.05$ ).

Regarding the calpastatin genes, the expression of the *CAST2* isoform was significantly up-regulated ( $P<0.05$ ) in the moderately tough and very tough meat groups when compared to the moderately tender meat group. On the other hand, expression of the *CAST* and *CAST1* genes did not differ significantly between the experimental groups (Figure 1). This result corroborates the findings of Tang et al. (2010) who observed differences in SF values between pigs fed different diets, while no difference was found in the expression of the *CAST* gene. In contrast, in another study on pigs, Li et al. (2009) observed differences in the expression of *CAST* isoforms. In the study of Muroya et al. (2012), the expression of these isoforms also showed a distinct behavior in cattle and expressions levels were dependent on the type of muscle. Thus, the *CAST* gene isoforms apparently exhibit differential expression patterns in skeletal muscle, which possibly results in distinct inhibitory modulation of calpain and therefore may influence meat tenderness differently.

In the *postmortem* process, calpastatin acts as an endogenous inhibitor of the proteolytic activity of calpains (Raynaud et al., 2005; C nsolo et al., 2016). The present results suggest that the expression of *CAST2* isoform is negatively involved in meat tenderness in Nellore cattle. However, the lack of association between *CAPN1* and *CAPN2* gene expression levels and meat tenderness shows the complexity of the mechanisms that occur during the tenderization phase. Thus, some aspects of the effect or association of the expression of calpain system gene with meat tenderness in Nellore animals suggest that, in addition to this complex, tenderness depends on other metabolic pathways that involve different genes.

The *HSP90AA1* and *DNAJA1* genes, which encode Hsp90-alpha and Hsp40, respectively, were down-regulated in the moderately tender meat group compared to the very tough meat group ( $P<0.05$ ) (Figure 1). These results suggest that the expression of *HSP90AA1* and *DNAJA1* is negatively associated with meat tenderness in Nellore animals.

The results of this study corroborate the findings of Bernard et al. (2007) who identified the *DNAJA1* gene in *Longissimus thoracis* muscle of Charolais cattle, with lower expression in samples of high-quality meat (tenderness, flavor and juiciness). The *DNAJA1* gene encodes Hsp40, a co-chaperone of Hsp70. The Hsp40/Hsp70 complex possesses antiapoptotic activity and is involved in the preservation of cellular functions and in the repair of damaged protein structures



(Arrigo, 2005; Picard et al., 2010; Guillemin et al., 2011). This specific function of Hsp40 is probably responsible for the negative association of *DNAJA1* gene expression with meat tenderness in Nellore cattle observed in this study.

The *HSPB1* gene expression levels, which encodes Hsp27, was also down-regulated in the moderately tender meat group compared to the very tough meat group ( $P < 0.05$ ), demonstrating a negative association of its expression with meat tenderness. The present results corroborate the recent findings of Baldassini et al. (2015) who observed a trend towards lower expression of Hsp27 protein in Nellore animals with tender meat. According to Picard et al. (2016), knock-out of the *HSPB1* gene results in a reduction of  $\alpha$ -actin. This myofibrillar protein is considered one of the targets of *postmortem* proteolysis.

Kim et al., (2008) observed an increase in Hsp27 protein expression in native Korean cattle. In that study, higher levels of Hsp27 protein expression were correlated with high SF values, suggesting that the negative regulation of Hsp27 may increase the degradation of muscle proteins such as actin and myosin and consequently improve meat tenderness. Thus, although the function of HSPs during the *postmortem* period is not fully understood, these proteins appear to interact with the calpain complex and caspases and could therefore negatively influence the tenderness of beef (LANA; ZOLLA, 2016).

According to the results of this study, meat tenderness in Nellore cattle does not directly depend on the expression of the *CAPN1* and *CAPN2* genes, as widely reported in studies involving other cattle breeds. Meat tenderness in this breed seems to depend on the expression and modulation of other genes such as the calpastatin isoform (*CAST2*) and HSPs (*HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*). Evidence in the literature suggests that the proteolytic activity of  $\mu$ -calpain is influenced by the inhibitory regulation of HSPs according to the pH of meat. In the study of Lomiwes, Farouk, Frost, Dobbie, & Young, (2013), beef with an intermediate pH (5.8 – 6.19) exhibited lower proteolytic activity of  $\mu$ -calpain and cathepsin B, which may have coincided with the increase in HSP expression. Therefore, a more in-depth study of gene expression and of the relationship and interaction of genes of the calpain complex, HSPs and myofibrillar proteins is needed to aid the understanding of meat tenderness and to permit the identification of biomarkers and application of this information in Nellore breeding programs.

Finally, despite the confirmation of the association of *CAST2* gene polymorphisms with meat tenderness in Nellore cattle (Enríguez-Valencia et al., 2017), this is the first study to demonstrate an association of the expression of *CAST2* and HSP (*HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1*) genes with meat tenderness in this breed.

#### 4. Conclusion

Meat tenderness in Nellore cattle apparently does not depend directly on the expression of the *CAPN1* and *CAPN2* genes, but is rather associated with the expression and modulation of other genes such as *CAST2* and genes encoding some members of the HSP family (*HSP90AA1*, *DNAJA1*, and *HSPB1*).

#### Acknowledgments

The authors thank the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/13021-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

#### 5. References

ARRIGO, A.-P. In Search of the Molecular Mechanism by Which Small Stress Proteins Counteract Apoptosis During Cellular Differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, p. 241–246, 2005.

AVILÉS, C. et al. Effect of feeding system and breed on growth performance , and carcass and meat quality traits in two continental beef breeds. **Meat Science**, v. 107, p. 94–103, 2015.

BALDASSINI, W. A. et al. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed ( *Bos indicus* ). **Meat Science**, v. 169, p. 65–72, 2015.

BARENDSE, W. et al. in zebu and composite breeds of cattle. **BMC Genetics**, v. 9, n. 41, p. 1–8, 2008.

BERNARD, C. et al. New Indicators of Beef Sensory Quality Revealed by Expression of Specific Genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5229–5237, 2007.

CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 520–525, 2006.

CÔNSOLO, N. et al. Zilpaterol hydrochloride improves beef yield , changes palatability traits , and increases calpain-calpastatin gene expression in Nellore heifers. **Meat Science**, v. 121, p. 375–381, 2016.

GOLL, D. E. et al. The Calpain System. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 731–801, 2003.

GUILLEMIN, N. et al. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, v. 5, n. 6, p. 885–894, 2011a.

GUILLEMIN, N. et al. Functional analysis of beef tenderness. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 352–365, 2011b.

KIM, N. K. et al. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 1068–1073, 2008.

KÜLTZ, D. Review Evolution of the cellular stress proteome : from monophyletic origin to ubiquitous function. **The Journal of Experimental biology**, v. 206, p. 3119–3124, 2003.

LANA, A.; ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 85–97, 2016.

LI, Z. et al. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Decreased expression of calpain and calpastatin mRNA during development is highly correlated with muscle protein accumulation in neonatal pigs. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 152, n. 4, p. 498–503, 2009.

LIU, J. et al. Protein Profiles for Muscle Development and Intramuscular Fat Accumulation at Different Post-Hatching Ages in Chickens. **PlosOne**, v. 11, n. 8, p. 1–19, 2016.

LOMIWES, D. et al. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pH u beef. **Meat Science**, v. 95, n. 3, p. 472–479, 2013.

MARQUES, C. et al. NIH Public Access. **NIH pUBLIC aCCES**, v. 20, n. 6, p. 741–743, 2007.

MUROYA, S. et al. Differences in mRNA expression of calpains , calpastatin isoforms and calpain / calpastatin ratios among bovine skeletal muscles. **Science Journal**, v. 83, p. 252–259, 2012.

OUALI, A. et al. Biomarkers of meat tenderness: Present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 854–870, 2013.

PICARD, B. et al. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 259–278, 2010.

PICARD, B. et al. Calcium Homeostasis and Muscle Energy Metabolism Are Modified in HspB1-Null Mice. **Proteomes**, v. 4, n. 2, p. 17, 2016.

PINTO, L. F. B. et al. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1431–1442, 2010.

RAYNAUD, P. et al. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms &. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 440, p. 46–53, 2005.

SMITH, T. et al. Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 39–46, 2009.

STEIBEL, J. P. et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.

TANG, R. et al. Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of I-calcain and calpastatin in muscle of finishing pigs. **Meat Science**, v. 85, n. 4, p. 768–771, 2010.

TIZIOTO, P. C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 21, p. 1012–1020, 2013.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement. 1995.

YANG, Y. B.; PANDURANGAN, M.; HWANG, I. H. Changes in proteolytic enzymes mRNAs and proteins relevant for meat quality during myogenesis and hypoxia of primary bovine satellite cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 48, n. 6, p. 359–368, 2012.

### **CAPÍTULO 3 - Abordagem proteômica na caracterização de marcadores biológicos para qualidade da carne de bovinos Nelore**

#### **Resumo**

O presente trabalho descreve a associação da maciez da carne com a expressão de proteínas do músculo esquelético de bovinos da raça Nelore. A partir de uma população de 90 animais foram selecionados três grupos experimentais de carne moderadamente macia, moderadamente dura e muito dura, por meio da análise de força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI). A análise proteômica foi realizada com base na separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e caracterização por espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS/MS). As enzimas metabólicas TPI e PGM1, proteína estrutural PFN1 e aminiopeptidase LAP3 se mostraram *up regulated* ( $P < 0.05$ ) no grupo de carne moderadamente macia, enquanto que a expressão das proteínas estruturais (ACTA1, ACTB, ACTG1 e MLC1), estresse oxidativo (PRDX6, PRDX2, PRDX1 and PARK7), proteínas de choque térmico (HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPD1 e HSPB1), e co-chaperonas e regulação celular (CD37, STIP1 e ARHGDIA) se mostraram *down regulated* ( $P > 0.05$ ) no mesmo grupo experimental. Os resultados evidenciaram que a maciez da carne de bovinos Nelore depende da modulação e expressão de um conjunto de proteínas pertencentes a distintas vias metabólicas além de sugerir a PFN1, LAP3, PRDX1, PRDX2, HSPD1 e ARHGDIA como possíveis marcadores biológicos relacionados ao amaciamento da carne de bovinos.

**Palavras-chave:** carne bovina, força de cisalhamento, Hsps, 2D-PAGE

## 1. Introdução

A maciez é considerada a característica mais importante de qualidade da carne e as proteínas são as moléculas fundamentais na regulação das mudanças metabólicas para conversão do músculo em carne. Desta maneira, estudos recentes vêm utilizando ferramentas como a proteômica para compreender a engenharia bioquímica envolvida no processo de desnaturação protéica no período *postmortem* (PICARD & GAGAOUA, 2017).

Como resultado, distintas proteínas têm sido destacadas como biomarcadores candidatos com efeitos significativos na maciez da carne (D'ALESSANDRO et al., 2012; PICARD et al., 2014; BALDASSINI et al., 2015; LANA & ZOLLA, 2016; PICARD et al., 2016; PICARD & GAGAOUA, 2017; ROSA et al., 2018). Dentre estas, as proteínas de choque térmico (Hsps), proteínas antioxidantes, metabólicas e estruturais do músculo esquelético tem sido relacionadas como marcadores moleculares para a maciez da carne bovina (GUILLEMIN et al., 2011; PICARD & GAGAOUA, 2017; ROSA et al., 2018).

As Hsps são chaperonas classificadas em subfamílias Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e Hsp20 e possuem função anti-apoptótica, que pode ser ativada para preservar as proteínas celulares contra a desnaturação proteolítica (KÜLTZ, 2003). A expressão e atividade de proteínas antioxidantes como Peroxirredoxina no período *postmortem* também protege as células do músculo esquelético contra o estresse oxidativo (GAGAOUA et al., 2015; FISHER, 2017) enquanto que, a actina e miosina são proteínas estruturais contráteis do músculo esquelético (PICARD & GAGAOUA, 2017).

Na raça Nelore, as proteínas Hsps como Hsp27 (*HSPB1*) e Hsp70 (*HSPA1B*), proteínas metabólicas como Enolase (*ENO*), Creatina quinase muscular (*CKM*), e Piruvato quinase (*PKM*) e proteínas estruturais como Cadeia leve de miosina (*MLC1*) e Troponina T (*TNNT*) tem sido associadas com a maciez da carne (CARVALHO et al., 2014; BALDASSINI et al., 2015; ROSA et al., 2018).

A abordagem proteômica para a caracterização de proteínas nos estudos da maciez da carne de bovinos Nelore geralmente tem consistido na comparação de grupos extremos com menores e maiores valores de força de cisalhamento (FC) (CARVALHO et al., 2014; BALDASSINI et al., 2015). No entanto, a diferença

de expressão e associação de proteínas dos grupos extremos de maciez com grupos intermediários, ainda não tem sido avaliada.

O amaciamento da carne em bovinos é considerado um processo complexo, pois envolve centenas de proteínas em distintas vias metabólicas. Conseqüentemente, para maior compreensão e entendimento da engenharia bioquímica envolvida no amaciamento da carne de bovinos Nelore no período *postmortem*, tendo em vista às propriedades contráteis e metabólicas do músculo esquelético ser exclusiva de cada raça, é fundamental pesquisas adicionais com ferramentas biotecnológicas e metodologias de análise adequadas em diferentes grupos de maciez. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar e avaliar a associação do perfil proteômico do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore em distintos grupos de maciez da carne.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. População animal, colheita das amostras e seleção dos grupos experimentais**

Uma população de 90 animais contemporâneos, machos não castrados da raça Nelore foi utilizada. Os animais eram provenientes de uma única fazenda de sistema de pastejo contínuo com peso médio inicial (PI)  $390 \pm 37$  kg e idade aproximada de 24 meses. O período de terminação foi de 95 dias no Confinamento Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ, Unesp, Botucatu/SP, seguindo procedimentos aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu/SP sob protocolo número 159/2014.

Os animais foram vermífugados, pesados e distribuídos aleatoriamente em 18 baias coletivas, antes do início do confinamento. Todos os animais receberam a mesma dieta, gestão de habitação. A dieta foi composta por ração constituída de bagaço de cana de açúcar (9,4%), farelo de girassol (69,24%), milho triturado (17,93%), uréia (0,64%), núcleo mineral (2,17%) e optigen (0,60%) e ofertada duas vezes ao dia.

Os animais foram enviados ao abate com peso final (PF) de aproximadamente  $550 \pm 75$  kg e 27 meses de idade e abatidos de acordo com as



normas estipuladas para o Abate Humanitário de Bovinos. Durante o abate, as carcaças foram identificadas e refrigeradas por 24 horas. Posteriormente, amostras do músculo *Longissimus thoracis* de 2,54 cm de espessura entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas da meia carcaça esquerda de cada animal foram colhidas para realização das análises de força de cisalhamento (FC), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

As amostras de carne foram submetidas a dois tempos de maturação (24 horas e 07 dias após o abate) para análise de FC e MFI de acordo com a metodologia de Wheeler et al. (1995) e Chardulo et al. (2014), respectively. Com base na medição da FC e MFI das 90 amostras do músculo *Longissimus thoracis*, foram selecionados três grupos de ternura contrastantes: carne moderadamente macia, carne moderadamente dura e carne muito dura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Seleção dos grupos experimentais por meio das análises de força de cisalhamento (FC) e índice de fragmentação miofibrilar (MFI) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore.

	Moderadamente macia (n = 15)	Moderadamente dura (n = 20)	Muito dura (n = 15)
FC 24 horas (kg)	3,9 ± 0,7	5,6 ± 0,7	7,9 ± 1,4
FC 07 dias (kg)	3,4 ± 0,4	4,5 ± 0,4	5,9 ± 0,6
MFI 24 horas	55,7 ± 9,0	50,4 ± 13,9	40,1 ± 8,9
MFI 07 dias	65,9 ± 7,3	58,2 ± 13,2	44,8 ± 4,8

24 horas após o abate; 07 dias após o abate.

Após a separação dos grupos, as variáveis FC e MFI foram submetidas à estatística multivariada por meio da análise de componentes principais (CP) e selecionados os cinco primeiros componentes com representação em conjunto de 60% da variação total para compor cada subgrupo/pool experimental. Deste modo, os grupos foram subdivididos em subgrupos de carne moderadamente macia (M1, M2 e M3), moderadamente dura (MD1, MD2, MD3 e MD4) e muito dura (D1, D2 e D3), com cinco animais/cada.

## 2.2. Caracterização das proteínas 2D-PAGE

### 2.2.1. Preparação das amostras

Aproximadamente 2 g do músculo *Longissimus thoracis* de cada subgrupo (*pool*) foram triturados em 20 mL de água ultrapura com *Ultra-turrax* a 18.000 rpm (Marconi - MA102/E), e posteriormente foi realizada a centrifugação (10.000  $\times g$ , 4 °C por 10 min). Os extratos proteicos foram transferidos para novos microtubos, onde foram precipitados com solução de acetona gelada na proporção 1:4 vol/vol. As proteínas precipitadas foram centrifugadas (10.000  $\times g$ , 4 °C por 10 min) para remoção do sobrenadante e os *pellets* foram armazenados em freezer a -80 °C.

A concentração de proteína total foi determinada por meio da ressolubilização do *pellet* sem precipitação com acetona em NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup> pelo método do Biureto. Os *pellets* foram colocados em banho maria a 32 °C por 15 minutos e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 545 nm. A curva analítica de calibração foi construída com concentrações de 10 a 100 g.L<sup>-1</sup> a partir de uma solução estoque de albumina de soro bovino (100 g.L<sup>-1</sup>).

### 2.2.2. Corridas eletroforéticas (2D-PAGE) e tratamento das imagens

Seis *pellets* (géis) de cada subgrupo foram diluídos em solução de uréia contendo 7 mol L<sup>-1</sup>, 2 mol L<sup>-1</sup> tiourea, 2% (w/v), CHAPS (3-[(3-3-cholamidopropil)-]1-propanofonato), 0,5% (v/v) anfólitos de pH 3 a 10, 0,002% (w/v) azul de bromofenol e 2,8 mg de ditioneína (DTT). Posteriormente, para a focalização isoelétrica, os *pellets* foram aplicados em fitas de 13 cm contendo gel de poliacrilamida com anfólitos imobilizados a pH 3-10. Após este período, as corridas de primeira dimensão foram realizadas no equipamento Ettan™ IPGphor™ 3 (GE Healthcare), de acordo com o fabricante. Em seguida, as fitas foram reduzidas durante 15 minutos em uma solução de 6 mol L<sup>-1</sup> de uréia, 2% (w/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mmol de L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0,002% (w/v) azul de bromofenol e DTT a 2% (w/v) e alquiladas durante 15 minutos com uma solução similar, mas com substituição do DTT por 2,5% (w/v) de iodoacetamida (IAA).

Para a segunda dimensão, as fitas foram colocadas em gel de poliacrilamida (12,5% m/v), juntamente com o padrão de peso molecular na faixa

de 14,4 – 97,0 kDa. Após as corridas eletroforéticas, as proteínas foram fixadas com D-stain e reveladas com Coomassie coloidal. Os géis foram escaneados utilizando *ImageScanner III* (GE Healthcare) e as imagens analisadas por meio do programa *ImageMaster Platinum*, versão 7.0 (GE Healthcare).

### **2.2.3. Caracterização dos spots protéicos por Espectrometria de massas com ionização eletrospray (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 dos grupos experimentais (carne moderadamente macia, moderadamente dura, muito dura) 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 tríptica (incubado overnight a 37 °C com 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  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).

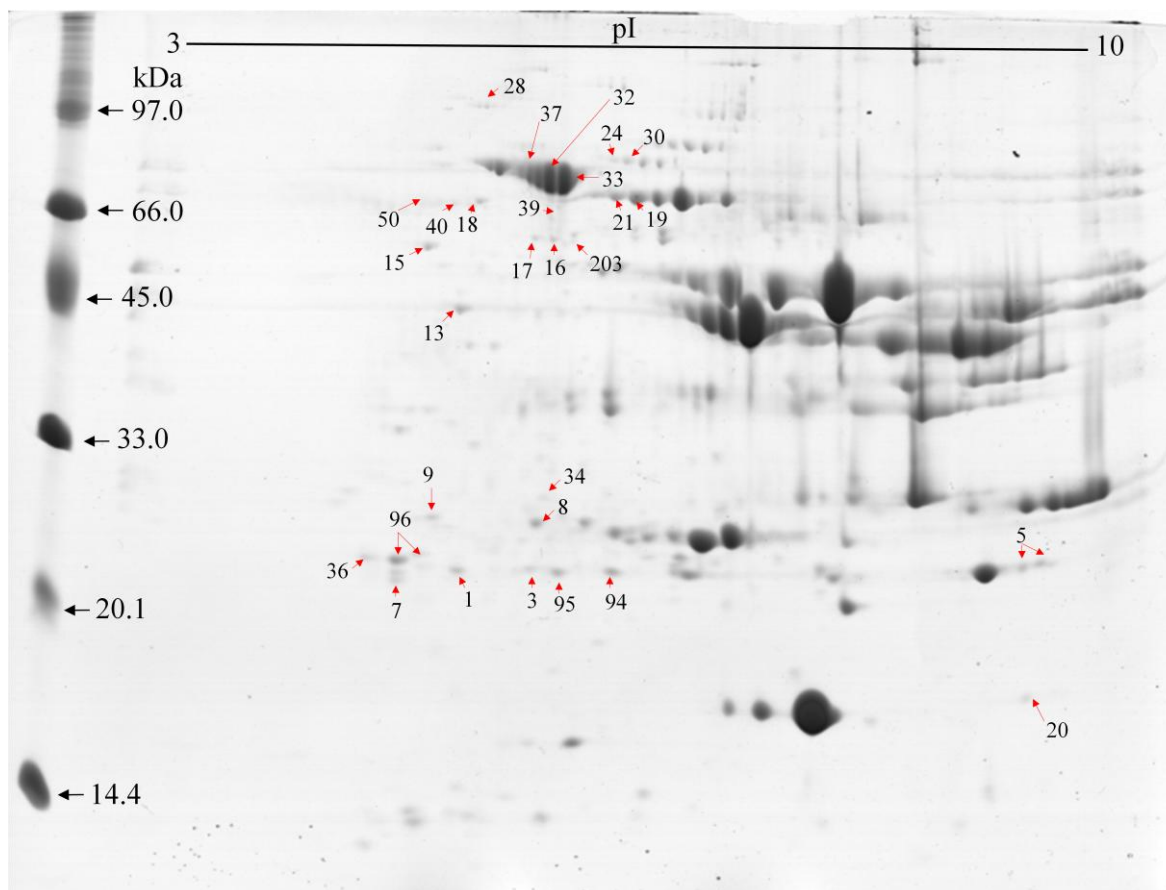
As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QT-MS (Waters, Manchester, UK). A identificação das proteínas foi obtida utilizando o banco de dados UniProt (UniProtKB/Swiss-Prot - [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))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

### 3. Resultados e Discussão

Os géis foram comparados em pares, devido ao tratamento de imagem ser processo laborioso. Após a identificação dos pontos equivalentes do processo de correspondência, foram obtidos os resultados da correlação entre os pares de géis dentro de cada subgrupo. A correlação entre as repetições de géis, abrangendo os três grupos experimentais de carne moderadamente macia, moderadamente dura e muito dura foram em média 96%, 91% e 93%, e o número médio de *spots* foram  $216,0 \pm 11,6$ ,  $222 \pm 12,9$  e  $224 \pm 10,4$ , respectivamente.

As correlações entre os *spots* protéicos foram estimadas por meio da análise das imagens, considerando a porcentagem de volume normalizado durante o processo de correspondência. As relações observadas entre os *spots* dos grupos de carne moderadamente macia e moderadamente dura ( $R > 0,82$ ), moderadamente macia e muito dura ( $R > 0,76$ ), e moderadamente dura e muito dura ( $R > 0,89$ ) descreveram a proximidade do perfil proteômico dos grupos.

A distribuição da diversidade de *spots* proteicos nos três grupos experimentais foi homogênea e apresentou-se distribuída no peso molecular ( $M_w$ ) entre 20,1 a 66 kDa e no ponto isoelétrico ( $pI$ ) entre 5 a 7 (Figura 1). Estes resultados corroboram a fração protéica observada por Bjarnadóttir et al. (2012) no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos jovens da raça Norwegian Red e por Baldassini et al. (2015) no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore.



**Figura 1.** Representação da fração protéica extraída do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore. Os números representam os *spots* excisados para a caracterização dos peptídeos por ESI-MS/MS.

Após a análise da diferença de expressão, 29 *spots* protéicos foram submetidos à caracterização dos peptídeos e 34 proteínas apresentaram diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Os maiores diferenciais de expressão foram observados entre as proteínas do metabolismo Triose fosfato isomerase (TPI1) e Fosfoglutamase 1 (PGM1); proteínas estruturais  $\alpha$ -actina (ACTA1),  $\beta$ -actina (ACTB),  $\gamma$ -actina (ACTG1), Cadeia leve de miosina 1/3, isoforma do musculo esquelético (MYL1), e Profilina 1 (PFN1); enzima proteolítica Citosol amino-peptidase (LAP3); proteínas do estresse oxidativo Peroxirredoxina 1 (PRDX1), 2 (PRDX2), 6 (PRDX6), Proteína Deglicase DJ-1 (PARK7); Inibidor de dissociação Rho-GDP 1 (ARHGDI1); proteínas de choque térmico Hsp90-alfa (HSP90AA1), Hsp90-beta (HSP90AB1), Hsp701A (HSPA1A), Hsp701B (HSPA1B), Hsp701L (HSPA1L), Hsp60 (HSPD1) e

Hsp27 (HSPB1); co-chaperona e proteínas regulatórias Hsp90 co-chaperona cdc37 (CDC37) e proteína induzida por estresse do tipo 1 (STIP1) (Tabela 2).

As proteínas envolvidas no metabolismo energético Triose fosfato isomerase (TPI1) e Fosfoglutamase 1 (PGM1) apresentaram-se *up regulated* ( $P < 0,05$ ) no grupo de carne moderadamente macia quando comparado aos grupos de carne moderadamente dura e muito dura. A importância das enzimas TPI1 e PGM1 na maciez da carne se deve a sua atividade no controle da presença de ATP, formação do complexo actomiosina e queda do pH muscular regulado pelo metabolismo energético. TPI1 está relacionada com a via da glicólise e é essencial para produção eficiente de energia, além de catalisar a conversão reversível de D-gliceraldeído 3-fosfato a partir do fosfato de di-hidroxiacetona. A PGM1 está envolvida na glicólise e gliconeogênese catalisando reversivelmente o conversor de glicose-1,6-bifosfato para glicose 6 fosfatina na presença de  $Mg^{2+}$  (ANDERSON et al., 2014). Dessa forma, as enzimas PGM1 e TPI1 foram propostas como potenciais biomarcadores da maciez da carne em raças *Bos taurus* (PICARD et al., 2010; ANDERSON et al., 2012; D'ALESSANDRO et al., 2012). O resultado da enzima TPI1 observado no presente também corrobora os resultados observados por Rosa et al. (2018) no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore. Além disso, o presente estudo identificou a enzima PGM1 em diferentes *spots* com distintos pI, o que sugere a presença de isoformas ou produtos proteolíticos.

A expressão dos *spots* das proteínas miofibrilares  $\alpha$ -actina (ACTA1),  $\beta$ -actina (ACTB),  $\gamma$ -actina (ACTG1), e MYL1 foram significativamente *down regulated* ( $P < 0,05$ ) nos grupos de carne moderadamente macia e moderadamente dura quando comparados ao grupo de carne muito dura. 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 *postmortem* 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, como observado neste trabalho, estudos tem relacionado maior expressão de MYL1 em carnes com menores graus de maciez (GUILLEMIN et al., 2011; ROSA et al., 2018). Por outro lado, a proteína estrutural Profilina 1 (PFN1) se mostrou *up regulated* ( $P < 0,05$ ) no grupo de carne moderadamente macia quando comparado aos demais grupos

experimentais. A PFN1 não tem sido relacionada em estudos com a maciez da carne. Segundo a literatura, em mamíferos a PFN1 se une a actina, acelera a troca de ADP para ATP e dessa forma afeta a estrutura do citoesqueleto (COURTEMANCHE & POLLARD, 2013). A regulação do ATP no *postmortem* esta diretamente relacionada com a formação do complexo actomiosina, o qual é um dos principais responsáveis pela conversão do músculo em carne, por tanto, a associação positiva da PFN1 com a maciez da carne observada neste trabalho pode ser devido a sua atuação sobre a actina, no entanto, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esta hipótese.

A enzima proteolítica Citosol amino-peptidase (LAP3) mostrou-se *up regulated* ( $P < 0,05$ ) nos animais de carne moderadamente macia quando comparada aos demais grupos experimentais. Estes resultados indicam a possível relação desta enzima com a proteólise miofibrilar. LAP3 é classificada como aminopeptidase, se localiza no lisossomo e se encontra envolvida no último estágio da degradação proteolítica por meio da quebra dos peptídeos em aminoácidos livres (PETROVA, et al., 2015), fato que poderia explicar a sua relação positiva com a maciez da carne observada neste trabalho. A expressão protéica da LAP3 também foi observada por Wu et al. (2015), no músculo *Semitendinosus* de Chinese *Luxi* yellow cattle e por Bax et al. (2013) no músculo *Longissimus dorsi* de suínos. No entanto, a relação desta proteína e a maciez da carne de bovinos ainda não tinha sido relatada.

Após a falência sanguínea, o músculo sofre uma série de alterações bioquímicas nos processos de *rigor mortis* e *postmortem*. O desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) a desintoxicação gera o estresse oxidativo, o qual inicia o processo de proteólise miofibrilar (LANA & ZOLLA, 2016). No entanto, existem proteínas antioxidantes que atuam contra a toxicidade das ROS (THOMAS et al., 2011). Algumas delas como Proteína Deglicase DJ-1 (PARK7), Peroxirredoxina 6 (PRDX6), 2 (PRDX2), 1 (PRDX1), teoricamente também auxiliam no processo de preservação das proteínas miofibrilares da carne nos animais Nelore dado que, no presente estudo, estas proteínas mostraram-se *up regulated* ( $P < 0,05$ ) nos animais de carne moderadamente dura e muito dura quando comparado ao grupo de carne moderadamente macio. Assim, estes resultados indicam que as proteínas

antioxidantes PARK7, PRDX6, PRDX2 e PRDX1 também estão negativamente associadas com a maciez da carne de bovinos da raça Nelore.

A proteína PARK7 possui o papel de sensor e protetor antioxidante contra a toxicidade do ROS (THOMAS et al., 2011), pois promove a expressão de enzimas mitocondriais envolvidas na sua remoção (GAGAOUA et al., 2015). Dessa forma, a PARK7 também tem sido relatada como *up regulated* no músculo *Longissimus* de outras raças bovinas durante o processo de amaciamento (POLATI et al., 2012; PICARD et al., 2014; GAGAOUA et al., 2015).

A atividade da proteína PRDX6 foi implicada em uma variedade de processos, incluindo o metabolismo, apoptose, maturação e maciez da carne (GAGAOUA et al., 2015; FISHER, 2017). Assim, os resultados observados neste trabalho para PRDX6 corroboram Guillemin et al. (2011), onde a PRDX6 apresentou correlação negativa com a maciez da carne. A PRDX2 e PRDX1 desempenham importante papel no estresse oxidativo na eliminação do peróxido produzido durante o metabolismo (PICARD & GAGAOUA, 2017). No entanto, estudos que relacionaram estas isoformas e a maciez da carne de bovinos são escassos na literatura. Este é o primeiro trabalho que relata a relação direta destas isoformas com a maciez da carne de bovinos Nelore.

No presente estudo, o Inibidor de dissociação Rho-GDP 1 (ARHGDIA) se mostrou *down regulated* nas amostras de carne moderadamente macia ( $P < 0,05$ ). Segundo Zhang et al. (2005) estas proteínas estão envolvidas na regulação do citoesqueleto e homeostase das Rho, além de desempenhar papel importante na regulação e proteção celular. Assim, o desempenho *down regulated* da proteína ARHGDIA pode estar associado com o aumento significativo da apoptose (RONG et al., 2012). Deste modo, a atuação *down regulated* da proteína anti-apoptótica ARHGDIA nas amostras de carne moderadamente macia possivelmente ocasionou maior degradação proteolítica das proteínas miofibrilares. No entanto, até o presente momento a proteína ARHGDIA não havia sido relacionada à maciez da carne e mais estudos referentes a associação da ARHGDIA e a maciez da carne ainda são necessários.

As proteínas de choque térmico Hsp90-alfa (HSP90AA1) e Hsp90-beta (HSP90AB1) foram observadas no mesmo *spot* protéico e apresentaram menor nível de expressão (*down regulated*) no grupo de carne moderadamente macia quando comparado aos grupos de carne moderadamente dura e muito dura



( $P < 0,05$ ). O menor nível de expressão de HSP90AA1 e HSP90AB1 no grupo de carne macia sugere que a expressão destas proteínas está negativamente associada com a maciez da carne de animais Nelore. Estes resultados corroboram os estudos de expressão gênica em animais Nelore de Malheiros et al. (2018). Os autores sugeriram que a expressão do gene *HSP90AA1* o qual codifica a Hsp90-alfa esta associada negativamente à maciez da carne. As proteínas da família de choque térmico (Hsps) possuem função anti-apoptótica e podem ser ativadas para preservar as proteínas celulares contra a desnaturação de proteínas estruturais (ZHANG et al., 2013; D'ALESSANDRO & ZOLLA, 2013). Segundo Di Luca et al. (2011), Wang et al. (2014) e Zhang et al. (2014), a diminuição da expressão de Hsp90 afeta a proteção das proteínas miofibrilares e favorece a maciez da carne. Deste modo, o menor nível de expressão das Hsps90 do grupo moderadamente macio observado neste trabalho, possivelmente permitiu maior proteólise miofibrilar e proporcionou o amaciamento da carne dos animais deste grupo experimental.

As proteínas da família da Hsp70 (HSPA1A, HSPA1B e HSPA1L) foram observadas em *spots* protéicos distintos e mostraram-se *down regulated* no grupo de carne moderadamente macia quando comparado aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). A expressão da proteína HSPA1A corrobora os resultados observados por Bjarnadóttir et al. (2012) e Carvalho et al. (2014), nos quais, esta proteína apresentou menor expressão nas amostras de carne macia no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Norwegian Red e Nelore, respectivamente.

O resultado encontrado para expressão protéica da HSPA1B no presente estudo vai ao encontro dos resultados de Baldassini et al. (2015), onde foi observado menor expressão desta proteína no grupo de carne macia de bovinos da raça Nelore. Por outro lado, as proteínas HSPA1A e HSPA1B identificadas na carne de bovinos da raça Maremmana (*Bos taurus*) apresentaram-se *up regulated* nas amostras de carne macia (D'ALESSANDRO et al., 2012). Apesar de alguma controvérsia, distintos estudos demonstraram associação da maciez com a expressão *down regulation* das Hsps da família 70 (BJARNADÓTTIR et al., 2012; CARVALHO et al., 2014). Deste modo, os resultados do presente estudo sugerem que a expressão *down regulated* das Hsp70 possa ter permitido o aumento da proteólise miofibrilar, levando ao fenótipo de carne moderadamente macia.

As proteínas Hsp90 co-chaperona cdc37 (CDC37) e proteína induzida por estresse do tipo 1 (STIP1) apresentaram maior nível de expressão proteica (*up regulated*) nos grupos de carne moderadamente dura e muito dura, quando comparado ao grupo de carne moderadamente macia ( $P < 0,05$ ). A proteína CDC37 auxilia a estabilização e estimulação da atividade do complexo anti-apoptótico da Hsp90, e a co-chaperona STI1 atua como adaptador entre as principais chaperonas, Hsp90 e Hsp70 (SCHOPF et al., 2017). Deste modo, levando em consideração os resultados observados de associação negativa das proteínas Hsp70 e Hsp90 com a maciez da carne, é possível inferir que as co-chaperonas CDC37 e STI1 foram induzidas por meio do estresse pós abate. Isso ampliou o alcance funcional das Hsps70 e 90, possibilitando a proteção e integridade das proteínas miofibrilares contra a degradação proteolítica, resultando em carnes com maior valor de força de cisalhamento.

A expressão da proteína Hsp60 (HSPD1) se mostrou *down regulated* para os animais de carne moderadamente macia e moderadamente dura, diferentemente do observado no grupo de carne muito dura ( $P < 0,05$ ). A Hsp60, conhecida por ser uma das mais importantes chaperonas moleculares, sob condições de estresse atuam em colaboração com as Hsp10/GroES e Hsp70 na proteção das proteínas miofibrilares (OKSALA et al., 2006). De acordo com Te Pas et al. (2013), em suínos Large White x Duroc a expressão *up regulated* da Hsp60 foi observada em animais que apresentaram maior perda por gotejamento. Porém, a expressão desta proteína se mostrou *down regulated* em frangos com maior perda por gotejamento (ZHANG et al., 2017). No entanto, é importante ressaltar que, apesar da sua importância em condições de estresse, a proteína HSPD1 ainda não havia sido relatada em estudos relacionados com a maciez da carne de bovinos.

A proteína Hsp27 (HSPB1) também se mostrou *down regulated* no grupo de carne moderadamente macia quando comparado aos demais grupos experimentais ( $P < 0,05$ ). Este achado ratifica resultados relatados na literatura, onde a expressão gênica (MALHEIROS et al., 2018) e proteica (KIM et al., 2008; GUILLEMIN et al., 2011) da Hsp27 (*HSPB1*) apresentaram associação negativa com a maciez da carne de bovinos. A proteína Hsp27, presente em distintas regiões celulares, responsiva ao estresse oxidativo e aumento da temperatura celular, age prioritariamente na regulação e estabilização das proteínas

miofibrilares como actina, desmina e titina dificultando a atividade de proteases nos processos de degradação miofibrilar (OUALI et al., 2013). Segundo Picard et al. (2016), o *knock-out* em camundongos do gene *HSPB1*, codificador da proteína Hsp27, resultou na diminuição da proteína miofibrilar  $\alpha$ -actina. Utilizando como modelo biológico cordeiro calpígio Cramer et al. (2018), demonstraram forte relação entre a concentração de Hsp27 e menor degradação das proteínas miofibrilares desmina e troponina T, com consequente aumento do força de cisalhamento no *postmortem*. Segundo os autores, o aumento significativo na concentração e atividade da Hsp27 pode prorrogar o início da apoptose e ativação da caspase 3, além de dificultar a atividade da calpaína e impedir a degradação miofibrilar com consequente prejuízo no amaciamento da carne. Desta forma, considerando a atuação marcante da Hsp27 no estabelecimento do *rigor mortis* e no início e intensidade da proteólise miofibrilar, os resultados do presente trabalho sugerem que a expressão *down regulated* da Hsp27 possui grande contribuição na maciez da carne observada em bovinos da raça Nelore.

Estudos demonstraram diferenças entre raças da subespécie *Bos taurus* e entre diferentes raças de *Bos taurus* e o Nelore (*Bos indicus*) na expressão das Hsps localizados em mitocôndrias ou no reticulum sarcoplasmático e envolvidos no fluxo celular de cálcio e apoptose do músculo *Longissimus* (DE SOUZA RODRIGUES et al., 2017). No estudo desenvolvido por Gagaoua et al. (2017), foi observado à maior abundância das pequenas proteínas  $\alpha\beta$ -crystallina, Hsp20, Hsp27 e Hsp40 na raça Aberdeen Angus, quando comparado a raça Limousin. Essa diferença na expressão e atuação das Hsps e consequentemente no amaciamento da carne em distintas raças tem sido explicada por propriedades contráteis e metabólicas divergentes do músculo esquelético de bovinos. Esse fato pode explicar as controvérsias observadas entre os resultados da HSPA1A e HSPA1B do presente trabalho e os resultados do estudo de D'Alessandro et al. (2012). Além disso, de acordo com estudos de associações de genoma (GWAS), a raça Nelore (*Bos indicus*) possivelmente possui diferentes caminhos metabólicos relacionados à qualidade da carne, que não foram observados na raça *Bos taurus* (TIZIOTO et al., 2013).

Os resultados observados no presente estudo demonstraram que a análise proteômica pode ser considerada importante ferramenta na determinação de novos marcadores biológicos associados à maciez da carne. A utilização desta

metodologia permitiu observar que a maciez da carne de bovinos Nelore pode ser influenciada negativamente pela modulação da expressão das proteínas Hsps (HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPD1 e HSPB1), co-chaperonas (CDC37 e STIP1) e proteínas de estresse oxidativo (PRDX1, PRDX2, PRDX6 e PARK7). Como mostrado na Figura 2, este conjunto de proteínas as quais são caracterizadas pela sua atividade na preservação de proteínas miofibrilares apresentam uma interação proteína-proteína o que possivelmente lhes permite atuarem em sinergia e dessa forma prevenir os danos estruturais das proteínas miofibrilares (ACTA1, ACTB, ACTG1 e MYL1) proporcionando assim carnes com maior força de cisalhamento. Por outro lado, foi possível destacar as proteínas PFN1, LAP3, TPI1 e PGM1 como importantes marcadores moleculares da maciez da carne de animais Nelore devido a seu maior nível de expressão em carnes com menores valores de força de cisalhamento. Finalmente, é importante ressaltar que estes resultados fornecem informações novas e importantes que podem ser úteis na ciência animal e indústria da carne. Este é o primeiro trabalho a relatar a detecção e a associação da proteína ARHGDI1 com o músculo esquelético de bovinos, até então observada apenas na subespécie *Homo sapiens*. Também é o primeiro estudo ao observar associação das proteínas PFN1, LAP3, PRDX1, PRDX2 e HSPD1 com a maciez da carne de bovinos Nelore.

**Tabela 2.** Caracterização dos spots protéicos por meio da Espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS/MS).

Spot ID <sup>a</sup>	Proteína ID <sup>b</sup>	ABV <sup>c</sup>	Proteína	Score <sup>d</sup>	PI/Mw experimental	PI/Mw teórico	Coverage (%) <sup>e</sup>
28	Q76LV2	HSP90AA1	Proteína de choque térmico HSP 90-alfa	1784	5,69 / 87,03	4,92 / 84,73	24,55
	Q76LV1	HSP90AB1	Proteína de choque térmico HSP 90-beta	2893		4,96 / 83,25	21,22
37	Q27975	HSPA1A	Proteína de choque térmico 70 kDa 1A	1515	5,81 / 71,79	5,67 / 70,25	53,51
32	Q27965	HSPA1B	Proteína de choque térmico 70 kDa 1B	1515	5,88 / 72,10	5,67 / 70,22	56,94
33	P02769	ALB	Serum albumina	1816	5,68 / 75,03	5,82 / 69,29	43,33
24	P0CB32	HSPA1L	Proteína de choque térmico 70 kDa 1-like	1365	6,25 / 74,70	5,89 / 70,38	13,73
13	P68138	ACTA1	Actina, alfa músculo esquelético	6086	5,25 / 43,44	5,23 / 42,05	55,7
	Q5EAC6	CDC37	Hsp90 co-chaperona Cdc37	3572		5,09 / 44,58	11,23
	P60712	ACTB	Actina, citoplasmático 1	3193		5,29 / 41,73	42,13
	P63258	ACTG1	Actina, citoplasmático 2	3193		5,31 / 41,79	42,13
	F1MRD0	ACTB	Actina, citoplasmático 1	3154		5,16 / 41,85	39,2
34	O77834	PRDX6	Peroxirredoxina 6	158	6,04 / 25,85	6,0 / 25,06	54,91
8	Q5E956	TPI1	Triose fosfato isomerase	5960	5,69 / 23,32	6,45 / 26,69	67,07
9	P19803	ARHGDI A	Inibidor de dissociação Rho-GDP 1	1226	5,15 / 23,97	5,1 / 23,42	27,45
	E1BEL7	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	1112		5,77 / 22,57	24,78
	Q3T149	HSPB1	Proteína de choque térmico beta-1	1112		5,98 / 22,39	24,93
17	P19803	ARHGDI A	Inibidor de dissociação Rho-GDP 1	4482	5,05 / 24,64	5,1 / 23,42	55,39
5	Q5E947	PRDX1	Peroxirredoxina 1	759	9,22 / 21,84	8,59 / 22,1	37,69

20	E1BHJ0	PFN1	Profilina	637	9,24 / 16,82	8,46 / 15,05	22,86
	P02584	PFN1	Profilina 1	637		8,46 / 15,05	22,86
18	F1MUZ9	HSPD1	Proteína de choque térmico 60 kDa, mitocondrial	6280	5,41 / 65,32	5,71 / 60,97	21,64
40	P31081	HSPD1	Proteína de choque térmico 60 kDa, mitochondrial	5538	5,32 / 63,65	5,6 / 61,1	35,43
50	Q9XTA2	PREP	Prolil endopeptidase	182	5,77 / 81,6	5,51 / 80,64	16,48
30	P0CB32	HSPA1L	Proteína de choque térmico 70 kDa 1-like	115	6,27 / 73,80	5,89 / 70,38	18,11
21	A0A140T897	ALB	Serum albumina	1229	6,31 / 68,37	5,82 / 69,32	46,95
	P02769	ALB	Serum albumina	1229		5,82 / 69,29	46,95
19	Q3ZBZ8	STIP1	Proteína induzida por estresse do tipo 1	203	6,39 / 68,37	6,08 / 62,48	13,63
39	F1MJS4	PGM1	Fosfoglutamase 1	1765	5,74 / 65,8	5,56 / 62,19	44,52
16	Q08DP0	PGM1	Fosfoglutamase 1	736	6,02 / 65,8	6,36 / 61,58	46,8
	F1MJS4	PGM1	Fosfoglutamase 1	568		5,56 / 62,19	40,64
203	E1BFG0	ALDH7A1	Alfa-aminoadípico semialdeído desidrogenase	3869	6,4 / 66,8	6,69 / 58,59	54,73
	Q2KJC9	ALDH7A1	Alfa-aminoadípico semialdeído desidrogenase	3555		6,69 / 58,59	54,36
15	G3N0I4	LAP3	Citosol amino-peptidase	393	5,9 / 58,4	5,58 / 54,08	28,51
	P00727	LAP3	Citosol amino-peptidase	393		5,67 / 56,28	4,62
36	A4FUZ1	GLO1	Lactoilglutationa liase	5370	5,0 / 22,7	5,09 / 20,76	55,43

	A0JNJ5	MYL1	Cadeia leve de miosina 1/3, isoforma do musculo esquelético	4277		4,96 / 20,93	49,2
96	A4FUZ1	GLO1	Lactoilglutaciona liase	2930	5,2 / 22,4	5,09 / 20,76	55,43
7	Q9BGI3	PRDX2	Peroxirredoxina 2	10957	5,2 / 23,1	5,37 / 21,94	76,88
1	Q5E946	PARK7	Proteína Deglicase DJ-1	8096	5,9 / 22,9	6,84 / 20,03	65,61
3	Q5E946	PARK7	Proteína Deglicase DJ-1	11390	5,9 / 21,6	6,84 / 20,03	70,37
95	Q5E946	PARK7	Proteína Deglicase DJ-1	11438	6,2 / 21,6	6,84 / 20,03	78,31
94	Q5E946	PARK7	Proteína Deglicase DJ-1	1356	6,4 / 21,6	6,84 / 20,03	51,85

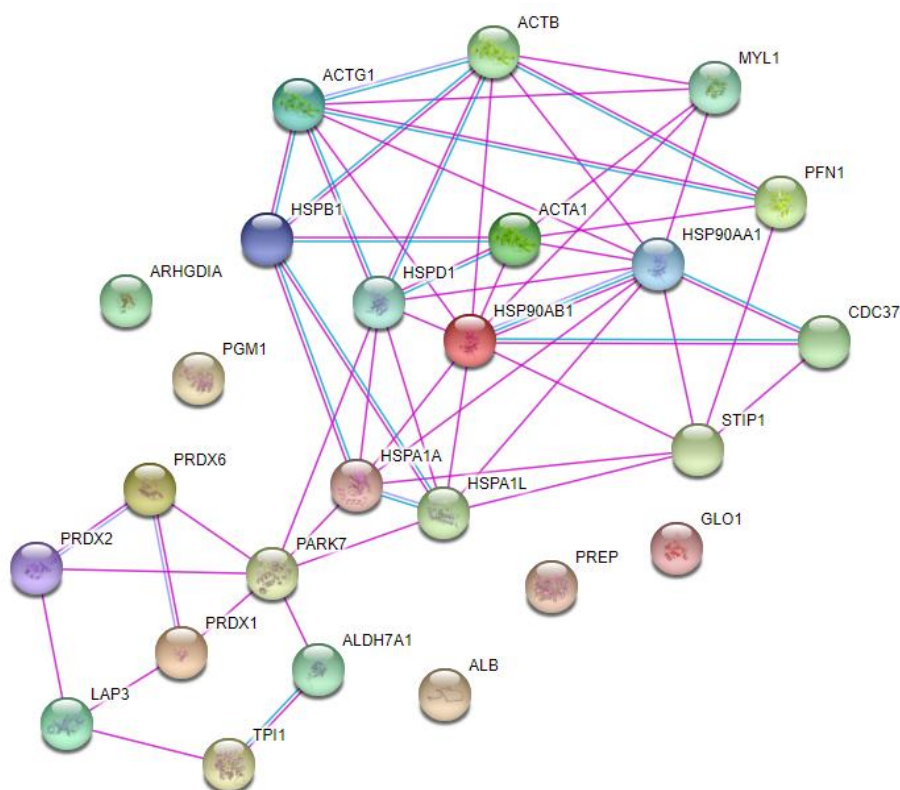
<sup>a</sup>ID Spot corresponde aos números mostrados na Figura 1.

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

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

<sup>d</sup>Score significativo.

<sup>e</sup>Coverage das proteínas calculados por Scaffold (aminoácidos identificados / total de aminoácidos).



**Figura 2.** Análise da interação proteína-proteína por meio do *software* String 10.0 das proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore. Cadeia leve de miosina 1/3, isoforma do músculo esquelético (MYL1),  $\alpha$ -actina (ACTA1),  $\beta$ -actina (ACTB),  $\gamma$ -actina (ACTG1), proteínas de choque térmico Hsp90-alfa (HSP90AA1), Hsp90-beta (HSP90AB1), Hsp701A (HSPA1A), Hsp701B (HSPA1B), Hsp701L (HSPA1L), Hsp60 (HSPD1) e Hsp27 (HSPB1), Profilina 1 (PFN1), Hsp90 co-chaperona cdc37 (CDC37) e proteína induzida por estresse do tipo 1 (STIP1), Proteína Deglicase DJ-1 (PARK7), Peroxirredoxina 1 (PRDX1), 2 (PRDX2), 6 (PRDX6), Citosol amino-peptidase (LAP3), Triose fosfato isomerase (TPI1), Inibidor de dissociação Rho-GDP 1 (ARHGDI1), Fosfoglutamase 1 (PGM1), Alfa-aminoadípico semialdeído desidrogenase (ALDH7A1), Lactoilglutaciona liase (GLO1), Prolil endopeptidase (PREP), Serum albumina (ALB).



#### 4. Conclusão

Os resultados do presente estudo denotaram que a maciez da carne de bovinos Nelore depende da expressão de proteínas pertencentes a distintas vias biológicas nomeadas de metabolismo glicolítico, estrutura e contração muscular, estresse oxidativo, regulação celular e a família das proteínas de choque térmico, além de sugerir a PFN1, LAP3, ARHGDI1, PRDX1, PRDX2 e HSPD1 como possíveis marcadores biológicos relacionados ao amaciamento da carne de bovinos.

#### 5. Referências Bibliográficas

ANDERSON, M. J.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during postmortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef. **Meat Science**, v. 90, p. 345–351, 2012.

ANDERSON, M. J.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Differences in phosphorylation of phosphoglucosylase 1 in beef steaks from the longissimus dorsi with high or low star probe values. **Meat Science**, v. 96, p. 379–384, 2014.

BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A. L.; DE VASCONCELOS SILVA, J. A.; MALHEIROS, J. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; PADILHA, P. M. (2015). Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine Longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nelore breed (*Bos indicus*). **Meat Science**, v. 169, p. 65–72, 2015.

BAX, M. L.; SAYD, T.; AUBRY, L.; FERREIRA, C.; VIALA, D.; CHAMBON, C., ... SANTÉ-LHOUTELLIER, V. Muscle composition slightly affects in vitro digestion of aged and cooked meat: Identification of associated proteomic markers. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1249–1262, 2013.

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.

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, v. 96, p. 1318–1324, 2014.

COURTEMANCHE, N. & POLLARD, T. D. Interaction of profilin with the barbed end of actin filaments. **Biochemistry**, v. 52, p. 6456–6466, 2013.

CRAMER, T.; PENICK, M. L.; WADDELL, J. N.; BIDWELL, C. A.; KIM, Y. H. B. A new insight into meat toughness of callipyge lamb loins - The relevance of anti-apoptotic systems to decreased proteolysis. **Meat Science**, v. 140, p. 66–71, 2018.

D'ALESSANDRO, A.; RINALDUCCI, S.; MARROCCO, C.; ZOLLA, V.; NAPOLITANO, F.; ZOLLA, L. Love me tender: an omics window on the bovine meat tenderness network. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4360–4380, 2012.

D'ALESSANDRO, A. & ZOLLA, L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 558-577, 2013.

DE SOUZA RODRIGUES, R. T.; CHIZZOTTI, M. L.; VITAL, C. E.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; BARROS, E.; BUSATO, K. C.; ... DA SILVA MARTINS, T. Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–21, 2017.

DI LUCA, A.; MULLEN, A. M.; ELIA, G.; DAVEY, G.; HAMILL, R. M. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. **Meat Science**, v. 88, p. 261–270, 2011.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 617, p. 68–83, 2017.

GAGAOUA, M.; CLAUDIA TERLOUW, E. M.; BOUDJELLAL, A.; PICARD, B. Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 365–374, 2015.

GAGAOUA, M.; CLAUDIA TERLOUW, E. M.; PICARD, B. The study of protein biomarkers to understand the biochemical processes underlying beef color development in young bulls. **Meat Science**, v. 134, p. 18–27, 2017.

GUILLEMIN, N.; BONNET, M.; JURIE, C.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, v. 5, p. 885-894, 2011.

KIM, N.; CHO, S.; LEE, S.; PARK, H.; LEE, C.; CHO, Y.; PARK, E. Proteins in Longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, v. 80, p. 1068–1073, 2008.

KÜLTZ, D. Review Evolution of the cellular stress proteome : from monophyletic origin to ubiquitous function. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 3119–3124, 2003.

LANA, A. & ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 85-97, 2016.

MALHEIROS, J. M.; ENRÍQUEZ-VALENCIA, C. E.; DA SILVA DURAN, B. O.; DE PAULA, T. G.; CURI, R. A.; DE VASCONCELOS SILVA, J. A. I. I.; ... CHARDULO, L. A. L. Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle. **Meat Science**, v. 138, p. 49–52, 2018.

OKSALA, N. K. J.; LAAKSONEN, D. E.; LAPPALAINEN, J.; KHANNA, S.; NAKAO, C.; HÄNNINEN, O.; SEM, C. K.; ATALAY, M. Heat shock protein 60 response to exercise in diabetes. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation. **Journal Diabetes Complications**, v. 20, p. 257-261, 2006.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74, p. 44-58, 2006.

PETROVA, I.; AASEN, I. M.; RUSTAD, T.; EIKEVIK, T. M. Manufacture of dry-cured ham: a review. Part 1. Biochemical changes during the technological process. **European Food Research and Technology**, v. 241, p. 587–599, 2015.

PICARD, B.; BERRI, C.; LEFAUCHEUR, L.; MOLETTE, C.; SAYD, T.; TERLOW, C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, p. 259–278, 2010.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9808–9818, 2014.

PICARD, B.; LEBRET, B.; CASSAR-MALEK, I.; LIAUBET, L.; BERRI, C.; LE BIHAN-DUVAL, E.; HOCQUETTE, J.F.; RENAND, G. Recent advances in omic technologies for meat quality management. **Meat Science**, v.109, p. 18–26, 2015.

PICARD, B.; KAMMOUN, M.; GAGAOUA, M.; BARBOIRON, C.; MEUNIER, B.; CHAMBON, C.; CASSAR-MALEK, I. Calcium Homeostasis and Muscle Energy Metabolism Are Modified in HspB1-Null Mice. **Proteomes**, v. 4, p. 1–21, 2016.

PICARD, B. & GAGAOUA, M. "Proteomic Investigations of Beef Tenderness." Proteomics in food science: From farm 555 to fork. **Academic Publisher**, p. 177-197, 2017.

POLATI, R.; MENINI, M.; ROBOTTI, E.; MILLIONI, R.; MARENGO, E.; NOVELLI, E.; BALZAN, S.; CECCONI, D. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2052–2069, 2012.

RONG, F.; LI, W.; CHEN, K.; LI, D. M.; DUAN, W. M.; FENG, Y. Z.; LI, F., ZHOU, X. W.; FAN, S.J.; LIU, Y.; TAO, M. Knockdown of RhoGDI  $\alpha$  induces apoptosis and increases lung cancer cell chemosensitivity to paclitaxel. **Neoplasma**, v. 59, p. 541-550, 2012.

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.

SCHOPF, F. H.; BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, p. 345–360, 2017.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes **Nature Protocols**, p. 2856-2860, 2006.

TE PAS, M. F. W.; KRUIJT, L.; PIERZCHALA, M.; CRUMP, R. E.; BOEREN, S.; KEUNING, E.; HOVING-BOLINK, R.; HORTÓS, M.; GISPERT, M.; ARNAU, J.; DIESTRE, A.; MULDER, H. A. Identification of proteomic biomarkers in M. Longissimus dorsi as potential predictors of pork quality. **Meat Science**, v. 95, p. 679–687, 2013.

THOMAS, K. J.; MCCOY, M. K.; BLACKINTON, J.; BEILINA, A.; BRUG, M. V.; SANDEBRING, A.; MILLER, D.; MARCIC, D.; MIGUEZ-CEDAZO, A.; COOKSON, M. R. DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 20, p. 40–50, 2011.

TIZIOTO, P. C.; DECKER, J. E.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; MUDADU, M. A.; SILVA, F. L.; ... REGITANO, L. C. A. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, p. 1012–1020, 2013.

ZHANG, B.; ZHANG, Y.; DAGHER, M.C.; SHACTER, E. Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, v. 65, p. 6054–6062, 2005.

ZHANG, M.; WANG, D.; HUANG, W.; LIU, F.; ZHU, Y.; XU, W.; CAO, J. Apoptosis during postmortem conditioning and its relationship to duck meat quality. **Food Chemistry**, v. 138, p. 96-100, 2013.

ZHANG, M.; LIU, Y. L.; FU, C. Y.; WANG, J.; CHEN, S. Y.; YAO, J. Expression of MyHC genes, composition of muscle fiber type and their association with intramuscular fat, tenderness in skeletal muscle of Simmental hybrids. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 833-840, 2014.

ZHANG, M.; WANG, D.; GENG, Z.; SUN, C.; BIAN, H.; XU, W.; ZHU, YONGZHI, LI, P. Differential expression of heat shock protein 90, 70, 60 in chicken muscles postmortem and its relationship with meat quality. **Ausin-Australas Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 94-99, 2017.

WANG, D. et al. Changes of phospholipase A2 and C activities during dry-cured duck processing and their relationship with intramuscular phospholipid degradation. **Food Chemistry**, v. 145, p. 997–1001, 2014.

WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., & SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. Clay Center, NE: Roman L. Hruska U.S. MARC. **Agricultural Research Service**, USDA, 1995.

WU, W.; GAO, X. G.; DAI, Y.; FU, Y.; LI, X. M.; DAI, R. T. Post-mortem changes in sarcoplasmic proteome and its relationship to meat color traits in *M. semitendinosus* of Chinese Luxi yellow cattle. **Food Research International**, v. 72, p. 98–105, 2015.