

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA,
QUALIDADE DE CARNE, EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL
PROTEÔMICO DO MÚSCULO EM BOVINOS F1 ANGUS-
NELORE INTEIROS E CASTRADOS**

**Bismarck Moreira Santiago
Zootecnista**

**T
E
S
E**

/

**S
A
N
T
I
A
G
O**

**B.
M.**

2

0

2

1

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA,
QUALIDADE DE CARNE, EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL
PROTEÔMICO DO MÚSCULO EM BOVINOS F1 ANGUS-
NELORE INTEIROS E CASTRADOS**

Msc. Bismarck Moreira Santiago

Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

Coorientador: Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de doutor em Zootecnia.**

S235d

Santiago, Bismarck Moreira

Desempenho, características de carcaça, qualidade de carne, expressão gênica e perfil proteômico do músculo em bovinos f1 Angus-Nelore inteiros e castrados / Bismarck Moreira Santiago. -- Jaboticabal, 2021

84 p.

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

Orientador: Otávio Rodrigues Machado Neto

Coorientador: Welder Angelo Baldassini

1. Castração. 2. Ciência da carne. 3. Classe sexual. 4. Expressão gênica. 5. Proteômica. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, QUALIDADE DE CARNE, EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL PROTEÔMICO DO MÚSCULO EM BOVINOS F1 ANGUS-NELORE INTEIROS E CASTRADOS

AUTOR: BISMARCK MOREIRA SANTIAGO

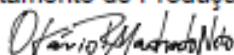
ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO

COORIENTADOR: WELDER ANGELO BALDASSINI

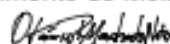
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ / UNESP Botucatu



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



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



Prof. Dr. MARCIO MACHADO LADEIRA (Participação Virtual)
Universidade Federal de Lavras / Lavras/MG



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

Jaboticabal, 26 de outubro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BISMARCK MOREIRA SANTIAGO, filho de Joaquim Moreira dos Santos e Valdinea Santiago da Silva Santos, nasceu em 16 de maio de 1992, em Itarantim - Bahia. Em fevereiro de 2011, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual da Bahia – UESB, campus de Itapetinga Bahia, finalizando em maio de 2016, obtendo o título de “Zootecnista”. Em abril de 2016, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia *stricto sensu*, em nível de Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Concentração em Produção de Ruminantes, em Itapetinga-BA, finalizando em fevereiro de 2018. Em março de 2018 ingressou-se em nível de doutorado no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto.

“Aceite a responsabilidade de sua vida. Perceba que você é o único que vai chegar
aonde você quer ir, ninguém mais.”

Les Brown

“Deem graças ao Senhor porque ele é bom; o seu amor dura para sempre.”

Salmos 107:1

A minha Mãe Valdinea, meu Pai Joaquim e a todos meus familiares e amigos, pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que me deram durante toda a minha existência,
com muita gratidão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, e por me ajudar a superar todas as dificuldades da vida.

Aos meus pais, Joaquim Moreira e Valdinea Santiago, por toda a dedicação, apoio, carinho, amor, incentivo, e exemplo de vida. Obrigado por TUDO, Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Bianca e Alisson, por toda torcida e incentivo, vocês são especiais em minha vida.

À minha sobrinha Thalita, por todo amor, titio ama muito você.

À toda minha família, pois tenho certeza de que vocês sempre oraram e intercederam por mim.

À minha companheira Shara e toda sua família, por todo apoio e incentivo na realização do curso, vocês são muito especiais em minha vida.

Aos meu orientador e amigo Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, pela confiança, ensinamentos e toda ajuda em minha formação acadêmica, profissional e pessoal, a ele toda admiração e gratidão.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini, por todo apoio, ensinamentos, na elaboração deste trabalho, além do companheirismo e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela oportunidade e contribuição para obtenção do título de doutor.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado nas disciplinas.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado nas disciplinas.

Aos professores Dr. Luis Arthur Loyola Chardulo, Dr. Marcos Roberto Chiaratti e Dr. Pedro de Magalhães Padilha, pela parceria nas análises laboratoriais.

Ao Pós-Doutorando José Cavalcante do instituto de biociências de Botucatu pela ajuda e auxílio nas análises laboratoriais de proteômica.

A Fazenda Turbilhão por ceder as instalações, animais, alimentação dos animais e mão de obra para realização do experimento de campo.

Ao Frigostrela por todo auxílio nos abates dos animais e coleta de amostras.

Aos alunos e amigos do NUPPEC que auxiliaram nas análises laboratoriais, e troca de experiências: Luiz Antônio Fogaça, João Victor, Camila Prado, Mateus Parra, Richard Vaquero, Jean Galvão, Matheus Rossi, Lucas Rodrigues, Flabiele Soares, Hozane Souza.

Aos meus amigos e companheiros da Rep Bahia, Leone Campos Rocha e Abias Santos Silva, pela ajuda nas coletas de dados do experimento e nas análises laboratoriais, além do companheirismo e amizade construídos desde a graduação.

Aos amigos em Botucatu, Mateus Ferreira, Eduardo Bueno “Du”, Lais Tomaz, Richard Vaquero, por todos os momentos de trabalho e descontração.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de auxílio à pesquisa – regular (Processo: 19/11028-0)

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica.

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

Muito obrigado a todos vocês!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	2
<i>Desempenho e características de carcaça.....</i>	2
<i>Castração animal e qualidade de carne.....</i>	3
<i>Perfil de ácidos graxos da carne.....</i>	5
<i>Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico.....</i>	6
<i>A proteômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne.....</i>	9
Referências.....	11
CAPÍTULO 2 – Gene expression, chemical composition, and fatty acid profile of the <i>longissimus</i> muscle of F1 Angus-Nellore bulls and steers feedlot finished.....	17
Abstract.....	17
Introduction.....	18
Material and Methods.....	19
<i>Ethics Committee Statement.....</i>	19
<i>Animals and experimental diet.....</i>	19
<i>Feed intake, performance, and carcass traits.....</i>	20
<i>Slaughter and collection of samples.....</i>	21
<i>Gene expression.....</i>	22
<i>Chemical composition of meat.....</i>	27
<i>Fatty acid extraction and gas chromatography analysis.....</i>	27
<i>Statistical analysis.....</i>	28
Results.....	29
<i>Feed intake, performance, and carcass traits.....</i>	29
<i>Expression of lipogenic genes.....</i>	30
<i>Chemical composition of meat.....</i>	31
<i>Fatty acid profile.....</i>	32
Discussion.....	34
<i>Animal performance and traits.....</i>	34
<i>Expression of lipogenic genes.....</i>	34
<i>Chemical composition of meat.....</i>	36
<i>Fatty acid profile.....</i>	37
Conclusion.....	40
References.....	41
CAPÍTULO 3 – Efeito da castração sobre a características de carcaça, qualidade de carne e proteoma do músculo <i>Longissimus thoracis</i> de bovinos F1 Angus-Nelore terminados em confinamento.....	49
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
<i>Declaração do comitê de ética.....</i>	51
<i>Instalações, Animais e dieta experimental.....</i>	51
<i>Abate de coleta de amostras.....</i>	52

<i>Características de carcaça</i>	53
<i>Mensuração de pH, coloração, perdas por cocção e força de cisalhamento da carne</i>	53
<i>Determinação da concentração de minerais na carne</i>	55
<i>Análise de proteômica</i>	55
<i>Eletroforese bidimensional – 2D-PAGE</i>	56
<i>Análises de imagens</i>	56
<i>Digestão de proteínas</i>	57
<i>Identificação das proteínas</i>	57
<i>Bioinformática</i>	58
<i>Análises Estatísticas</i>	58
Resultados.....	59
Discussão.....	69
Conclusão.....	76
Referências.....	77

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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



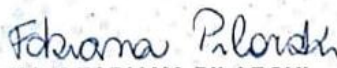
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Desempenho, características de carcaça, qualidade de carne, expressão gênica e perfil proteômico do músculo em bovinos F1 Angus-Nelore inteiros e castrados", protocolo nº 07594/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	02/09/2019 a 29/02/2020
Espécie / Linhagem	<i>Bos indicus</i> x <i>Bos taurus</i> / Angus x Nelore
Nº de animais	640 animais
Peso / Idade	280 kg / 14 meses
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Turbilhão

Jaboticabal, 09 de setembro de 2019.


Profª Drª FABIANA PILARSKI
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellano, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
 tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, QUALIDADE DE CARNE, EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL PROTEÔMICO DO MÚSCULO EM BOVINOS F1 ANGUS-NELORE INTEIROS E CASTRADOS

RESUMO - Objetivou-se investigar o efeito da classe sexual (castrados e inteiros) sobre o desempenho, características de carcaça, qualidade de carne, expressão gênica e perfil proteômico do tecido muscular de bovinos precoces F1 Angus-Nelore. Utilizou-se 640 animais, submetidos à terminação em confinamento pós-desmama por período de 180 dias. Animais castrados apresentaram menores ganho médio diário, peso final, pesos de carcaça quente e fria e área de olho de lombo. Porém, tiveram maior espessura de gordura subcutânea. A carne dos castrados apresentou menores perdas por evaporação, perdas totais e força de cisalhamento, independentemente da quantidade de dias de maturação. Entretanto, animais desse tratamento tiveram maiores perdas por gotejamento, quando comparados a animais inteiros. Notou-se que independentemente da quantidade de dias de maturação, a carne de animais castrado apresentou maior Luminosidade (L^*), intensidade de vermelho (a^*), intensidade de amarelo (b^*), chroma e hue. Todavia, a carne dos animais inteiros apresentou pH mais elevado em relação aos animais castrados. Observou-se maiores expressões dos genes lipogênicos: *Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACACA)*, *Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)*, *Fatty acid synthase (FASN)*, *Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG)* e *Stearoyl-CoA desaturase (SCD)* no músculo *longissimus thoracis* de animais castrados, quando comparada aos inteiros. Nestes, observou-se níveis mais elevados de expressão dos genes: *Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)* e da *Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1)*. Observou-se que animais castrados apresentaram maiores níveis de gordura intramuscular em relação aos inteiros. A maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados foi observada em animais castrados, representado principalmente pelo ácido oleico. No entanto, os inteiros apresentaram níveis mais elevados de ácidos graxos poliinsaturados, enquanto o conteúdo de ácidos graxos saturados não foi afetado. Ao avaliar o proteoma do músculo *Longissimus thoracis*, observou-se que a castração modulou a abundância de 15 proteínas distribuídas em 21 spots proteicos. A castração regulou positivamente as proteínas: Creatine kinase M-type (CKM), Frutose-bisfosfato aldolase (ALDOA), Gliceraldehide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e Troponin T, fast skeletal muscle (TNNT3). Por outro lado, nos castrados observou-se regulação negativa das proteínas: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60), ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5F1B), Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8), Malate dehydrogenase (MDH1), Myoglobin (GLNG), Phosphoglucomutase-1 (PGM1), Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB), Triosephosphate isomerase (TPI1), Troponin I2, fast skeletal type (TNNI2). As proteínas Adenylosuccinate lyase (ADSL) e Alpha-enolase (ENO1), foram observadas apenas em amostras de animais castrados. A castração apesar de reduzir o desempenho animal é um manejo interessante a se adotar quando o objetivo é obter carne de melhor qualidade, devido seus efeitos na expressão de genes e proteínas que trazem benefícios aos atributos que definem essa característica desejada pelo consumidor.

Palavras-chave: castração, ciência da carne, classe sexual, expressão gênica, *longissimus thoracis*, proteômica

PERFORMANCE, CARCASS CHARACTERISTICS, MEAT QUALITY, GENE EXPRESSION AND PROTEOMIC MUSCLE PROFILE IN BULLS AND STEERS F1 ANGUS-NELORE.

ABSTRACT- The aim of this study was to investigate the effect of sex class (steers and bulls) on performance, carcass traits, meat quality, gene expression and proteomic profile of muscle tissue in F1 Angus-Nellore precocious cattle. A total of 640 animals were submitted to finishing in post-weaning confinement for a period of 180 days. Steers had lower average daily gain, final weight, hot and cold carcass weights, and ribeye area. However, they had greater subcutaneous backfat thickness. The meat from steers showed lower losses due to evaporation, total losses, and shear force, regardless of the number of days of maturation. However, animals in this treatment had higher drip losses when compared to bulls. It was noted that, regardless of the number of days of maturation, the meat from steers showed greater luminosity (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*), chroma and hue. However, meat from bulls had a higher pH than steers. Greater expressions of lipogenic genes were observed: *Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACACA)*, *Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)*, *Fatty acid synthase (FASN)*, *Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG)* and *Stearoyl-CoA desaturase (SCD)* in the longissimus thoracis muscle of steers, when compared to of the bulls. In these, higher levels of gene expression were observed: *Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)* and *Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1)*. It was observed that steers had higher levels of intramuscular fat compared to bulls. A higher proportion of monounsaturated fatty acids was observed in steers, represented mainly by oleic acid. However, the bulls had higher levels of polyunsaturated fatty acids, while the content of saturated fatty acids was not affected. When evaluating the proteome of the Longissimus thoracis muscle, it was observed that castration modulated the abundance of 15 proteins distributed in 21 protein spots. Castration positively regulated the proteins: *Creatine kinase M-type (CKM)*, *Fructose-bisfosfato aldolase (ALDOA)*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* e *Troponin T, fast skeletal muscle (TNNT3)*. On the other hand, in steers negative regulation of proteins was observed: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (*HSP60*), *ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5F1B)*, *Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)*, *Malate dehydrogenase (MDH1)*, *Myoglobin (GLNG)*, *Phosphoglucomutase-1 (PGM1)*, *Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB)*, *Triosephosphate isomerase (TPI1)*, *Troponin I2, fast skeletal type (TNNI2)*. The proteins *Adenylosuccinate lyase (ADSL)* e *Alpha-enolase (ENO1)* were observed only in samples from steers. Castration, despite reducing animal performance, is an interesting management to adopt when the objective is to obtain better quality meat, due to its effects on the expression of genes and proteins that bring benefits to the attributes that define the characteristics desired by the consumer.

Keywords: castration, meat science, sex class, gene expression, *longissimus thoracis*, proteomics

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

O Brasil se destaca no agronegócio internacional como um dos principais produtores e exportadores de carne bovina (ABIEC, 2020). A raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos são predominantes nas regiões tropicais do país, representando 80% do rebanho brasileiro (Carvalho et al., 2014). Apesar de serem adaptadas ao clima tropical, em geral, animais zebuínos fisiologicamente são mais tardios que animais de origem Britânica (*Bos taurus*) (Pereira et al., 2017). Por essa razão, a crescente utilização da estratégia de cruzamentos entre animais de origem zebuína e taurina vem sendo adotada no intuito de obter ganhos genéticos, refletindo no maior desempenho produtivo (Rosa, 2013). Dos genótipos utilizados para cruzamento industrial, touros Aberdeen Angus são comumente utilizados em cruzamentos com vacas Nelore.

Além de cruzamentos, a busca por melhoria na qualidade da carne coloca em discussão o tema castração, pois, há indícios de que animais inteiros (não-castrados) apresentam maior possibilidade de produzir carne com coloração não satisfatória, menor teor de gordura intramuscular e menor maciez (Andreo et al., 2016; Gomez et al., 2017). Assim, os estudos têm demonstrado que a castração em bovinos Nelore e cruzados F1 Angus-Nelore confinados apresentaram melhorias nas características de cor e maciez quando comparados com inteiros. Entretanto, de forma geral, nesses estudos foram utilizados bovinos Nelore puros com idade inicial de 24 meses (Andreo et al., 2016; Gómez et al., 2017; Jacinto-valderrama et al., 2021), ou bovinos F1 Angus-Nelore (Miguel et al., 2014) com a mesma média de idade, todos terminados em confinamento por no máximo de 90 dias. Independentemente do genótipo, em nenhum desses estudos foram utilizados animais com idade inferior a 24 meses e submetidos a terminação em confinamento por 180 dias, prática bastante incomum no Brasil.

Os estudos de biologia molecular podem auxiliar na descrição de características de interesse econômico para produtores e indústria frigorífica (Lim et al., 2015). A investigação de proteínas do tecido muscular tem sido empregada na

ciência da carne para explorar a base da variação nas características da qualidade como maciez, cor, capacidade de retenção de água em zebuínos (Rodrigues et al., 2017; Silva et al., 2019) e a variação na deposição da gordura intramuscular em bovinos europeus (Mao et al., 2016; Picard et al., 2019). É interessante que nos estudos sobre qualidade de carne, primeiro se revele as redes de genes e proteínas responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo de qualidade desejado antes de tentar desenvolver tecnologias para prever a qualidade da carne, o que permitiria melhorar essas características de qualidade por meio de esquemas de seleção genética e manejo, para auxiliar na otimização da qualidade do produto (Gagaoua et al., 2021). Nesse contexto, objetivou-se investigar o efeito da classe sexual (castrados e inteiros) sobre o desempenho, características de carcaça, qualidade de carne, expressão gênica e perfil proteômico do tecido muscular de bovinos precoces F1 Angus-Nelore terminados em confinamento pelo período de 180 dias.

Revisão de Literatura

Desempenho e características de carcaça

O objetivo da castração é reduzir os problemas de manejo relacionados à agressividade e comportamento sexual, pois torna os animais mais dóceis e atenua condutas sexuais como sodomia (Freitas et al., 2015).

Animais inteiros podem apresentar algumas vantagens sobre animais castrados, como por exemplo, maior desenvolvimento muscular (Blanco et al., 2020). Diversos estudos têm avaliado o efeito da castração no desempenho e características de carcaça de bovinos de corte em confinamento (Brown et al., 2015; Anaruma et al., 2020) ou a pasto (Moreira et al., 2018). Animais inteiros, geralmente apresentam melhor conversão alimentar e carcaças mais pesadas (Marti et al., 2013) em relação a animais castrados. No estudo de Moreira et al. (2018) a castração reduziu o peso final (-36 kg) e peso de carcaça quente (-24,3 kg).

Essa redução no ganho de peso e carcaça se dá pela redução dos níveis de testosterona após a castração (Baatar e Hwang, 2019). O fator de crescimento semelhante à insulina e a testosterona são importantes na regulação dos processos metabólicos e retenção de N e deposição da massa muscular (Govoni et al., 2003).

Portanto, espera-se que ocorra menor ganho de peso em animais castrados, uma vez que a testosterona é produzida nos testículos. Contudo, ocorrem melhorias na deposição de gordura intramuscular e maciez da carne em animais castrados (Blanco et al., 2020).

Castração animal e qualidade de carne

As vantagens dos animais inteiros em relação aos castrados podem ser limitadas devido ao menor grau de acabamento de gordura comumente observado nas carcaças desses animais (Needhan et al., 2017; Silva et al., 2019). As carnes provenientes de carcaças leves e com pouca gordura subcutânea correm maior risco de sofrerem encurtamento pelo frio, resultando em menor maciez, principalmente quando resfriadas rapidamente (Chardulo et al., 2013). A proteção da carcaça durante o resfriamento é ocasionada pela quantidade de gordura que o animal depositou durante a vida, pois esta atua como isolante térmico e evita o encurtamento pelo frio.

Em um contexto multifatorial, a avaliação do músculo *longissimus thoracis* de mais de 1600 bovinos Nelore inteiros mostraram importantes relações sobre a espessura de gordura subcutânea e características de qualidade de carne (Baldassini et al., 2017). Neste estudo, foi constatado que apenas 11,2% dos animais tiveram amostras consideradas macias (força de cisalhamento $\leq 4,9$ kg), com bom grau de marmoreio e baixas perdas por cocção. Dessa forma, quando destinados à produção de carne, os animais têm sido castrados com o objetivo principal de assegurar a deposição de gordura na carcaça. A EGS é uma característica muito associada também à condição nutricional e o grupo genético utilizado para a produção de carne (Ladeira et al., 2016).

Para a classificação da carne com maior possibilidade de ser macia e suculenta, o consumidor geralmente observa a coloração da carne e tamanho do corte e, particularmente, a quantidade de marmoreio ou gordura intramuscular e gordura subcutânea (Chardulo et al., 2013).

Recentemente o teor de gordura intramuscular têm recebido grande atenção do consumidor e da indústria, uma vez que historicamente a produção de zebuínos (predominantes no país) acarreta cortes cárneos com pouco marmoreio ou com ausência deste. Em bovinos, a deposição do tecido adiposo intramuscular é resultado

de diversos fatores como: manejo alimentar, nutrição, sexo, idade e genótipo. Em países como Coreia, Japão, Austrália e Estados Unidos da América, a gordura intramuscular é bastante valorizada (Park et al., 2018).

O teor de gordura intramuscular está bastante relacionado com a satisfação do consumidor, todavia, a aceitação global parece atingir um patamar ótimo entre 3,0 e 7,3% de teor de lipídios na porção intramuscular (Miller et al., 2002). A concentração de gordura intramuscular (avaliada no *longissimus thoracis*) em animais Nelore, por exemplo, varia de acordo com o grau de maturidade do animal, atingindo comumente teores entre 2 e 3% (Oliveira et al., 2012; Baldassini et al., 2017), embora valores de 6,3% (Silva et al., 2019) já tenha sido descrito na literatura.

O teor de gordura e o perfil de ácidos graxos tem relação com o sabor (Calkins e Hodgen, 2007), mas também têm atraído a atenção do consumidor pelo seu possível efeito na saúde, já que alguns ácidos graxos são apontados como benéficos e outros maléficos (Berton et al., 2016). Berton et al. (2016) observaram que alguns genes estão diretamente relacionados com a síntese de ácidos graxos específicos, principalmente o mirístico e o palmítico, responsáveis pelo aumento da concentração de lipoproteínas de baixa densidade e possíveis efeitos na saúde do cardíaca em humanos. Contudo, o consumo de carne com alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico, pode promover redução no risco de doenças cardiovasculares em humanos (Joo et al., 2017).

Um estudo avaliou características de carcaças e qualidade de carne de tourinhos (machos inteiros) versus novilhos (machos castrados) da raça holandesa, terminados em confinamento a pasto, e abatidos com 19 (tourinhos) e 21 (novilhos) meses de idade, foi observado maior teor de vermelho, de amarelo e Chroma (saturação) nos castrados, enquanto valores ligeiramente maiores de pH final foram observados nos inteiros (pH = 5,76 vs. 5,62, respectivamente). Os valores de força de cisalhamento, perdas por cocção em diferentes tempos de maturação (3, 7 e 14 dias), umidade e colágeno (total e solúvel) foram maiores nas amostras dos tourinhos, e teor de gordura intramuscular foi maior nos castrados (0,5 vs. 3,8%, respectivamente). Nesse estudo, constatou-se que em bovinos jovens do genótipo avaliado, a carne dos animais castrados demonstrou qualidade superior (maciez e gordura intramuscular) (Nian et al., 2018).

Perfil de ácidos graxos da carne

Conhecer os mecanismos que influenciam a lipogênese e a deposição de gordura intramuscular (Hocquette et al., 2010), bem como a coloração (Ramanathan et al., 2018) e maciez (Ouali et al., 2013), são fundamentais para produzir carne com maior valor agregado. Em animais adultos, a deposição de gordura é uma característica dependente do número e do tamanho dos adipócitos intramusculares (Hocquette et al., 2010). A regulação da deposição de gordura intramuscular e o perfil de ácidos graxos iniciam-se com a influência materna sobre a expressão gênica do feto (Ladeira et al., 2018). Alguns genes atuam no meio intra e extracelular no transporte de ácidos graxos para o músculo *longissimus* (Berton et al., 2016).

Vários fatores podem modificar a o perfil de ácidos graxos e os depósitos de gordura, incluindo: espécie, raça, dieta, idade, sexo e localização anatômica (Nian et al., 2018). Dentre os métodos físico-químicos para determinar as propriedades das gorduras, a cromatografia gasosa tornou-se a principal técnica para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis (Penteado et al., 2008). Esta técnica analítica foi desenvolvida principalmente para caracterização de adulterações/alterações de óleos utilizados na indústria alimentícia devido a fatores econômicos (Antoniosi et al., 1993). Na mesma linha, pesquisas tem utilizado a cromatografia gasosa como método para determinação do perfil de ácidos graxos da carne e seus impactos na qualidade do produto final (Strada et al., 2019; Costa et al., 2020; Ribeiro et al., 2020)

De acordo Ladeira et al. (2018), animais que ingerem grande quantidade de carboidratos não fibrosos, particularmente amido, podem experimentar uma situação de drástica queda no pH ruminal, a qual é acompanhada por uma alteração nos principais isômeros de CLA produzidos no rúmen como consequência da biohidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados. Entre estes ácidos graxos, pode-se destacar o CLA 18:2 Trans-10, Cis-12, em virtude de seu efeito anti-lipogênico. Uma vez que bovinos de diferentes classes sexuais (por exemplo, machos castrados e inteiros), podem apresentar marcante variação quanto à ingestão de matéria seca, a susceptibilidade destes aos eventos de acidose pode aumentar de acordo com a quantidade de carboidratos não fibrosos ingerida. Ball et al. (2018) observaram efeito

da castração no consumo de matéria seca (CMS), no qual menores valores de CMS foram observados nos animais castrados quando comparados aos inteiros.

Essa possível variação no CMS pode resultar em maior consumo de CLA, podendo contribuir para redução da expressão de *Fator de transcrição de ligação do elemento regulador de estero1 1 (SREBF1)* (Teixeira et al., 2017). Como resultado, ocorre menor biossíntese de lipídeos nos tecidos pela redução da expressão gênica e atividade de enzimas essenciais (Ladeira et al., 2016), que em parte pode explicar a menor deposição de gordura intramuscular e subcutânea em animais inteiros.

A associação entre o sexo e o perfil de ácidos graxos da carne foram descritas na literatura em outros estudos (Barton et al., 2011; Nian et al., 2018). Entretanto, os mecanismos moleculares relacionados à ação direta dos hormônios sexuais no perfil de ácidos graxos da carne bovina ainda não foram totalmente compreendidos (Nian et al., 2018). Existe uma carência de resultados científicos na literatura nacional sobre o perfil de ácidos graxos da carne de bovinos castrados comparados aos inteiros, especialmente quando esses foram submetidos à terminação em confinamento pós-desmame.

Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico

O teor de gordura intramuscular dos bovinos é um componente importante das características que influenciam as variáveis de qualidade da carne, como: suculência, maciez e sabor, podendo ser influenciada pela raça, genótipo, gênero, idade, castração e nutrição (Park et al., 2018). Dentre esses fatores, a castração aumenta significativamente a deposição de gordura intramuscular (Jung e Baik, 2019).

A castração reduz a concentração de testosterona que por sua vez aumenta o tamanho do adipócito (Baik et al., 2014). Baatar & Hwang (2020) mostraram que animais inteiros tiveram a expressão de marcadores pré-adipócitos suprimida, em razão disso, a expressão de marcadores lipogênicos como *Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARG)* foi reduzida, resultando em menor deposição de gordura em comparação aos animais castrados.

A expressão dos genes, a síntese de RNAm, é controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA. A expressão destes fatores e, conseqüentemente a sua atuação, é dependente da situação

fisiológica e do estágio de desenvolvimento do organismo. Assim, alguns genes são expressos apenas nos momentos apropriados (MacNeil et al., 2011).

Identificar os genes que regulam a deposição de gordura intramuscular em bovinos (marmoreio) pode, portanto, ajudar a otimizar a produção de carne na indústria pecuária. Adicionalmente, uma análise de múltiplos genes, principalmente genes relacionados ao metabolismo lipídico, pode levar a um melhor entendimento dos efeitos desses processos sobre os fenótipos do músculo esquelético marmorizado (Lim et al., 2015). Ademais, a integração de dados derivados de análises de expressão gênica com estudos de expressão de proteínas é, portanto, importante para traçar um quadro completo auxiliando no entendimento das funções do tecido adiposo (Ceciliani et al., 2018). Genes como *PPARG* e *Proteína de ligação a ácidos graxos 4 (FABP4)* foram descritos na literatura como responsáveis por modular diversas rotas metabólicas que facilitam a sinalização e aumento da lipólise nos adipócitos (Liu et al., 2020). Corazzin, et al. (2013) avaliando a expressão de *PPARG*, também encontraram que a sua expressão é correlacionada positivamente com os genes *SCD* e *LPL*. Estas correlações positivas indicam que *PPARG* aumenta a expressão de genes envolvidos na lipogênese.

O *PPARG* é uma das três isoformas da família de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), as outras isoformas são: *PPARA* e *PPARB* (Socha et al., 2017). O *PPARG* tem elevada expressão nos adipócitos e menor expressão no músculo (Kersten, 2014), sendo o mesmo crucial no controle da adipogênese e sensibilidade à insulina. A expressão do *PPARA* é mais elevada no fígado e no tecido adiposo, seguido do intestino delgado e coração (Georgiadi et al., 2012). O *PPARA* atua tanto na síntese como na β -oxidação dos ácidos graxos no músculo (Ladeira et al., 2016). Já o *PPARB* é expresso em praticamente todos os tecidos (Kersten, 2014).

Os triglicérides transportados pelos quilomícrons para dentro dos adipócitos são hidrolisados a ácidos graxos e monoacilglicerol pela enzima lipoproteína lipase que é codificada pelo gene *LPL*, a qual é sintetizada pelos adipócitos e secretada nos capilares do tecido adiposo. A *LPL* é responsável ainda por controlar a divisão dos ácidos graxos entre o tecido adiposo e muscular (Hocquette et al., 1998), tornando-a de grande importância para os animais produtores de carne. Os produtos são

absorvidos em parte pelo tecido adiposo e músculo esquelético e armazenados como lipídios neutros (Wang e Eckel, 2009). Jeong et al., (2012) sugeriram que o gene *LPL* pode ser um marcador genético preditivo de deposição de gordura intramuscular.

O teor de gordura está correlacionado com a atividade de *FABP4* e as atividades de enzimas oxidativas em diferentes níveis de gordura intramuscular em bovinos (Jurie et al. 2007). Os ácidos graxos intracelulares nos adipócitos intramusculares ligam-se ao *FABP4*, facilitando o transporte dos ácidos graxos da membrana plasmática para os locais de oxidação ou esterificação (Lim et al., 2015).

No processo de formação de ácidos graxos, conhecido como *síntese de novo* de ácidos graxos, ocorre a carboxilação de acetil-CoA para formar malonil-CoA por meio da ação da enzima acetil-CoA carboxilase, que é codificada pelo gene da acetil-CoA carboxilase alfa (*ACACA*). Posteriormente, o complexo multienzimático da ácido graxo sintase codificado pelo gene da ácido graxo sintase (*FASN*) entra em ação, e em múltiplas reações enzimáticas em série, une outras moléculas de acetil-CoA às moléculas de malonil-CoA, resultando na síntese de ácidos graxos (Ladeira et al., 2016).

A família de fatores de transcrição *SREBP* possuem um papel fundamental na homeostase energética, promovendo a glicólise, lipogênese e adipogênese (Eberle, et al., 2004). Um único gene denominado proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (*SREBF1*) codifica a produção de três isoformas: SREBP-1a e SREBP-1c. A SREBP-1 está mais relacionada com a regulação dos genes envolvidos na lipogênese (Harvatine et al., 2006), enquanto a SREBP-2 tem maior influência na regulação da expressão dos genes colesterogênicos (Eberle, et al., 2004).

Um estudo demonstrou que a SREBP-1a predomina em células do baço e intestino, atuando na ativação de genes das vias de síntese de ácido graxo e colesterol. Já a SREBP-1c devido ao seu domínio de transativação mais curto é um ativador transcricional mais fraco do que SREBP-1a, entretanto, é a principal isoforma presente no fígado, músculo e tecido adiposo. A expressão de SREBP-1c é regulado principalmente pelo ambiente nutricional, sendo responsável por mediar os efeitos transcricionais da insulina em genes que codificam enzimas envolvidas na glicólise, lipogênese e gliconeogênese (Eberle, et al., 2004).

A proteômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne

Os genes são responsáveis por transcreverem o mRNA, o que leva à produção de proteínas, e estas, realizam funções fisiológicas e atividades biológicas no tecido animal. A proteômica corresponde ao estudo de proteínas de um tecido em um dado momento, e é baseada na separação e identificação de proteínas em uma amostra biológica. Isso permite comparar grupos extremos para uma determinada característica, o que pode revelar biomarcadores que possibilitam o entendimento da ocorrência do fenótipo (Picard et al., 2017). Sua aplicação na ciência da carne permite explorar a base da variação nas características da qualidade da carne, como maciez, cor, capacidade de retenção de água (Bjarnadottir et al., 2012) e a variação na deposição da gordura intramuscular (Mao et al., 2016; Picard et al., 2019).

Picard et al. (2018) avaliaram simultaneamente 20 proteínas em cinco diferentes músculos de uma raça local de bovinos e notaram que existe uma diferenciação nas relações de algumas proteínas expressas, denominados de “biomarcadores” de maciez e teor de gordura intramuscular em diferentes músculos, que são diferentes pelas suas propriedades contráteis e metabólicas. Além disso, os autores relataram que esse conhecimento é importante para o entendimento dos mecanismos relacionados à maciez ou deposição de gordura de acordo com o músculo. No entanto, concluíram que os dados precisam de confirmação em estudos utilizando outras raças de bovinas.

Apesar da concentração de esforços de estudos e da indústria para controlar a qualidade alimentar da carne bovina, um alto nível de variabilidade permanece nas características de qualidade, muitas vezes sendo razões para a insatisfação do consumidor. Assim, para produtores e consumidores, o controle e a gestão da maciez da carne bovina e do conteúdo de gordura intramuscular é encarado como um desafio para uma melhor sustentabilidade do setor (Picard et al., 2019).

Um estudo com bovinos Nelore descreveu 15 proteínas diferencialmente expressas no proteoma da carne de novilhos e tourinhos, com intuito de explicar as diferenças em características de qualidade de carne desses animais (Silva et al., 2019). Os autores observaram um aumento na abundância de algumas enzimas glicolíticas como frutose-bisfosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e triose fosfato isomerase, influenciando principalmente a maciez do músculo

esquelético. No entanto, o estudo de Silva et al. (2019) avaliou tourinhos castrados e novilhas. Poucos estudos na literatura avaliaram os mecanismos moleculares que regulam as características de qualidade de carne de bovinos F1 taurinos-zebuínos machos castrados versus inteiros, submetidos a terminação em confinamento por 180 dias, prática bastante incomum no Brasil.

Grande parte dos estudos de proteômica aplicada à qualidade de carne bovina focaram na comparação de genótipos. Ao realizarem uma abordagem proteômica sobre as diferenças na qualidade da carne bovina entre Angus e Nelore, Rodrigues et al., 2017 concluíram que as variações na qualidade da carne bovina podem estar associadas a diferenças na abundância de proteínas envolvidas com a contração e organização muscular, miofilamentos expressos em fibras de contração rápida ou lenta e proteínas de choque térmico localizadas na mitocôndria ou retículo sarcoplasmático e envolvidas no fluxo celular de cálcio e apoptose.

Com objetivo de aplicar a proteômica na identificação de biomarcadores de maciez na carne bovina, Zhu et al. 2021 observaram que 34 proteínas relacionadas à estrutura muscular, metabolismo energético, proteínas de choque térmico, resposta ao estresse oxidativo e apoptose mostrou abundância diferencial entre os grupos mais macios e menos macio.

Referências

- Anaruma RJ, Reis LG, De Felício PE, Pflanze SB, Rossi S, Zanetti MA, Cônsolo NRB, Silva SL, Saran Netto A (2020) Castration age and growth, meat production and meat quality of Nellore male cattle. **Animal Production Science**, 60:25–731.
- Andreo N, Bridi AM, Soares AL, Prohmann PEF, Peres LM, Tarsitano MA, Takabayashi AA (2016) Fatty acid profile of beef from immunocastrated (BOPRIVA®) Nellore bulls. **Meat Science**, 117:12–17.
- Antoniosi Filho NR, Carrilho E, Lancas FM. (1993). Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 70(10), 1051-1053.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC), **Beef Report, Perfil da Pecuária no Brasil** (2020) Disponível em: Beef Report 2020 – ABIEC Acesso em 29 de maio 2021.
- Baatar D, Hwang SG (2020) Effect of testosterone on the differentiation control of stromal vascular cells isolated from *longissimus* muscle of Hanwoo beef cattle. **Meat Science**, 159:107916.
- Baik M, Jeong JY, Vu TTT, Piao MY, Kang HJ (2014) Effects of castration on the adiposity and expression of lipid metabolism genes in various fat depots of Korean cattle. **Livestock Science**, 168:168–176.
- Baldassini WA, Chardulo LAL, Silva JAV, Malheiros JM, Dias, VAD, Espigolan R, Baldi FS, Albuquerque LG, Fernandes TT, Padilha PM (2017) Meat quality traits of Nellore bulls according to different degrees of backfat thickness: A multivariate approach. **Animal Production Science**. 57: 363–370.
- Ball JJ, Kegley EB, Lawrence TE, Roberts SL, Powell JG, Richeson JT (2018) Zinc injection as a novel castration method in beef bulls: effects on performance, behavior, and testosterone and haptoglobin concentration. **Journal of Animal Science**, 96:890–901.
- Bartle KD, Myers P. (2002). **History of gas chromatography**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21(9-10), 547-557.
- Barton L, Bureš D, Kott T, Reháč D (2011). Effect of sex and age on bovine muscle and adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. **Meat Science**, 89:444–450.
- Berton MP, Fonseca LFS, Gimenez DFJ, Utembergue BL, Cesar ASM, Coutinho LL, Lemos MVA, Aboujaoude CP, Pereira ASC, Silva RMO, Stafuzza NB, Feitosa FLB, Chiaia HLJ, Olivieri BF, Peripolli E, Tonussi RL, Gordo DM, Espigolan R, Ferrinho, AM, Baldi F (2016). Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid. **BMC Genomics**, 17:1–16.

Bjarnadottir SG, Hollung K, Hoy M, Bendixen E, Codrea MC, Veiseth-Kent E (2012) Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine *longissimus thoracis* muscle assessed by isobaric tag for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. **Journal of Animal Science**, 90:2035–2043.

Blanco M, Ripoll G, Delavaud C, Casasús I (2020) Performance, carcass and meat quality of young bulls, steers and heifers slaughtered at a common body weight. **Livestock Science**, 240: 104156.

Brown AC, Powell JG, Kegley EB, Gadberry MS, Reynolds JL, Hughes HD, Carroll JA, Sanchez NCB, Thaxton YV, Backes EA, Richeson JT (2015) Effect of castration timing and oral Meloxicam administration on growth performance, inflammation, behavior, and carcass quality of beef calves. **Journal of Animal Science**, 93:2460–2470.

Calkins CR, Hodgen JM (2007) A fresh look at meat flavor. **Meat science**, 77:63-80.

Carvalho ME, Gasparin G, Poleti MD, Rosa AF, Balieiro, JCC, Labate CA, Nassu RT, Tullio RR, Regitano LCA, Mourão GB, Coutinho, LL (2014) Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat science**, 96(3):1318-1324.

Cecilian F, Lecchi C, Bazile J, Bonnet M (2018) Proteomics research in the adipose tissue. **In Proteomics in domestic animals: from farm to systems biology**, 233-254.

Chardulo LAL, Silveira AC, Vianello F (2013) Analytical aspects for tropical meat quality assessment, in: Lima, G.P.P., Vianello, F. (Eds.), **Food Quality, Safety and Technology**. 53–62.

Costa C, Rizzieri R, Melo G, Müller L, Estevan D, Pacheco R, Millen D, Pereira A, Zanatta M, Cappellozza B, Cervieri R, Martins C, Arrigoni, M. (2020). Effects of fatty acid profile of supplements on intake, performance, carcass traits, meat characteristics, and meat sensorial analysis of feedlot *Bos indicus* bulls offered a high-concentrate diet. **Translational Animal Science**, 4(3), txa142.

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

Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fougère F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, 86(11), 839-848.

Freitas VM, Martins LK, Araujo Neto, FR, Marques TC, Ferreira, RM., Garcia LF, Oliveira EB (2015). Efeitos da castração cirúrgica, imunocastração e homeopatia sobre o desempenho, características de carcaça e comportamento de bovinos machos cruzados terminados em confinamento. **Semina: Ciências Agrárias**, 1725-1734.

Gagaoua M, Terlouw EC, Mullen AM, Franco D, Warner RD, Lorenzo JM, Purslow PP, Gerrard D, Hopkins DL, Troy D, Picard B (2021) Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. **Meat science**, 108311.

Georgiadi A, Kersten S. (2012). **Mechanisms of gene regulation by fatty acids**. *Advances in nutrition*, 3(2), 127-134.

Gómez J, Saran Netto A, Antonelo D, Silva J, Sene G, Silva H, Dias NP, Leme PR, Silva SL, (2017) Effects of immunocastration on the performance and meat quality traits of feedlot- finished *Bos indicus* (Nellore) cattle. **Animal Production Science**. 59:183–190.

Gómez JFM, Netto AS, Antonelo DS, Silva J, Sene GA, Silva HB, Silva SL. (2017). Effects of immunocastration on the performance and meat quality traits of feedlot-finished *Bos indicus* (Nellore) cattle. **Animal Production Science**, 59(1), 183-190.

Govoni KE, Hoagland TA, Zinn SA (2003) The ontogeny of the somatotrophic axis in male and female Hereford calves from birth to one year of age. *Journal of Animal Science*, 81, 2811–2817.

Harvatine KJ, Bauman DE. (2006). SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **The Journal of nutrition**, 136(10), 2468-2474.

Hocquette JF, Gondret F, Baéza E, Médale F, Jurie C, Pethick DW (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, 4:303-319.

Jacinto-Valderrama RA, Sampaio GSL, Lima MLP, Cyrillo JNSG, Pflanzler SB (2021) Immunocastration on performance and meat quality of *Bos indicus* (Nellore) cattle under different nutritional systems. **Scientia Agricola**, 78(2).

Jeong J, Bong J, Kim GD, Joo ST, Lee HJ, Baik M (2013) Transcriptome changes favoring intramuscular fat deposition in the *longissimus* muscle following castration of bulls. **Journal of animal science**, 91:4692-4704.

Jeong J, Kwon EG, Im SK, Seo KS, Baik M. (2012). Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. **Journal of animal science**, 90(6), 2044-2053.

Joo ST, Hwang YH, Frank D (2017) Characteristics of Hanwoo cattle and health implications of consuming highly marbled Hanwoo beef. **Meat Science**, 132:45–51.

Jung DJS, Baik M (2019) Up-regulation of bone morphogenetic protein and its signaling molecules following castration of bulls and their association with intramuscular fat content in Korean cattle. **Scientific Reports**, 9:1–7.

Jurie C, Cassar-Malek I, Bonnet M, Leroux C, Bauchart D, Boulesteix P, Hocquette JF.

(2007). Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. **Journal of Animal Science**, 85(10), 2660-2669.

Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1841, n. 7, p. 919-933, 2014.

Ladeira MM, Schoonmaker JP, Gionbelli MP, Dias JC, Gionbelli TR, Carvalho JRR, Teixeira PD (2016). Nutrigenomics and beef quality: A review about lipogenesis. **International journal of molecular sciences**, 17: 918.

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

Lim D, Chai HH, Lee SH, Cho YM, Choi JW, Kim NK. (2015). Gene expression patterns associated with peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling in the longissimus dorsi of Hanwoo (Korean cattle). **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 28(8), 1075.

Liu R, Liu X, Bai X, Xiao C, Dong Y, (2020) Different expression of lipid metabolism-related genes in Shandong black cattle and Luxi cattle based on transcriptome analysis. **Scientific reports**, 10:21915.

MacNeil LT, Walhout AJ (2011). Gene regulatory networks and the role of robustness and stochasticity in the control of gene expression. **Genome research**, 21:645-657.

Mao Y, Hopkins DL, Zhang Y, Li P, Zhu L, Dong P, Liang R, Dai J, Wang X, Luo X (2016) Beef quality with different intramuscular fat content and proteomic analysis using isobaric tag for relative and absolute quantitation of differentially expressed proteins. **Meat science**, 118:96-102.

Marti S, Realini CE, Bach A, Pérez-Juan M, Devant M (2013). Effect of castration and slaughter age on performance, carcass, and meat quality traits of Holstein calves fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, 91:1129-1140.

Miguel GZ, Faria MH, Roça RO, Santos CT, Suman SP, Faitarone ABG, Savian TV. (2014) Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore x Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. **Meat Science**, 96(2):884–891.

MILLER RK. Factors affecting the quality of raw meat. **Meat processing: Improving quality**, p. 27-63, 2002.

Moreira AD, Siqueira GR, Lage JF, Benatti JMB, Moretti, MH, Miguel GZ, Oliveira IM, Resende FD (2018) Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. **Animal Production Science**, 58:1307–1315.

Nascimento RFD, Lima ACAD, Barbosa PGA, Silva VPAD. (2018). **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**.

Needham T, Lambrechts H, Hoffman LC, (2017) Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare and production traits: invited review. **South African Journal of Animal Science**, 47:731-742.

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

Oliveira EA, Sampaio AAM, Henrique W, Pivaro TM, Rosa BL, Fernandes ARM, Andrade AT (2012) Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science**. 90:28-35.

Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Boudjellal A, Herrera-Mendez CH, Sentandreu MA (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regard to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat science**, 95:854-870.

Park SJ, Beak S, Jin D, Jung S, Kim SY, Jeong IH, Piao MY, Kang HJ, Fassah DM, Na SW, Yoo SP, Baik M (2018). Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—a review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, 31:1043.

Penteado JCP, Magalhães D, Masini JC. (2008). Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, 31, 2190-2193.

Pereira JR., Montagner MM, Fluck AC, Santiago AP, Neres MA (2017) Efeitos do clima sobre a adaptação e fisiologia de bovinos de corte *Bos taurus* x *Bos indicus*. REDVET. **Revista Electrónica de Veterinaria**, 18(11):1-13.

Picard B, Gagaoua M, Al-Jammas M, Bonnet M (2019) Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: Effect of gender and rearing practices. **Journal of proteomics**, 200:1-10.

Picard B, Gagaoua M, Al-Jammas M, Koning LD, Valais A, Bonnet M (2018) Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. **PeerJ**, 6:4891.

Picard B, Gagaoua M, Hollung K (2017) Gene and protein expression as a tool to explain/predict meat (and fish) quality. In: **New aspects of meat quality**. Woodhead Publishing, 2017. p. 321-354.

Ramanathan R, Mancini RA, (2018). Role of mitochondria in beef color: A review. **Meat and Muscle Biology**, 2(1).

Ribeiro AF, Messana JD, José A, Fiorentini, G, Berchielli TT (2016). Fatty acid profile, meat quality, and carcass traits of Nellore young bulls fed different sources of forage in high-concentrate diets with crude glycerin. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 45, 165-173.

Rodrigues RTS, Chizzotti ML, Vital CE, Baracat-Pereira MC, Barros E, Busato KC, Gomes RA, Ladeira MM, Silva MT (2017) Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PLoS ONE**, 12:1–21.

Rosa AN, Martins EN, Menezes GRO, Silva LOC. **Melhoramento genético Aplicado em Gado de Corte**. Brasília: Embrapa, (2013). 258.

Silva DBS, Fonseca LFS, Pinheiro DG, Muniz MMM, Magalhães AFB, Baldi F, Ferro JA, Chardulo LAL, Albuquerque, L. G. (2019). Prediction of hub genes associated with intramuscular fat content in Nelore cattle. **BMC genomics**, 20:1-12.

Silva LHP, Rodrigues RTS, Assis DEF, Benedeti PDB, Duarte MS, Chizzotti ML (2019) Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. **Journal of Proteomics**, 199:51–66.

Socha BM, Lupicka M, Szczepańska AA, Korzekwa AJ. (2017). PPAR expression throughout the oestrous cycle in the bovine endometrium. **Theriogenology**, 100, 88-94.

Strada ESO, Silva RR, Carvalho GGP, Barbosa LP, Prado IN, Araújo FL, Matos LHA, Cruz OTB, Lima Júnior DM (2019). Fatty acid composition of beef cattle finished on tropical pasture and supplemented with crude glycerin. **Semina: Ciências Agrárias**, 40(2), 993-1000.

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

Wang H, Eckel RH. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 297(2), E271-E288.

Zhu Y, Gagaoua M, Mullen AM, Kelly AL, Sweeney T, Cafferky J, Vilada D, Hamill, R. M. (2021). A Proteomic Study for the Discovery of Beef Tenderness Biomarkers and Prediction of Warner–Bratzler Shear Force Measured on Longissimus thoracis Muscles of Young Limousin-Sired Bulls. **Foods**, 10(5), 952

CAPÍTULO 2 – Gene expression, chemical composition, and fatty acid profile of the *longissimus* muscle of F1 Angus-Nellore bulls and steers feedlot finished

Este capítulo está redigido conforme normas de publicação para ser submetido a revista “Meat Science”

Abstract:

This study investigated steers and bull's feedlot finished on gene expression, meat chemical composition, and fatty acid (FA) profile. Gene expression assay revealed that steers showed up-regulation of lipogenic genes ($P < 0.05$) such as acetyl-CoA carboxylase alpha (*ACACA*), fatty acid-binding protein (*FABP4*), fatty acid synthase (*FASN*), peroxisome proliferator activated receptor-gamma (*PPARG*) and stearoyl-coa desaturase (*SCD*), while bulls shown higher expression of the *PPARA* and sterol regulatory element-binding protein 1 (*SREBF1*) genes. It was observed that steers had higher levels ($P < 0.0001$) of intramuscular fat (IMF). A higher proportion of monounsaturated fatty acids was observed in steers ($P < 0.0001$). However, bulls showed higher levels ($P < 0.0001$) of polyunsaturated fatty acids. Thus, F1 Angus-Nellore bulls, even when feedlot finished for 180 days and slaughtered at 20 months of age, does not produce meat with higher IMF and better FA profile, which may be due to less expression of lipogenic genes compared to steers.

Key words: Carcass, lipid metabolism, marbling, meat quality, molecular biology

Introduction

Beef quality can be assessed by the abundance and profile of intramuscular fatty acids (Li et al., 2020). The content of intramuscular fat (IMF) or marbling is one of the most important traits that influence meat quality and the palatability attributes, mainly juiciness, tenderness, and flavor (Park et al., 2018), adding value to the commercial beef cuts (Lee et al., 2018; Seok-Hyeon et al., 2019). Intramuscular fat deposition is a complex biological process that can be regulated by many enzymes, hormones and metabolites that act on adipocyte deposition and differentiation metabolism (Martins et al., 2015), and can be determined by the balance between fat synthesis and degradation in the muscle (Bong et al., 2012).

Moreover, the fatty acid profile of IMF affects meat flavor (Ladeira et al., 2014), but it has also attracted the consumer for its possible effect on human health (Rossi et al., 2016). The deposition of IMF and its fatty acid profile can be influenced by several factors, such as breed, sexual condition, age and nutrition (Albrecht et al., 2011). Among these, castration markedly increases the degree of marbling, improving the beef quality (Jeong et al., 2012; Baik et al., 2014). However, the effect of castration on intramuscular adipose tissue development is not completely clear (Hong et al., 2021).

The identification and understanding of molecular mechanisms such as the expression of genes that regulate the deposition of IMF in beef cattle may help to optimize meat production in the livestock industry. Thus, an analysis of multiple genes, mainly those involved in lipid metabolism, can lead to a better understanding of the effects of these processes on marbled skeletal muscle phenotypes (Lim et al., 2015; Park et al., 2018). Only few studies in the literature reported results of molecular mechanisms that regulate IMF deposition in beef cattle castrated versus non-castrated (Bong et al., 2012; Silva et al., 2019).

Studies evaluated the effects of castration (conventional or immunological) in zebu (*Bos indicus*) and crossbred cattle feedlot finished and showed results on carcass and meat quality traits (Andreo et al., 2016; Martínez et al., 2017; Miguel et al., 2014). These experiments report results with Nellore (Andreo et al., 2016; Martínez et al., 2017) or F1 Angus-Nellore cattle (Miguel et al., 2014) with an initial average age of 24 months and feedlot finished for 90 to 100 days, which is the traditionally feeding period in Brazilian feedlots. According to a national survey, a

similar feedlot period is used for bulls and steers (107.6 and 110.5 days, respectively) in Brazilian production systems located in tropical regions (Andrade et al., 2020).

When finished in feedlot and slaughtered at an early age, the differences in IMF deposition among steers and bulls may be slightly reduced. Regardless of the age, genotype and feeding period, in tropical countries few studies evaluate young animals (24 months) and feedlot finished for 180 days, which support the need for studies with this biological model. We hypothesize that even when fed a high-energy diet for a long feedlot period, bulls may not improve meat quality traits compared to castrated ones. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of castration on the expression of genes related to lipid metabolism, chemical composition of meat and fatty acid profile of F1 Angus-Nellore steers versus bulls finished in feedlot for 180 days and slaughtered at 24 months.

Material and Methods

Ethics Committee Statement

All the procedures performed in the experiment were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the School of Agricultural and Veterinarian Sciences – UNESP/FCAV (CEUA protocol no. 07594/2019).

Animals and experimental diet

The experiment was carried out in the facilities of the experimental feedlot of Fazenda Turbilhão, city of Estrela D'Oeste, São Paulo, Brazil. We used 640 male animals (320 steers and 320 bulls) F1 Angus-Nellore, from the same herd, with an average initial body weight of 298.15 ± 28.58 kg and initial average age of 18 months. The animals were divided into two sex classes (treatments) and distributed in a completely randomized design, being allocated in eight collective pens ($n=4$ /treatment), equipped with concrete bunk and water trough. Each pen had a capacity for 100 animals. The animals stayed there for 180 days, with 14 days of adaptation to the diet and facilities. The experimental diet was common for both treatments (Table 1), provided *ad libitum* twice a day, at 9:00 AM and at 3:00 PM.

Feed intake, performance, and carcass traits

To evaluate dry matter intake, data from daily supplies were collected.

Weighings were performed at the beginning and at the end of the experimental period, obtaining the initial body weight (iBW) and final (fBW).

To calculate the average daily gain (ADG) the following formula was used:

$$\text{ADG} = (\text{fBW} - \text{iBW}) / \text{days in feedlot}$$

Feed Efficiency (EA):

$$\text{EA} = \text{ADG} / \text{DMI kg/day}$$

Hot carcass weight (HCW) and cold carcass weight (CCW) were evaluated. To measure the loin eye area (REA), these were individually marked on transparencies, which were digitized and the area in cm² measured with the aid of the ImageJ® software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, United States). Subcutaneous fat thickness (BFT) was measured with a digital caliper, simulating a 45° angle between the spinous and transverse processes of the 12th thoracic vertebra and expressed in millimeters (mm). Both measures were taken before deboning the carcasses, in order to preserve the original measures.

The hot carcass yield (HCY) was obtained by the formula:

$$\text{HCY} = (\text{HCW} / \text{fBW}) \times 100$$

Where fBW was the final body weight (before the slaughter).

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diet.

Item	Value
Ingredients (% DM)	
<i>Tifton 85</i>	13.98
Ground corn	68.76
Cottonseed Cake	9.00
Peanut meal	4.80
Mineral-vitamin supplement ¹	3.43
Water	0.03
Nutritional composition	
Dry matter (%)	68.00
Crude Protein (%DM)	13.50
Ether Extract (%DM)	3.83
Neutral Detergent Fiber (%DM)	21.28
NEg ² (Mcal/kg)	1.30

¹Supplement mineral-vitamin: 210 g/kg of Ca; 10.3 g/kg of P; 15 g/kg of Mg; 20 g/kg of S; 43 g/kg of Na; 8.6 mg/kg of Co; 428 mg/kg of Cu; 5.7 mg/kg of Cr; 286 mg/kg of Fe; 21 mg/kg of I; 1.285 mg/kg of Mn; 5.7 mg/kg of Se; 1.998 mg/kg of Zn; 86 KUI/kg of Vitamin A; 11.5 KUI/kg of Vitamin D3; 141 KUI/kg de Vitamin E; 490 g/kg de NNP.Eq.CP; 714 mg/kg of monensin sodium.

²Net energy for gain.

Slaughter and collection of samples

After the experimental period of 180 days, all animals were slaughtered in a commercial slaughterhouse (Estrela D'Oeste, SP, Brazil), located 10 km away from the experimental feedlot, following the normal procedures of federal inspection. Fifteen animals per pen were randomly selected, 60 animals from each experimental group, totaling 120 animals for the study of meat quality traits. Due to the greater number of animals, two slaughter groups were formed, and the slaughter occurred on two different days. The animals were individually stunned by brain concussion using a captive dart gun, followed by bleeding, hide removal and evisceration. Subsequently, the carcasses were divided longitudinally and a sample (approximately 20 g) of the *longissimus thoracis* (LT) muscle was collected from the left half carcass at the 12th rib.

As samples were collected, they were placed in ice-cooled tubes containing RNA stabilizer solution (RNAlater; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States),

which were transported to the laboratory, and stored in the freezer at -80 until the beginning of molecular biology analyzes. In the cold chamber, the half-carcasses were cooled at 4°C for 48 h. At deboning, a sample of approximately 15 cm from the LT muscle in the left half carcass was collected, between the 12th and 13th rib. In the laboratory, two 2.54 cm steaks were sectioned, individually vacuum packed and stored at -20°C until the analysis of chemical composition and fatty acid profile.

Gene expression

We used samples from 40 animals (20 steers vs. 20 bulls) from the subsampling of 120 animals. The target and reference gene primers were designed using Primer-BLAST, a platform from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Table 2).

Total RNA was extracted from LT muscle samples using Trizol (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, California, United States) and treated with DNase (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. To analyze the 28S and 18S rRNA bands, the total RNA was electrophoresed on 2.0% (m / v) agarose gel, stained with SYBR Safe (Thermofisher) and visualized on Chemidoc XRS (BioRad, Hercules, California, United States). The amount of RNA (ng / μ L, estimated at 260 nm) and quality (estimated at 260/280 nm and 260/230 nm) were evaluated using a MultiSkan Go spectrophotometer with the aid of a Drop Plate (Thermo Scientific). The synthesis of the cDNA was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions, and the cDNA samples were stored at -20 ° C.

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) using 7.5 μ L of LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States), 0.15 μ L of ROX (Sigma-Aldrich), 1 μ L of primer (200 nM), 4.35 μ L of H₂O and 2 μ L of sample. All the samples were analyzed in duplicate according to the following thermal conditions: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The specificity of the primers was determined based on analysis of the melting curve and 2% agarose gel. The amplification efficiency of each primer was evaluated as described by Macabelli et al. (2014), whereby only primers with efficiency

close to 100% were used. The relative expression was obtained after normalization of the mean values of cycle threshold (Ct) of the target genes by the geometric mean of the Ct values of the reference genes *ACTB*, *GAPDH*, *RPS18* and *HSMBS*, as described by Macabelli et al. (2014).

Table 2. Primer sequences of target and reference genes analyzed through RT-qPCR

Symbol	Gene Name	Primer sequence	Gen Bank ID	Amplicon Size (bp)
<i>ACTB</i>	Actin beta	F:GTCGACACCGCAACCAGTTC R:CACGAGCGCAGCAATATCAT	<u>NM_173979.3</u>	50
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F:AGGTCGGAGTGAACGGATTC R:ATGGCGACGATGTCCACTTT	<u>NM_001034034.2</u>	85
<i>RPS18</i>	Ribosomal protein S18	F: ATTAAGGGTGTGGGGCGAAG R: GTTCCACCTCATCCTCGGTG	<u>NM_001033614.2</u>	90
<i>HMBS</i>	Hydroxymethylbilane synthase	F: GGATGGGCAACTGTACCTGA R: GGACAGGGACATGGATGGTG	<u>NM_001046207</u>	95
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA carboxylase alpha	F:CAACTCCGTACGTGACCA R:AGTTTGATCAGGGACTGCCG	<u>NM_174224.2</u>	117
<i>ACOX1</i>	Acyl-CoA oxidase 1	F:CTTCGAGCGGCCAGATTAGT	<u>BC102761.2</u>	117

<i>CPT2</i>	Carnitine palmitoyl-transferase 2	R:ACTTGCCCCGAACAAGGTCAA F:TTCACAAAGACGTGCTCCGA R:GATCAAAGCCCTGGCCCATT	<u>NM_001045889.2</u>	139
<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	F:AGATGGTGCTGGAATGTGTCA R:GGAGTTCGATGCAAACGTCA	<u>NM_174314.2</u>	103
<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	F:CCACCAAGTCGAACATGGGA R:CAGGGACAGCAGCACCTTG	<u>NM_001012669.1</u>	74
<i>LPL</i>	Lipoprotein lipase	F:CTGGACGGTGACAGGAATGT R:ATGACGTTGGAGTCCGGTTC	<u>NM_001075120.1</u>	84
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	F:CATTTGCTGTGGAGATCGGC R:ACGTGCACAATACCCTCCTG	<u>NM_001034036.1</u>	75
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	F:CCGGGTCTGTGGGGATAAAG R:TCCTCCGGAAGAAACCCTTG	<u>NM_181024.2</u>	80

<i>SCD</i>	Stearoyl-CoA desaturase	F:TGGCGTTCCAGAATGACGTT R:GAAGAAAAGCCACGTCGGG	<u>NM_173959.4</u>	107
<i>SREBF1</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	F:CCGAGAGGCTGTACCCATTG R:CTGGGTAGGGGTTTCTCGGA	<u>NM_001113302.1</u>	70

Chemical composition of meat

The chemical composition of the LT muscle was performed on FoodScan Lab™ equipment (Foss NIRSystems, Inc., USA), in which mean values for the levels of moisture, protein, fat and total collagen were determined. The steaks from the 120 animals previously selected were thawed in a BOD model (MA 415, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil) for 24 h. Subsequently, the steaks were dissected, with visible connective tissues and subcutaneous fat removed from the LT samples. Then the steaks were ground and homogenized for 5 minutes using a mixer. After processing, approximately 180 g of the sample was evenly distributed on the FoodScan reading plate (Anderson, 2007). Three readings per sample were carried out. Samples were homogenized again and placed in the plate for the next reading. The method (923.03) of (AOAC, 2005) was used to determine the ash.

Fatty acid extraction and gas chromatography analysis

We used samples from 40 animals (20 steers vs. 20 bulls) from the subsampling of the 120 animals mentioned above. The lipids were extracted from a sample of approximately 3.0 g of the dissected LT muscle, using the solvents hexane / isopropanol (3: 2 vv– 1), following the method described by (Hara & Radin, 1978). For the transesterification of fatty acids, the methodology described by (Christie, 1982) using a methanol solution of sodium methoxide.

The fatty acid methyl esters were analyzed in gas chromatography, using a chromatograph (Focus GC-Finnigan model; Thermo Finnigan, San Jose, California, United States), equipped with flame ionization detector (DIC) and fused silica capillary column following dimensions 100 m × 0.25 mm × 0.20 µm (CP- Sil 88; Varian, Palo Alto, California, United States). The carrier gas used was hydrogen at a flow rate of 1.8 ml / min. The initial oven temperature was 70 ° C, maintained for 4 min. It was then increased by 13 ° C / min to 175 ° C, where it was maintained for 27 min. The temperature was then increased from 4 ° C / min to 215 ° C, where it was maintained for 9 min, followed by another increase of 7 ° C / min to 230 ° C, where it was maintained for 5 min. The whole process took 65 min. The injection and detection temperatures were 225 ° C and 260 ° C, respectively.

The main fatty acids were identified by comparing the peaks and retention times of the methyl esters in the samples with fatty acid standards using the Supelco TM Component Mix standards (cat. 18919; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, United States) and c9 rumenic acid, t11 CLA (cat. 05632; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, United States). Fatty acids were quantified, and the areas of methyl esters were normalized. The fatty acid results were expressed as a percentage of the area (%) obtained using Software Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Milan, Italy).

We calculated the sums (Σ) of saturated fatty acids (SFA), unsaturated fatty acids (UFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) and the ratios Σ MUFA / Σ SFA, Σ PUFA / Σ SFA and Σ UFA / Σ SFA.

The enzymatic activities of Δ^9 -desaturase for fatty acids C16 and C18 and elongase were estimated using mathematical equations described by (Malau-Aduli, Siebert, Bottema, & Pitchford, 1997).

$$\text{C16 } \Delta^9\text{-desaturase activity} = 100 * [(\text{C16:1cis9}) / (\text{C16:1cis9} + \text{C16:0})]$$

$$\text{C18 } \Delta^9\text{-desaturase activity} = 100 * [(\text{C18:1cis9}) / (\text{C18:1cis9} + \text{C18:0})]$$

$$\text{Elongase activity} = 100 * [(\text{C18:0} + \text{C18:1cis9}) / (\text{C16:0} + \text{C16:1cis9} + \text{C18:0} + \text{C18:1cis9})]$$

The atherogenicity index that is used as a cardiovascular disease risk indicator was calculated according to (Ulbricht & Southgate, 1992).

$$\text{Atherogenicity} = [\text{C12:0} + 4(\text{C14:0}) + \text{C16:0}] / \Sigma\text{UFA}.$$

Statistical analysis

Data on the chemical composition of the muscle, fatty acid profile and gene expression were analyzed for normality of residuals through the Shapiro Wilk test, PROC UNIVARIATE of the SAS 9.4 statistical software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, United States). Data that did not show a normal distribution were transformed using the PROC RANKS procedure (SAS 9.4). Slaughter day was used as a covariate and analysis of variance (ANOVA) was used to test the effects of sex class using the PROC GLM procedure (SAS 9.4). Animals were considered as the experimental unit. Significance was considered when $P < 0.05$.

$$Y_{ij} = \mu + d_i + c_{si} + \epsilon_{ij}$$

Where: μ = overall mean, d_i = slaughter day, c_{si} = sex class effect, and ϵ_{ij} = experimental error.

For feed intake, performance and carcass characteristics data, pens were used as experimental units.

Intramuscular fat content and gene expression data were submitted to Pearson correlation analysis by PROC CORR of SAS 9.4 statistical software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, United States).

Results

Feed intake, performance, and carcass traits

Although castration did not change ($P > 0.10$) dry matter intake (kg/day or % of body weight), steers had lower final body weight, average daily gain, hot and cold carcass weights, as well as lower carcass yield and ribeye area. On the other hand, castration increased ($P < 0.01$) carcass backfat thickness (Table 3).

Table 3. Feed intake, performance and carcass traits of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished.

Item ¹	Sex class		SEM ²	<i>P</i> -value
	Bulls	Steers		
IBW, kg	296.91	299.38	4.5233	0.7727
DMI, kg	10.76	9.51	0.5032	0.1429
DMI, %BW	2.44	2.25	0.1000	0.2899
ADG, kg/day	1.60	1.38	0.0467	0.0043
FE, kg/kg	0.15	0.15	0.0072	0.7959
FBW, kg	585.13	547.44	9.3056	0.0373
HCW, kg	333.71	298.39	7.7625	0.0093
CCW, kg	326.17	290.05	7.9385	0.0088
HCY, %	57.04	54.51	0.5090	0.0008
REA, cm ²	81.03	68.61	2.5683	0.0034
BFT, mm	12.41	18.87	1.5453	0.0012

¹IBW = initial body weight. DMI = dry matter intake. ADG = average daily gain. FE = feed efficiency and FBW = final body weight. HCW = Hot Carcass Weight. CCW = Cold Carcass Weight. HCY = Hot carcass yield REA = ribeye area of longissimus muscle - 12-13th. BFT = Subcutaneous backfat thickness.

²Standard Error of Mean

Expression of lipogenic genes

When comparing the expressions of genes involved with lipid metabolism in the LT muscle, we observed that the expression of *ACACA* (0.038 vs. 0.066; \pm 0.005), *FABP4* (0.010 vs. 0.283; \pm 0.016), *FASN* (0.026 vs. 0.113; \pm 0.013), *PPARG* (0.012 vs. 0.027; \pm 0.003) and *SCD* (0.530 vs. 1.085; \pm 0.099) was lower ($P < 0.05$) in bulls compared to steers, respectively (Figure 1). On the other hand, bulls showed higher levels of expression of *PPARA* (0.472 vs. 0.372; \pm 0.018) and *SREBF1* (0.091 vs. 0.047; \pm 0.008), respectively. The *ACOX1*, *CPT2* and *LPL* genes were not influenced by castration ($P > 0.05$).

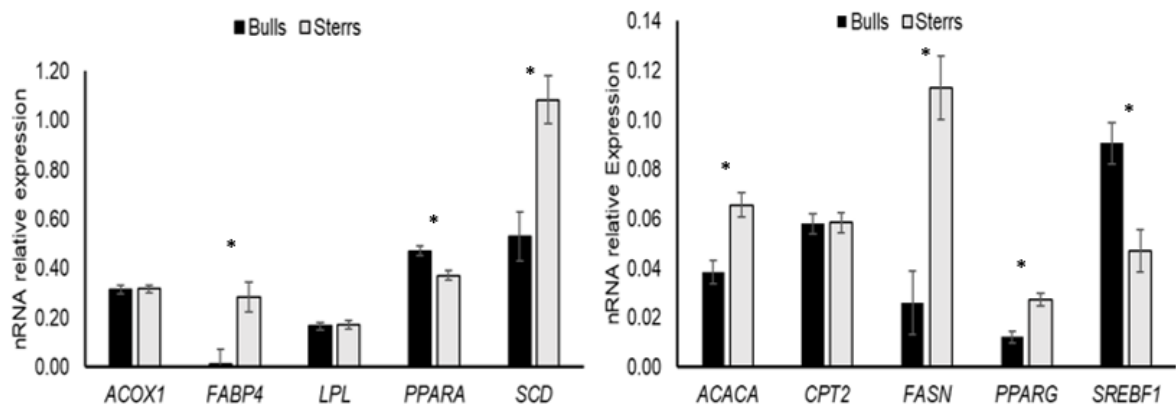


Figure 1. Expression of the lipogenic genes of the longissimus muscle of F1 Angus-Nellore steers (n = 20) and bulls (n = 20) finished in feedlot. Genes: *Acetyl-CoA carboxylase alpha (ACACA)*; *Acyl-CoA oxidase 1(ACOX1)*; *Carnitine palmitoyl-transferase 2 (CPT2)*; *Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)*; *Fatty acid synthase (FASN)*; *Lipoprotein lipase (LPL)*; *Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARA)*; *Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG)*; *Stearoyl-CoA desaturase (SCD)*; *Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1)*.

Positive correlations were observed between the IMF content and the expression of the *ACACA*, *FABP4*, *FASN*, *PPARG* and *SCD* genes (Table 4), on the other hand, negative correlations were observed among *PPARA* and *SREBF1* genes.

Table 4. Correlation coefficients between intramuscular fat content and gene expression of the longissimus muscle of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished

	<i>ACACA</i>	<i>ACOX1</i>	<i>CPT2</i>	<i>FABP4</i>	<i>FASN</i>	<i>LPL</i>	<i>PPARA</i>	<i>PPARG</i>	<i>SCD</i>	<i>SREBF1</i>
IMF ¹ , %	0.46*	-0.05	-0.01	0.39*	0.56*	0.07	-0.39*	0.50*	0.43*	-0.34*

¹Intramuscular fat; P < 0.05*

Table 5. Correlation coefficients among gene expression in longissimus muscle of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished

Genes	<i>ACACA</i>	<i>ACOX1</i>	<i>CPT2</i>	<i>FABP4</i>	<i>FASN</i>	<i>LPL</i>	<i>PPARA</i>	<i>PPARG</i>	<i>SCD</i>
<i>SREBF1</i>	-0.36*	-0.44*	-0.21	-0.17	-0.07	-0.31*	0.31*	-0.42*	-0.20
<i>SCD</i>	0.86*	0.20	0.16	0.85*	0.79*	0.62*	-0.27	0.85*	
<i>PPARG</i>	0.93*	0.31	0.20	0.83*	0.58*	0.71*	-0.37*		
<i>PPARA</i>	-0.24	0.07	0.07	-0.35*	-0.30*	0.01			
<i>LPL</i>	0.69*	0.47*	0.36*	0.62*	0.29*				
<i>FASN</i>	0.59*	-0.05	-0.06	0.69*					
<i>FABP4</i>	0.76*	0.10	0.16						
<i>CPT2</i>	0.23	0.41*							
<i>ACOX1</i>	0.33*								

P < 0.05*

Chemical composition of meat

Castration resulted in an increase in the IMF content ($P < 0.0001$) in LT muscle, which corresponding to 73.5% more IMF in steers versus bulls (an increase of ~ 1.7 times). An effect of the castration ($P < 0.05$) was also observed for the LT muscle moisture and protein contents (Table 6). The meat of steers showed lower values for moisture ($P < 0.0001$) and higher levels of protein ($P = 0.0002$) when compared to bulls. The content of ash and total collagen did not differ ($P > 0.05$) between the experimental groups.

Table 6. Chemical composition of the *longissimus* muscle of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished

Item	Sex class		SEM ¹	P-value
	Bulls (n = 60)	Steers (n = 60)		
Moisture, %	73.48	71.08	0.1572	<0.0001
Protein, %	22.89	23.37	0.0661	0.0002
Fat, %	2.61	4.53	0.1467	<0.0001
Ash, %	1.02	1.02	0.0123	0.9537
Collagen, %	1.22	1.25	0.0130	0.1695

¹Standard Error of the Mean

Fatty acid profile

We observed lower ($P < 0.05$) levels of fatty acids Margaric (C17:0), stearic (C18:0), linoleic (C18:2 cis-9 cis-12), arachidic (C20:0), gamma -linolenic (C18:3 n6), alpha-linolenic (C18:3 n3), CLA (C18:2 cis-9 trans-11), di-homo-γ-linolenic (C20:3 n6), arachidonic (C20:4 n6), eicosapentaenoic (C20:5 n3), docosapentaenoic (C22:5 n) and docosaenoic (C22: 6 n3) in the meat of steers. On the other hand, we observed higher ($P < 0.05$) levels of myristic (C14:0), myristoleic (C14:1 cis-9), palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1 cis-9) fatty acids were observed), heptadecenoic (C17: 1) and oleic (C18:1 cis-9) in the meat of steers compared to bulls (Table 7).

The meat of castrated animals showed lower ($P < 0.05$) values for Σ PUFA, Σ PUFA / Σ SFA, n3, n6 and elongase activity, however, we observed higher ($P < 0.05$) values of Σ MUFA, Σ MUFA / Σ PUFA, C16 and C18 Δ^9 -desaturase activity and atherogenicity index. Total Σ SFA, Σ UFA and the ω -6/ ω -3 ratio was not influenced ($P > 0.05$) by castration.

Table 7. Fatty acid profile of the intramuscular fat of the *longissimus* muscle of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished.

Fatty Acid (% of total fatty acids)	Sex class		SEM ¹	P-value
	Bulls (n = 20)	Steers (n = 20)		
C10:0 (Capric)	0.09	0.07	0.0074	0.0514
C12:0 (Lauric)	0.07	0.07	0.0029	0.0737
C14:0 (Miristic)	2.60	3.74	0.1339	<0.0001

C14:1 cis-9 (Myristoleic)	0.46	0.89	0.0474	<0.0001
C15:0 (Pentadecanoic)	0.28	0.29	0.0096	0.7209
C16:0 (Palmitic)	23.93	27.44	0.5180	0.0002
C16:1 cis-9 (Palmitoleic)	2.41	3.60	0.1300	<0.0001
C17:0 (Margaric)	0.66	0.58	0.0196	0.0281
C17:1 (Heptadecenoic)	0.43	0.56	0.0205	<0.0001
C18:0 (Stearic)	16.80	13.65	0.7266	0.0134
C18:1 cis-9 (Oleic)	33.57	40.03	0.8280	<0.0001
C18:2 cis-9 cis-12 (Linoleic)	8.82	2.32	0.7244	<0.0001
C20:0 (Arachid)	0.11	0.06	0.0051	<0.0001
C18:3 n6 (gamma-linolenic)	0.03	0.01	0.0037	0.0017
C18:3 n3 (alpha-linolenic)	0.23	0.09	0.0164	<0.0001
C18:2 cis-9 trans-11 (CLA)	0.20	0.16	0.0084	0.0208
C20:3 n6 (di-homo-γ-linolenic)	0.39	0.18	0.0313	<0.0001
C20:4 n6 (Arachidonic)	1.77	0.49	0.1595	<0.0001
C20:5 n3 (Eicosapentaenoic)	0.26	0.05	0.0290	<0.0001
C22:5 (Docosapentaenoic)	0.54	0.15	0.0476	<0.0001
C22:6 n3 (Docosahexaenoic)	0.06	0.01	0.0064	<0.0001
ΣSFA	45.31	46.36	0.4325	0.4085
ΣUFA	54.63	53.53	0.4299	0.3590
ΣMUFA	42.26	50.06	0.9842	<0.0001
ΣPUFA	12.37	3.46	10.149	<0.0001
ΣMUFA/ΣSFA	0.94	1.08	0.0264	0.0004
ΣPUFA/ΣSFA	0.28	0.07	0.0235	<0.0001
ΣUFA/ΣSFA	1.22	1.16	0.0228	0.3861
Σn3	0.55	0.15	0.0506	<0.0001
Σn6	2.20	0.67	0.1933	<0.0001
ω-6/ω-3	4.06	4.42	0.1413	0.2144
C16 Δ ⁹ -desaturase	9.11	11.60	0.2876	<0.0001
C18 Δ ⁹ -desaturase	66.85	74.58	14.411	0.0047
Elongase	65.72	63.35	0.5184	0.0203
Atherogenicity	0.63	0.79	0.0203	<0.0001

¹Standard Error of Mean

Discussion

Animal performance and traits.

The better performance and, consequently, higher carcass weight of bulls feedlot finished 180 days may provide to beef cattle producers greater economic return, especially in Brazil, where the carcasses are still not benefited by greater deposition of the IMF. In addition, producers can use crossbred bulls feedlot finished to reach the deposition of subcutaneous fat above 3 mm, the minimum coverage recommended by Brazilian slaughterhouses (Rodrigues et al., 2015), which minimize the losses caused due to lack of fatness (Chardulo et al., 2013).

Expression of lipogenic genes

Lipid metabolism is the mechanism that determines the degree of muscle marbling. being established by a balance between fat synthesis and degradation (Jeong et al., 2012; Bong et al., 2012). The differences in IMF levels between steers and bulls in the present study were possibly due to changes in the lipid metabolism of these animals. The nuclear receptors involved in this mechanism guide the synthesis of fat that occurs in the muscle tissue. Such molecules form a superfamily of intracellular protein receptors included in the class of transcription factors such as *PPARs* and *SREBPs* (Ladeira et al., 2016).

The *PPARA*, *PPARG* and *PPAR β/δ* subtypes make up this *PPAR* subfamily. These molecules play a central role in the transcriptional control of glucose and lipid regulation within the cell (Liu et al., 2014). The first (*PPARA*) is highly expressed in the liver, followed by the small intestine, adipose tissue, and heart (Ladeira et al., 2016). While *PPARG*, which is highly expressed in adipocytes, playing a crucial role in the regulation of adipogenic and lipogenic genes (Kersten, 2014).

The higher expression of *PPARG* in castrated animals is due to the lower production of testosterone in steers compared to bulls. In addition to inhibiting the differentiation of adipocyte precursor cells and suppressing lipid uptake, high levels of testosterone reduce *PPARG* activity (Du et al., 2009; Wandita et al., 2018). On the

other hand, a higher relative expression of *PPARA* was observed in whole animals, supported by the negative correlation observed between the expressions of the *PPARG* and *PPARA* genes (Table 4), a result similar to that found by Teixeira et al. (2017), who analyzed the correlation between these two genes.

Activated *PPARG* is the master regulator of fatty acid storage and adipogenesis, acting as a transcription factor for genes expressed in adipocytes, including fatty acid-binding protein (*FABP4*) and lipoprotein lipase (*LPL*), which contain elements of *PPARG* response (Garin-Shkolnik, Rudich, Hotamisligil, & Rubinstein, 2014). According to Lim et al. (2015), more marbled meats show greater expression of *FABP4*, because it is highly expressed in adipocytes, and has the function of binding to fatty acids, facilitating the transport of the plasma membrane to the oxidation or esterification sites within the intramuscular adipocytes. However, before being transported, they must be synthesized.

According to Ladeira et al. (2016), the primary mechanism in fatty acid synthesis, is de novo synthesis, which uses acetyl-CoA produced in glycolysis. In the fatty acid synthesis process, acetate is the main source of acetyl-CoA, however, when the source of acetyl CoA is glucose, the intramuscular adipose tissue uses a greater proportion of this molecule derived from glycolysis in relation to the subcutaneous adipose tissue (Smith et al., 2018). Thus, acetyl-CoA units are carboxylated by the action of the enzyme acetyl-CoA carboxylase (*ACC*), which is encoded by the acetyl-CoA carboxylase-alpha (*ACACA*) gene, forming malonyl-CoA. Subsequently, the action of a multi-enzyme fatty acid synthase complex encoded by the fatty acid synthase (*FASN*) gene unites another acetyl-CoA molecule to the malonyl-CoA molecules formed in the previous step, in a series of reactions, resulting in the synthesis of long-chain fatty acids (Ladeira et al., 2016). In the study by Bong et al. (2012), the authors observed that bulls had higher levels of *FASN* mRNA and a tendency to higher levels of *ACC* mRNA, suggesting that the increase in lipogenesis contributes to the increase in marbling after castration. Corroborating the results, it was possible to observe a correlation between the IMF content and the *ACACA*, *FABP4*, *FASN*, *PPARG* and *SCD* genes (Table 3). Furthermore, confirming the above theory, positive correlations between the *PPARG* and *ACACA*, *FABP4*, *FASN*, *LPL* and *SCD* genes were also verified (Table 4).

The *SREBP* family has three members: *SREBP-1a* and *SREBP-1c* which are encoded by the gene *SREBF1* and seems to act on genes involved in the synthesis of fatty acids, and *SREBP-2* which has a greater influence on the regulation of the expression of cholesterologenic genes (Eberlé et al., 2004; Ladeira et al., 2016). Schirra et al. (2006) demonstrate that testosterone induces a positive regulation in the expression of genes encoding *SREBPs* 1 and 2, which probably can explain the higher expression of *SREBF1* mRNA observed in bulls. On the other hand, as *SREBF1* is also involved in lipogenesis, the results of the present study suggest that the effect of the expression of that transcription factor was smaller than the effect of *PPARG* in castrated animals (steers). Additionally, a negative correlation was observed between IMF content and the expression of *SREBF1* (Table 3), as well as negative association among genes such as *PPARG* and *SREBF1* (Table 4), which help to explain the lower IMF observed in bulls.

Chemical composition of meat

The meat constituents affected by castration were moisture and IMF content. Previous studies found strong negative correlations for these variables, as the IMF increased, the moisture content reduced (Ueda et al., 2007; Watanabe et al., 2018). Similar results were observed for moisture and IMF in the current study, which corroborate the results reported in our previous study on Angus-Nellore bulls finished in feedlot (Lopes et al., 2020). This relationship may be associated with the deposition of tissue in the meat. As the lipid content increases, the moisture decreases. This is because muscle fibers (cells) have a higher water content than adipocytes. Therefore, when there is more fat, there is less water content in the meat.

Fat deposition and composition in cattle and other ruminants is a complex process with multifactorial regulation (Ladeira et al., 2016), and IMF is a trait that can be influenced by several factors, especially genotype, sex class and nutrition (Panjono, Kang, Lee, & Lee, 2009; Park et al., 2018). In addition, castration can markedly increase the deposition of IMF, as shown in other studies with cattle (Baik et al., 2014; Jeong et al., 2012) and also observed in the current study. When castrated, animals have their anabolic potential reduced (Needham, Lambrechts, & Hoffman, 2017), due

to the decrease in androgenic hormones (Bong et al., 2012; Nogalski et al., 2017; Seideman et al., 1982).

Considering the discrepant values observed in the chemical composition of the meat, the castrated animals (steers) may have had a change in the hormonal balance, which modified the deposition of tissues (bone, skeletal muscle and fat) and, consequently, reduced the animals' physiological maturity or weight to maturity (Alemneh & Getabalew, 2019). Moreover, animals castrated at weaning and kept in the feedlot until slaughter have increased deposition of carcass backfat (fatness) and IMF content (Silva et al., 2019).

Fatty acid profile

In cattle, there is a significant association between sex and the fatty acid profile of meat, as described in the literature (Barton et al., 2011; Nian et al., 2018). Although the cellular and molecular mechanisms related to the direct action of sex hormones in the fatty acid profile of beef are not yet fully understood (Nian et al., 2018), there is evidence of sex hormones acting on lipid metabolism in muscle tissue, influencing enzyme systems (Du et al., 2009).

The highest levels of saturated fatty acids C14:0 and C16:0 found in the meat of castrated animals are possibly related to the greater activity of the enzymes ACC and FAS. Given that, it was observed greater relative expressions (mRNA levels) of the responsible genes for coding these enzymes (Figure 1), which act mainly in *de novo* synthesis in ruminants, where the main products are short and medium chain fatty acids. The highest levels of fatty acids C14:1 cis-9 and C16:1 cis-9 may have been regulated by stearoyl-CoA desaturase (SCD), which introduces a double bond between carbon atoms 9 and 10 of saturated fatty acids (SFA), producing MUFA (Matsushashi et al., 2011; Alwiyah et al., 2016). These results corroborate those observed for the greater activity of the enzyme Δ^9 -desaturase C16:0 (Table 7).

The highest percentage of C18:1 cis-9 in beef is usually lead by a lower proportion of C18:0, which is also a result of the increase in the activity of the enzyme Δ^9 -desaturase, responsible for carrying out this conversion of C18:0 in C18:1 cis-9 (Smith, Gill, Lunt, & Brooks, 2009). Thus, the higher content of C18:1 cis-9 fatty acid for castrated and lower content of C18:0 for bulls can be explained by the higher index

in the activity of the enzyme Δ^9 -desaturase in the meat of the castrated animals (Table 7), which can be confirmed with the higher expression of mRNA for the *SCD* gene (Figure 1), responsible for encoding this enzyme.

Oleic acid is reported in the literature as responsible for reducing the circulating concentration of LDL cholesterol in humans (Kien et al., 2014). Foods that have higher levels of oleic acid are desirable because it has a hypocholesterolemic action, and also acting to protect against coronary heart diseases (Martins et al., 2018). Thus, the production of meat rich in oleic acid can be beneficial to human health (Rossi et al., 2016). According to Monteiro et al. (2006), the linoleic acid found in bovine muscle comes exclusively from food sources. Thus, the higher content of linoleic acid in the meat of bulls may be related to a greater metabolic availability, probably a consequence of a greater escape of the linoleic from ruminal bio-hydrogenation (Monteiro et al., 2006).

The SFA content is usually directly associated with the amount of IMF (Bressan et al., 2011). However, in the present study the content of SFA did not vary. It was observed that there was a compensation of fatty acids in this category, since the meat of bulls had higher levels of C18:0, while higher levels were observed for C14:0 and C16:0 in steers. On the other hand, higher levels of MUFA and lower percentage of PUFA were observed, which can also be related to the difference found in the IMF content between steers and bulls (Figure 2).

According to Nian et al. (2018) the lower IMF content is related to less adipocytes, containing less triglycerides, therefore, it is accompanied by an increase in phospholipids as a percentage of total lipids. Additionally, PUFAs are deposited preferentially in phospholipids (membrane components in muscle tissue), while SFA and MUFA are mainly located in neutral lipids that are present mainly as triglycerides and contain less than 4.0% of PUFA components (Wood et al., 2008).

Although no statistical difference was detected for dry matter intake ($P = 0.14$) (Table 3), this variable can change ruminal passage rates, consequently modifying the ruminal metabolism of dietary fatty acids, providing greater biohydrogenation of unsaturated fatty acids (Rennó et al., 2013).

The higher levels of long chain PUFA's (C20 - C22) observed in the meat of bulls may be due to the activity of testosterone on the enzyme elongase and some

other enzymes that can act in the muscle as an accelerator in the conversion of C18 fatty acids: 2n6 and C18: 3n3 to form long chain PUFA (Nian et al., 2018). This hypothesis can be confirmed by the greater action of elongase in bulls (Table 7).

The changes found for the MUFA / SFA and PUFA / SFA ratios are due to differences observed in the proportions of MUFA and PUFA already reported, since the SFA content was similar among steers versus bulls. Following the same reasoning, the UFA / SFA ratio did not change, as both fatty acid categories did not change. Castration reduced the levels of n3 and n6, however, this reduction was proportional, without causing a change in the n6/n3 ratio in meat in animals considering the sex class.

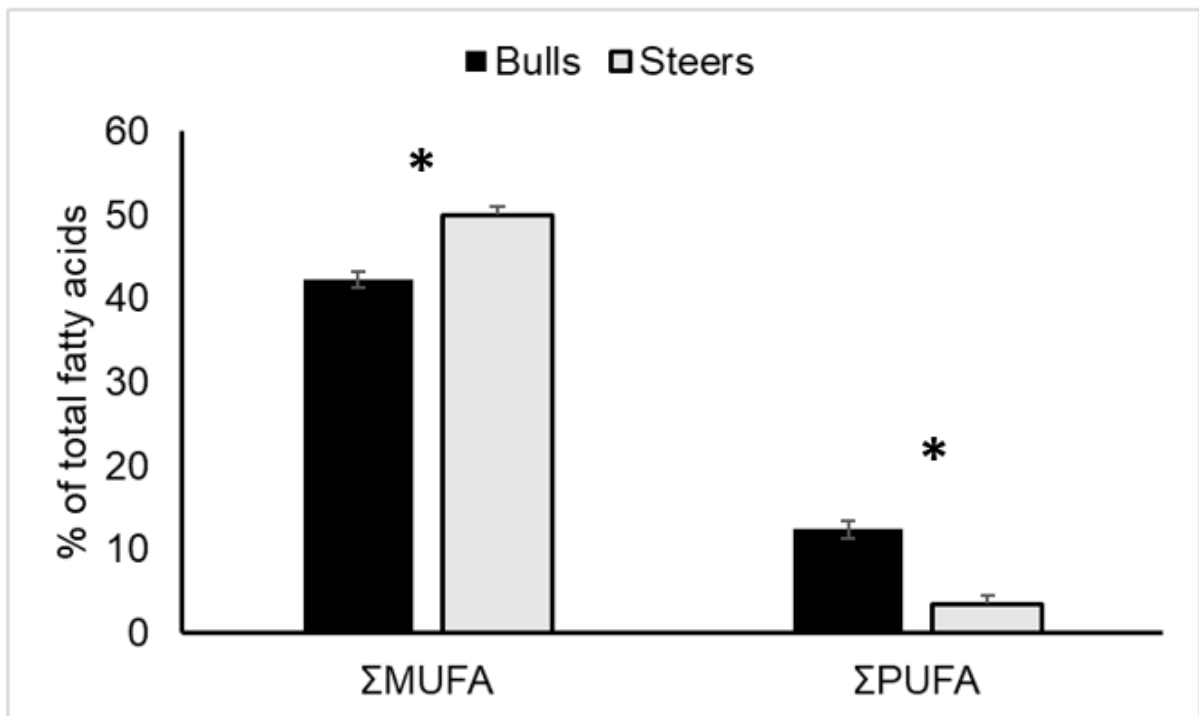


Figure 2. Sum of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids of the *longissimus* muscle of steers and bulls F1 Angus-Nellore feedlot finished.

The atherogenicity index (AI) lists pro and anti-atherogenic acids and indicates the potential stimulation of platelet aggregation (Rossi et al., 2016). As this index decreases, the amount of fatty acids with anti-atherogenic power present in fat increases (Ulbricht & Southgate, 1992). In the present study, it was observed that castration promoted an increase in AI, which can be attributed to the lower PUFA

values of this sex class (Rossi et al., 2016), being slightly above the acceptable level, around 0.7 (Ulbright & Southgate, 1992).

Conclusion

Crossbred Angus-Nellore bulls, even when feedlot finished for 180 days and slaughtered at young age, does not produce meat with higher IMF and better FA profile, which may be due to down regulation of lipid metabolism genes compared to steers. Castration upregulated the expression of genes such as *ACACA*, *FABP4*, *FASN*, *PPARG* and *SCD* in LT muscle of steers, which improves the deposition of IMF. Additionally, steers show differences in IMF fatty acid profile when compared to bulls.

References

Albrecht, E., Gotoh, T., Ebara, F., Xu, J. X., Viergutz, T., Nürnberg, G., & Wegner, J. (2011). Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Science*, *89*(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.012>

Alemneh, T., & Getabalew, M. (2019). SM Gr up International Journal of Factors Influencing the Growth and. *International Journal of Animal Science*, *3*(3), 1048.

Alwiyah, N. H., Agung, P. P., & Jakaria. (2016). Polymorphism Stearoyl-Coa Desaturase (SCD) gene and associaton with characteristics meat in Bali Cattle. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, *41*(4), 188–195. <https://doi.org/10.14710/jitaa.41.4.188-195>

Anderson, S. (2007). Fat, Moisture and protein in meat and meat products. FOSS foodscan near-infrared (NIR) spectrophotometer with FOSS artificial neural network (ANN) calibration model and associated. *Journal of AOAC International*, *90*(4), 1073–1083.

Andrade, T. S., Albertini, T. Z., Barioni, L. G., Medeiros, S. R., Millen, D. D., Santos, A. C. R., Goulart, R. S., Lanna, D. P. D. (2020). Perception of consultants, feedlot owners, and packers regarding the optimal economic slaughter endpoint in feedlots: a national survey in Brazil (Part I). *Canadian Journal of Animal Science*, *100*(4), 745-758.

Andreo, N., Bridi, A. M., Soares, A. L., Prohmann, P. E. F., Peres, L. M., Tarsitano, M. A., & Takabayashi, A. A. (2016). Fatty acid profile of beef from immunocastrated (BOPRIVA®) Nellore bulls. *Meat Science*, *117*, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.029>

Association of Official Analytical Chemists (2005). Official methods of the Association of Official Analytical Chemistry. (16 ed.) Arlington: Washington.

Baik, M., Jeong, J. Y., Vu, T. T. T., Piao, M. Y., & Kang, H. J. (2014). Effects of castration on the adiposity and expression of lipid metabolism genes in various fat

depots of Korean cattle. *Livestock Science*, 168, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.08.013>

Barton, L., Bureš, D., Kott, T., & Reháč, D. (2011). Effect of sex and age on bovine muscle and adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Meat Science*, 89(4), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.007>

Bong, J. J., Jeong, J. Y., Rajasekar, P., Cho, Y. M., Kwon, E. G., Kim, H. C., & Baik, M. (2012). Differential expression of genes associated with lipid metabolism in *longissimus dorsi* of Korean bulls and steers. *Meat Science*, 91(3), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.004>

Bressan, M. C., Rossato, L. V., Rodrigues, E. C., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Ramos, E. M., & Gama, L. T. (2011). Genotype × environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *Journal of Animal Science*, 89(1), 221–232. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2672>

Christie, W. W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylolation of glycerolipids and cholesteryl esters. *Journal of Lipid Research*, 23, 1072.

Du, J., Zhang, L., & Wang, Z. (2009). Testosterone inhibits the activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in a transcriptional transaction assay. *Pharmazie*, 64(10), 692–693. <https://doi.org/10.1691/ph.2009.9606>

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Fofelle, F. (2004). SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>

Garin-Shkolnik, T., Rudich, A., Hotamisligil, G. S., & Rubinstein, M. (2014). *FABP4* attenuates *PPARG* and adipogenesis and is inversely correlated with *PPARG* in adipose tissues. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db13-0436>

Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5)

Hong, H., Baatar, D., & Hwang, S. G. (2021). The difference of castration timing of Korean Hanwoo bulls does not significantly affect the carcass characteristics. *Journal of Animal Science and Technology*, 63(2), 426.

Jeong, J., Kwon, E. G., Im, S. K., Seo, K. S., & Baik, M. (2012). Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in *longissimus dorsi* muscle of Korean cattle steers. *Journal of Animal Science*, 90(6), 2044–2053. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4753>

Kersten, S. (2014). Integrated physiology and systems biology of *PPAR α* . *Molecular metabolism*, 3(4), 354-371.

Kien, C. L., Bunn, J. Y., Stevens, R., Bain, J., Ikayeva, O., Crain, K., ... Muoio, D. M. (2014). Dietary intake of palmitate and oleate has broad impact on systemic and tissue lipid profiles in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 436–445. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.070557>

Ladeira, M. M., Santarosa, L. C., Chizzotti, M. L., Ramos, E. M., Neto, O. R. M., Oliveira, D. M., & Ribeiro, J. S. (2014). Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. *Meat Science*, 96(1), 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.062>

Ladeira, Marcio M., Schoonmaker, J. P., Gionbelli, M. P., Dias, J. C. O., Gionbelli, T. R. S., Carvalho, J. R. R., & Teixeira, P. D. (2016). Nutrigenomics and beef quality: A review about lipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms17060918>

Lee, B., Yoon, S., Lee, Y., Oh, E., Yun, Y. K., Kim, B. Do, & Choi, Y. M. (2018). Comparison of marbling fleck characteristics and objective tenderness parameters with different marbling coarseness within *longissimus thoracis* muscle of high-marbled hanwoo steer. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(3), 606–614. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.3.606>

Li, Y., Wang, M., Li, Q., Gao, Y., Li, Q., Li, J., & Cao, Y. (2020). Transcriptome

profiling of *longissimus lumborum* in holstein bulls and steers with different beef qualities. *PLoS ONE*, 15(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235218>

Lim, D., Chai, H., Lee, S., Cho, Y., Choi, J., & Kim, N. (2015). Gene Expression Patterns Associated with Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Signaling in the *Longissimus dorsi* of Hanwoo (Korean Cattle). *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 28(8), 1075–1083.

Liu, Y. R., Hu, T. M., Lan, T. H., Chiu, H. J., Chang, Y. H., Chen, S. F., & Loh, E. W. (2014). Association of the PPAR-gamma gene with altered glucose levels and psychosis profile in schizophrenia patients exposed to antipsychotics. *Psychiatry Investigation*, 11(2), 179–185. <https://doi.org/10.4306/pi.2014.11.2.179>

Lopes, L. S. F., Ferreira, M. S., Baldassini, W. A., Curi, R. A., Pereira, G. L., Neto, O. R. M., & Chardulo, L. A. L. (2020). Application of the principal component analysis, cluster analysis, and partial least square regression on crossbreed Angus-Nellore bulls feedlot finished. *Tropical Animal Health and Production*, 52(6), 3655–3664. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02402-7>

Macabelli, C. H., Ferreira, R. M., Gimenes, L. U., De Carvalho, N. A. T., Soares, J. G., Ayres, H., & Chiaratti, M. R. (2014). Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. *PLoS ONE*, 9, e93287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093287>

Malau-Aduli, A. E. O., Siebert, B. D., Bottema, C. D. K., & Pitchford, W. S. (1997). A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. *Australian Journal of Agriculture Research*. <https://doi.org/10.1071/A96083>

Martínez, R., Bejarano, D., Gómez, Y., Dasoneville, R., Jiménez, A., Even, G., & Mészáros, G. (2017). Genome-wide association study for birth, weaning and yearling weight in Colombian Brahman cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 40(2), 453–459. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0017>

Martins, T. S., Lemos, M. V. A., Mueller, L. F., Baldi, F., Amorim, T. R., Ferrinho,

A. M., & Pereira, A. S. C. (2018). Fat Deposition, Fatty Acid Composition, and Its Relationship with Meat Quality and Human Health. *Meat Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77994>

Martins, T. S., Sanglard, L. M. P., Silva, W., Chizzotti, M. L., Rennó, L. N., Serão, N. V. L., & Duarte, M. S. (2015). Molecular factors underlying the deposition of intramuscular fat and collagen in skeletal muscle of Nellore and angus cattle. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139943>

Matsushashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., & Kobayashi, E. (2011). Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, *89*(1), 12–22. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3121>

Miguel, G. Z., Faria, M. H., Roça, R. O., Santos, C. T., Suman, S. P., Faitarone, A. B. G., & Savian, T. V. (2014). Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore×Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. *Meat Science*, *96*(2), 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.030>

Monteiro, A. C. G., Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B., Navas, D. R., & Lemos, J. P. C. (2006). Fatty acid composition of intramuscular fat of bulls and steers. *Livestock Science*, *99*(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.04.010>

Needham, T., Lambrechts, H., & Hoffman, L. C. (2017). Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare and production traits: invited review. *South African Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i6.1>

Nian, Y., Allen, P., Harrison, M., & Kerry, J. P. (2018). *Effect of castration and carcass suspension method on the quality and fatty acid profile of beef from male dairy cattle*. (November 2017). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8960>

Nogalski, Z., Pogorzelska-Przybyłek, P., Sobczuk-Szul, M., Nogalska, A., Modzelewska-Kapituła, M., & Purwin, C. (2017). Carcass characteristics and meat

quality of bulls and steers slaughtered at two different ages. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 279–288. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1383861>

Panjono, K. S. M., Lee, I. S., & Lee, S. K. (2009). Carcass characteristics of Hanwoo (Korean cattle) from different sex conditions, raising altitudes and slaughter seasons. *Livestock Science*, 123(2–3), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.024>

Park, S. J., Beak, S., Jin, D., Jung, S., Kim, S. Y., Jeong, I. H., & Baik, M. (2018). *Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle — A review*. 31(7), 1043–1061.

Rennó, F. P., Freitas Júnior, J. E. D., Gandra, J. R., Verdurico, L. C., Santos, M. V. D., Barletta, R. V., Venturelli, B. C., Vilela, F. G. (2013). Fatty acid profile and composition of milk protein fraction in dairy cows fed long-chain unsaturated fatty acids during the transition period. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42, 813-823.

Rossi, L. G., Fiorentini, G., Jose Neto, A., Vieira, B. R., Malheiros, E. B., Borghi, T. H., & Berchielli, T. T. (2016). Impact of ground soybean and starch levels on the quality of meat from feedlot young Nellore bulls. *Meat Science*, 122. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.013>

Schirra, F., Richards, S. M., Liu, M., Suzuki, T., Yamagami, H., & Sullivan, D. A. (2006). Androgen regulation of lipogenic pathways in the mouse meibomian gland. *Experimental Eye Research*, 83(2), 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.11.026>

Seideman, S. C., Cross, H. R., Oltjen, R. R., & Schanbacher, B. D. (1982). Utilization of the Intact Male for Red Meat Production: A Review. *Journal of Animal Science*, 55(4), 826–840. <https://doi.org/10.2527/jas1982.554826x>

Seok-Hyeon, B., Park, S. J., Fassah, D., Kim, H. J., Lee, H. J., Jo, C., & Baik, M. (2019). PSV-37 Relationships among carcass and sensory traits, auction price, and computer image analysis traits of marbling characteristics in Korean beef cattle. *Journal of Animal Science*, 97(Supplement_3), 340–340.

<https://doi.org/10.1093/jas/skz258.678>

Silva, L. H. P., Assis, D. E. F., Estrada, M. M., Assis, G. J. F., Zamudio, G. D. R., Carneiro, G. B., & Chizzotti, M. L. (2019). Carcass and meat quality traits of Nellore young bulls and steers throughout fattening. *Livestock Science*, 229(May), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.09.012>

Smith, S. B., Blackmon, T. L., Sawyer, J. E., Miller, R. K., Baber, J. R., Morrill, J. C., Wickersham, T. A. (2018). Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. *Journal of Animal Science*. doi:10.1093/jas/sky017

Smith, S. B., Gill, C. A., Lunt, D. K., & Brooks, M. A. (2009). Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(9), 1225–1233. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.r.10>

Teixeira, P. D., Oliveira, D. M., Chizzotti, M. L., Chalfun-Junior, A., Coelho, T. C., Gionbelli, M. P., Paiva, L. V., Carvalho, J. R. R., Ladeira, M. M. (2017) Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. *Meat Science*, 133:110–118.

Ueda, Y., Watanabe, A., Higuchi, M., Shingu, H., Kushibiki, S., & Shinoda, M. (2007). Effects of intramuscular fat deposition on the beef traits of Japanese Black steers (Wagyu): Original article. *Animal Science Journal*, 78, 189–194. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00424.x>

Ulbright, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1992). Coronary heart disease and dietary factors. *The Lancet*, 339(8799), 987–988. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91558-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91558-P)

Wandita, T. G., Baatar, D., & Hwang, S. G. (2018). *Development of Marbling in Beef Cattle Can Be Modulated through the Control of Adipogenic Activity*. (January). <https://doi.org/10.2991/fanres-18.2018.21>

Watanabe, G., Motoyama, M., Nakajima, I., & Sasaki, K. (2018). Relationship between water-holding capacity and intramuscular fat content in Japanese commercial

pork loin. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(6), 914–918.

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat science*, 78(4), 343-358.

CAPÍTULO 3 – Efeito da castração sobre a características de carcaça, qualidade de carne e proteoma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore terminados em confinamento

Este capítulo está redigido conforme normas de publicação para ser traduzido e submetido a revista “Meat Science”

Resumo

Objetivou-se investigar o efeito da castração nas características de carcaça, qualidades físicas e o perfil proteômico e mineral da carne de bovinos cruzados, F1 Angus-Nelore terminados em confinamento por período de 180 dias. Foram utilizados 640 animais machos F1 Angus-Nelore. Estudou-se as classes sexuais inteiros e castrados. Animais castrados apresentaram menores ganho médio diário, peso final, pesos de carcaça e área de olho de lombo. Por outro lado, animais desse tratamento tiveram maior espessura de gordura subcutânea. Animais castrados tiveram maiores valores para L*, a*, b*, chroma e hue, e maior pH. A castração regulou positivamente as proteínas: Creatine kinase M-type; Frutose-bisfosfato aldolase; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Troponin T, fast skeletal muscle, entretanto, regulou negativamente: 60 kDa heat shock protein, mitochondrial; ATP synthase subunit beta, mitochondrial; Heat shock cognate 71 kDa protein; Malate dehydrogenase; Myoglobin; Phosphoglucomutase-1; Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial; Triosephosphate isomerase; Troponin I2, fast skeletal type. A castração reduz o desempenho animal, aumenta a deposição de gordura subcutânea e a maciez da carne, melhora a coloração e modula a expressão de proteínas do metabolismo energético e enzimas glicolíticas no músculo *Longissimus*.

Palavras-chave: Desempenho, coloração, maciez, proteômica, zebuínos

Introdução

A intensa busca por melhoria na qualidade da carne, devido ao crescente mercado por essa característica coloca em discussão a castração como tema de diversos estudos (Silva et al., 2019; Blanco et al., 2020; Jacinto-Valderrama et al., 2021), pois, há indícios que animais inteiros na fase de terminação são mais susceptíveis ao estresse e injúrias nas carcaças, reduzindo a qualidade da carne (Gómez et al., 2017). Outras características alteradas pela castração são: a taxa de crescimento, rendimento de carcaça, eficiência alimentar e eficiência de carbono (Cafferky et al., 2019), pois esta, reduz o potencial anabólico do animal (Needham et al., 2017).

Melhorar atributos de qualidade como coloração maciez da carne bovina são encarados como um desafio para a sustentabilidade do setor de carne bovina (Silva et al., 2019b; Picard et al., 2019). E apesar da concentração de esforços em estudos para controlar a qualidade alimentar da carne bovina, um alto nível de variabilidade permanece nas características de qualidade, muitas vezes sendo razões para a insatisfação do consumidor (Hocquette et al., 2014).

Atualmente, a indústria da carne carece de um método objetivo e rápido para estimar a qualidade do produto cárneo, seja no animal vivo ou na carcaça. Abordar essa lacuna de conhecimento e tecnologia aumentaria muito a eficiência da indústria de carne bovina e promoveria a capacidade de gerar produtos de maior qualidade (Gagaoua et al., 2021). Nesse sentido, a utilização de protocolo otimizado para monitoramento de qualidade usando métodos rápidos para registrar a abundância de proteínas específicas de interesse ofereceria uma vantagem para prever a qualidade da carne antes do consumo (Zhu et al., 2021). Dessa forma, a investigação de proteínas do tecido muscular tem sido empregada na ciência da carne para explorar a base da variação nas características de qualidade (Bjarnadottir et al., 2012), visto que as proteínas são os principais constituintes do tecido muscular e responsáveis pela regulação das rotas metabólicas envolvidas na conversão do músculo em carne (Rodrigues et al., 2017). Assim, objetivou-se investigar o efeito da castração nas características de carcaça, qualidades físicas e o perfil proteômico e mineral da carne de bovinos cruzados, F1 Angus-Nelore terminados em confinamento.

Material e Métodos

Declaração do comitê de ética

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Câmpus de Jaboticabal (protocolo nº 07594/2019).

Instalações, Animais e dieta experimental

O experimento foi conduzido nas instalações do confinamento experimental da Fazenda Turbilhão, município de Estrela D'Oeste, São Paulo, Brasil. Foram utilizados 640 animais machos (320 inteiros e 320 castrados) cruzados F1 Angus-Nelore, oriundos do mesmo rebanho, com peso inicial médio de $298,15 \pm 28,58$ kg. Os bovinos foram divididos em duas classes sexuais (tratamentos) e distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo alocados em 8 baias coletivas (4 inteiros e 4 castrados), equipadas com comedouro de concreto e bebedouro automático. Cada baia possuía capacidade para 100 animais, na qual permaneceram alojados por 180 dias, sendo 14 dias destinados para adaptação à dieta e instalações. A dieta experimental foi comum aos dois tratamentos (Tabela 1), tendo sido fornecida de forma ad libitum duas vezes ao dia, às 9:00 h e às 15:00 h.

Tabela 1. Ingredientes e composição química da dieta experimental.

Item	Valor
Ingredientes (% MS)	
<i>Tifton 85</i>	13,98
Milho grão moído	68,76
Torta de Algodão	9,00
Farelo de Amendoim	4,80
Suplemento Mineral e vitamínico ¹	3,43
Água	0,03
Composição Nutricional	
Matéria Seca (%)	68,00
Proteína Bruta (%MS)	13,50
Extrato Etéreo (%MS)	3,83
Fibra em Detergente Neutro (%MS)	21,28
ELg ² (Mcal/kg)	1,30

¹Suplemento mineral e vitamínico: 210 g/kg de Ca; 10,3 g/kg de P; 15 g/kg de Mg; 20 g/kg de S; 43 g/kg de Na; 8,6 mg/kg de Co; 428 mg/kg de Cu; 5,7 mg/kg de Cr; 286 mg/kg de Fe; 21 mg/kg de I; 1,285 mg/kg de Mn; 5,7 mg/kg de Se; 1,998 mg/kg de Zn; 86 KUI/kg de Vitamina A; 11,5 KUI/kg de Vitamina D3; 141 KUI/kg de Vitamina E; 490 g/kg de NNP.Eq.PB; 714 mg/kg de Monensina Sódica. ²Energia líquida de ganho.

Abate e coleta de amostras

Após o período experimental de 180 dias, todos os animais foram abatidos em abatedouro comercial (Estrela D'Oeste, SP, Brasil), localizado a 10 km do confinamento experimental, seguindo os procedimentos normais de fiscalização federal. Foram selecionados 15 animais por curral, sendo 60 animais de cada grupo experimental, totalizando 120 animais para o estudo das características de qualidade da carne. Devido ao maior número de animais, formaram-se dois grupos de abate, sendo que o abate ocorreu em dois dias distintos. Seguindo os procedimentos normais de inspeção federal, sendo precedido de jejum de hídrico e alimentar por 16 horas. Individualmente, os animais foram insensibilizados utilizando a técnica de concussão cerebral com uso de pistola de dardo cativo penetrante, seguida de sangria, esfola e evisceração.

Imediatamente após o abate (carcaça quente), entre a 12^a e 13^a costela da meia carcaça direita, foram coletadas amostras de aproximadamente 20 g do músculo

Longissimus thoracis (LT). Essa etapa teve duração de aproximadamente 1h, sendo todas as amostras acondicionadas em tubos refrigerados com gelo contendo solução estabilizante de RNA (RNAlater; Sigmadrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Posteriormente, essas amostras foram armazenadas em ultra-freezer (-80 °C) até as análises de biologia molecular.

Na linha de abate, as carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas partes simétricas por meio de corte longitudinal da coluna vertebral, pesadas individualmente e submetidas à maturação sanitária a 4 °C por 72 h. No momento da desossa, na meia carcaça esquerda, foi retirada uma amostra de aproximadamente 15 cm do músculo LT, entre a 12^a e a 13^a costela. Essas amostras foram transportadas para o laboratório e, subseqüentemente, seccionadas em bifés de 2,54 cm. Estes foram individualmente embalados a vácuo, sendo que o primeiro bife foi congelado imediatamente e o segundo foi mantido em geladeira a 2 °C por 7 dias. Após esse período, as amostras foram congeladas até o momento das análises físicas de qualidade de carne.

Características de carcaça

Avaliou-se o peso da carcaça quente (PCQ) e peso de carcaça fria (PCF). Para mensuração da área de olho de lombo (AOL), estas foram demarcadas individualmente em transparências, que foram digitalizadas e as área em cm² mensuradas com o auxílio do *software* ImageJ® (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, United States). A espessura de gordura subcutânea (EGS) foi mensurada com paquímetro digital, simulando um ângulo de 45° entre o processo espinhoso e transverso da 12^a vértebra torácica e expressa em milímetros (mm). Ambas às medidas realizadas antes da desossa das carcaças, visando preservar as medidas originais.

Mensuração de pH, coloração, perdas por cocção e força de cisalhamento da carne

Para as análises, as amostras foram descongeladas a 4 °C por 24h, retiradas das embalagens e expostas ao oxigênio por 30 min a 4°C (blooming time). Em seguida, mensurou-se o pH da carne utilizando um medidor de pH digital (Modelo HI 99163, Hanna Instruments, Woonsocket, RI) com sonda de penetração.

A cor da carne (L^* = luminosidade, a^* = intensidade de vermelho, b^* = intensidade de amarelo) foi avaliada usando o sistema CIELab com colorímetro CR-400 (fonte de luz A, ângulo de absorção 10, Y, 0,01 em 160,00% de refletância; Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão), seguindo os procedimentos previamente descritos por (Baldassini et al., 2017). O aparelho foi calibrado usando uma placa padrão preto e branco, em seguida, três leituras de cores foram feitas na superfície da amostra do músculo LT. Uma média das três medidas foi gerada para cada variável (L^* , a^* e b^*).

Com base nos resultados obtidos, calculou-se os índices colorimétrico de chroma (quantidade de cor ou saturação) e hue (cor real), seguindo equações descritas por (Cañeque et al., 2004), utilizando as fórmulas:

$$\text{Chroma}^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{0,5}$$

$$\text{Hue} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

Para as análises de perdas por cocção, as amostras foram colocadas em uma grelha sobre um refratário de vidro e pesadas, mantendo as respectivas identificações. Um termopar foi inserido no centro geométrico de cada amostra, sendo estes acoplados a um termômetro digital modelo DT-612 (ATP Instrumentation, Ashby-de-la-Zouch, UK), para monitorar a temperatura interna das amostras. Os bifes foram assados em forno (Feri90; Venâncio Aires, RS, Brasil) pré-aquecido a 170 °C, equipado com termostato para evitar variações de temperatura. Quando a temperatura interna do bife atingia 40 °C a amostra era virada e permanecia no forno até atingir 71 °C de temperatura interna, conforme metodologia descrita por (Wheeler et al., 1994). Em seguida, as amostras foram retiradas e mantidas em temperatura ambiente por 15 min, pesadas e refrigeradas a 4 °C por 24 h. Assim, obtendo os valores de perda por cozimento, determinados pela diferença dos pesos de antes e depois do cozimento. As perdas por cozimento foram medidas a partir das perdas por gotejamento e evaporação.

Decorrido as 24h de resfriamento, em cada bife assado, oito cilindros com 1,27 cm de diâmetro foram retirados em direção paralela à fibra muscular por meio de um vazador acoplado a uma furadeira industrial. Os cilindros foram seccionados em um aparelho *SALTER Warner-Bratzler Shear Force* (G-R Manufacturing), equipada com uma lâmina de aço inoxidável de 1,18 mm de espessura e 126,77 mm de altura

contendo aresta de corte, com capacidade de 25 kg e velocidade de 20 cm / min. Dessa forma, calculou-se uma média dos oito cilindros retirados de cada bife, apresentando os resultados de força de cisalhamento em quilogramas (kg).

Determinação da concentração de minerais na carne

Para a digestão das amostras, realizou-se em sistema de digestão por microondas em vaso fechado (Ethos-1600, Milestone-MLS, Sorisole, Itália), foram pesados aproximadamente 100 mg de amostra, e 3,0 mL de HNO₃ concentrado, 5 mL de água, juntamente com 2,0 mL de 30% (m⁻¹) de H₂O₂ foram adicionados às amostras. O programa de aquecimento de micro-ondas foi aplicado em três etapas: 15 min para atingir 120 °C, 20 min para atingir 180 °C e um tempo de espera de 20 min a 180 °C (ambos com potência de 1300 W). Após o resfriamento à temperatura ambiente, os volumes foram ajustados para 25 mL com água deionizada.

Um aparelho Optima 8300 ICP-OES (PerkinElmer, Shelton, CT) foi usado para determinação dos minerais Fósforo (P), Cálcio (Ca), Potássio (K), Sódio (Na) e Ferro (Fe).

Análise de proteômica

Para essas análises, de forma aleatória, utilizou-se amostras de 24 animais (12 inteiros e 12 castrados) provenientes da subamostragem dos 120 animais citados anteriormente. Aproximadamente 200 mg do tecido muscular foi macerado em 1000 µL de água deionizada e, posteriormente, centrifugadas a 10.000 rpm e 4°C por 15 minutos. Após centrifugação, em triplicata (tubos separados), 300 µL do sobrenadante foi submetido à precipitação utilizando 600 µL de acetona 80% (proporção 1:2). Nesta etapa as amostras permaneceram sobre refrigeração por 2 horas e, em seguida, foram submetidas a centrifugação a 14000 rpm e 4° C por 30 minutos, formando três pellets por amostra. Subsequentemente, a acetona foi descartada e os pellets foram novamente centrifugados utilizando etanol (1000 rpm, 4° C por 5 minutos).

Utilizando um dos pellets formados na etapa anterior, quantificou-se o teor de proteína total pelo método do Biureto (Gornall et al., 1949). Um segundo pellet foi ressolubilizado em tampão específico contendo 0,07 M de uréia, 0,02 M de tiourea, 2% de [(3-Colamidopropil) dimetilamônio] -1-propano sulfato (CHAPS) (m / v), 10% de

anfólito (faixa de pH 3-10) e 0,002% de azul de bromofenol. Além disso, foram adicionados 2,8 mg de 1,4-ditiotreitol e essa solução foi utilizada nas separações eletroforéticas. O terceiro pellet foi armazenado como reserva a -20 °C.

Eletroforese bidimensional – 2D-PAGE

A partir da solubilização, uma alíquota contendo 375 µg de proteína foi aplicada a cada fita de eletroforese (pH 3-10, 13cm), hidratada por 12 h, submetida a focalização isoelétrica em aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), alquilada e reduzida em soluções de equilíbrio (Baldassini et al., 2015). Em seguida, as fitas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) e submetidas à separação dos *spots* proteicos de acordo com o peso molecular de 14–97 kDa, os géis foram feitos um por animal. Ao término, utilizou-se Coomassie coloidal como marcador dos *spots* proteicos. Após 72 h, os géis foram descoloridos com água ultrapura e digitalizados as imagens foram analisadas.

Análises de imagens

Os géis foram digitalizados, e as imagens analisadas no software ImageMaster Platinum v. 7.0 (Healthcare Bio-Sciences) conforme descrito anteriormente (Baldassini et al., 2015; Braga et al., 2017). Os *spots* proteicos equivalentes (correspondentes) foram identificados dentro dos tratamentos e entre tratamentos, e a edição automática e manual foi realizada para remover os *spots* falsos. Além disso, foram obtidas variáveis como o número de *spots* por gel e o seu volume normalizado (Figura 1). A correspondência dos géis dentro de cada amostra, foi superior a 95% de compatibilidade.

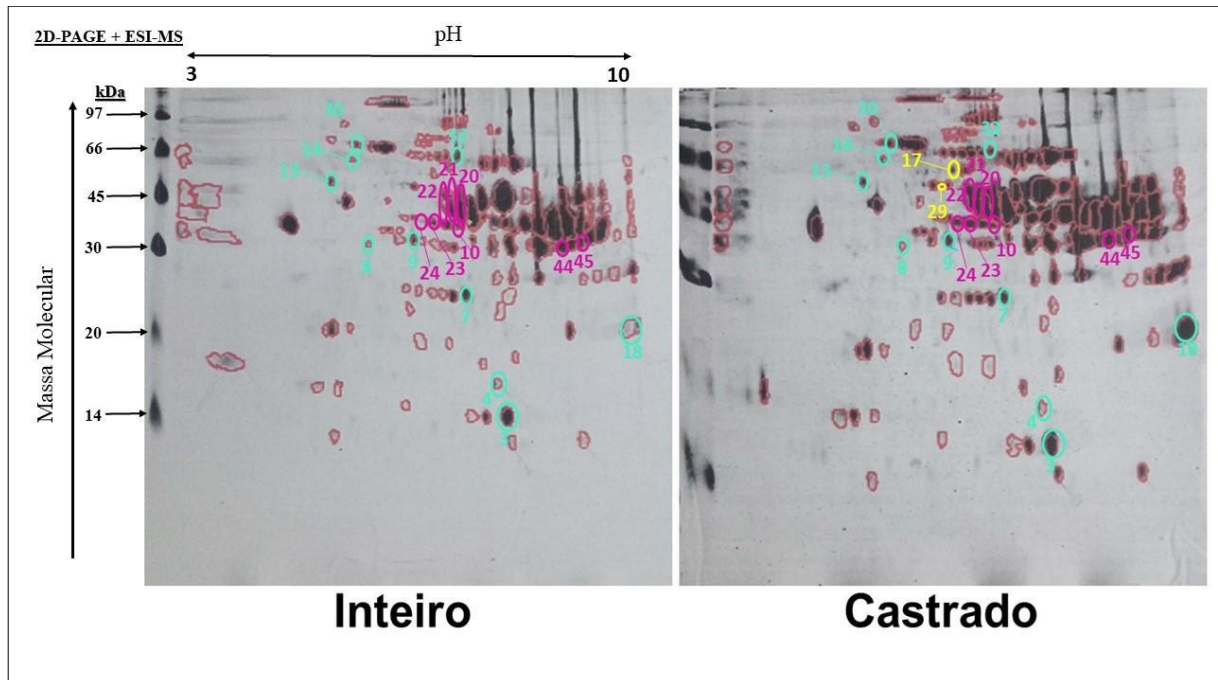


Figura 1. Imagem dos géis com spots proteicos. spots demarcados em azul = significativamente mais expressos em animais inteiros; spots demarcados em rosa = significativamente mais expressos em animais castrados; spots demarcados em amarelo = expressos apenas em animais castrados.

Digestão de proteínas

Inicialmente, os *spots* proteicos diferencialmente expressos foram cortados do gel, colocado em microtubos individuais de 1,5 mL para digestão utilizando tripsina conforme descrito anteriormente (Braga et al., 2017). Os *spots* proteicos foram lavados para remoção de corante e preparados para digestão tríptica (Kit de digestão rápida - Tripsina, Promega Corporation), seguida de eluição de peptídeo.

Identificação das proteínas

Os peptídeos e proteínas dos *spots* diferencialmente expressos foram caracterizados por meio de espectrometria de massas ESI-MS/MS (nanoAcquity UPLCR – nanoAcquity HSS T3, Waters Solutions). O equilíbrio da coluna, gradiente de separação de peptídeos e modo de operação foram conduzidos conforme procedimentos descritos na literatura (Braga et al., 2017). A identificação das proteínas foi realizada por meio do banco de dados UniProt (UniProtKB / Swiss-Prot - www.uniprot.org), e a busca pela espécie *Bos taurus*.

Bioinformática

Estudos de bioinformática foram conduzidos para classificação das proteínas diferencialmente expressas no tecido muscular de castrados versus inteiros quanto aos processos biológicos (BP), função molecular (MF) e componentes celulares (CC). Para tanto, os códigos de acesso das proteínas identificadas por ESI/MS/MS foram inseridas no banco de dados UniProt (www.uniprot.org), extraíndo-se suas sequências FASTA. Após essa etapa, as proteínas foram analisadas utilizando os softwares OMICSBOX v.2.0 (<https://www.biobam.com/omicsbox/>) e Blast2GO (Götz et al., 2008), relacionando as sequências FASTA das proteínas para classificá-las de acordo com os BP, MF e CC.

Adicionalmente, as interações entre as proteínas identificadas nos tratamentos (fêmeas versus machos) foram analisadas utilizando a plataforma STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <http://string.embl.de>). As proteínas com diferenças de expressão entre os grupos experimentais foram utilizadas nessas análises. Essa etapa teve como finalidade gerar as redes de interação entre as proteínas identificadas no presente estudo, bem como suas relações com aquelas não identificadas pelas técnicas 2D-PAGE e ESI-MS/MS. O número de acesso de cada proteína foi carregado no software STRING v.11 (Franceschini et al., 2013), que foi configurado para busca em banco de dados da espécie *Bos taurus*. As interações mínimas foram estipuladas (minimum required interaction score) entre 0,900 (alta confiabilidade), e não mais do que 20 interações foram permitidas na busca no banco de dados. STRING analysis was carried out using STRING 11.0 server to predict protein-protein interactions. The STRING database employs a combination of experimental data (experiments and databases).

Análises Estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro Wilk no PROC UNIVARIATE do software estatística SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2013). Os dados que não apresentaram distribuição normal, foram transformados através do procedimento PROC RANK (SAS 9.4). O dia de abate foi utilizado com covariável, e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para testar

os efeitos da classe sexual para as variáveis de características de carcaça, através do procedimento PROC GLM (SAS 9.4) de acordo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + d_i + c_{si} + \epsilon_{ij}$$

Onde: μ = média geral, d_i = dia do abate, c_{si} = efeito da classe de sexo e ϵ_{ij} = erro experimental.

Para as variáveis de qualidade de carne, além do efeito de classe sexual, testou-se o efeito de dias de maturação, de acordo o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + c_{si} + d_{mj} + \epsilon_{ij}$$

Onde: μ = média geral, c_{si} = efeito da classe sexual, d_{mj} = efeito de dias de maturação e ϵ_{ij} = erro experimental.

Os dados de proteômica foram avaliados no software ImageMaster Platinum v. 7.0 (Healthcare Bio-Sciences), realizando um contraste entre as imagens dos tratamentos. Para todos os dados os animais foram considerados como unidade experimental, adotando significância quando $P < 0,05$.

Resultados

A castração influenciou no desempenho e as características de carcaças de animais F1 Angus-Nelore terminados em confinamento ($P < 0,05$) (Tabela 2). Animais submetidos a castração apresentaram menores ganho médio diário (GMD), peso final (PF), pesos de carcaça quente (PCQ) e fria (PCF), rendimento de carcaça (RC) e área de olho de lombo (AOL). Por outro lado, animais desse tratamento tiveram maior espessura de gordura subcutânea (EGS).

Tabela 2. Desempenho e características de carcaça animais F1 Angus-Nelore inteiros e castrados terminados em confinamento

Item ¹	Classe Sexual		EPM ²	P-valor
	Inteiro	Castrado		
PI, kg	296,91	299,38	4,52	0,7727
GMD, kg/dia	1,60	1,38	0,05	0,0043
PF, kg	585,13	547,44	9,30	0,0373
PCQ, kg	333,71	298,39	7,76	0,0093
PCF, kg	326,17	290,05	7,93	0,0088
RC, %	57,04	54,51	0,50	0,0008
AOL, cm ²	81,03	68,61	2,56	0,0034
EGS, mm	12,41	18,87	1,54	0,0012

¹PI = Peso Inicial, GMD = Ganho Médio Diário, PF = Peso Final, PCQ = Peso de Carcaça Quente, PCF = Peso de Carcaça Fria, AOL = Área de Olho de Lombo e EGS = Espessura de Gordura Subcutânea.

²Erro Padrão da Média.

Houve efeito da castração sobre as variáveis de perdas por cocção e força de cisalhamento ($P < 0,05$) (Tabela 3), sendo observados menores perdas de peso por evaporação (PPE), perdas de peso totais (PPT) e força de cisalhamento (FC) na carne de animais castrados, independentemente do tempo de maturação. Entretanto, animais desse tratamento tiveram maiores perdas por gotejamento (PPG), quando comparados a animais inteiros.

Tabela 3. Perda por cozimento, Características de cor, pH e Força de cisalhamento do Músculo *Longissimus thoracis* em dois tempos de maturação (3 e 10 dias pós morte) de bovinos F1 Angus-Nelore inteiros e castrados terminados em confinamento.

Item ¹	3 dias		10 dias		EPM ²	P-value		
	Inteiro	Castrado	Inteiro	Castrado		CS ³	Dia	CS x Dia
PPE, %	24,93	23,01	23,80	20,66	0,29	<0,0001	0,0005	0,1785
PPG, %	5,11	6,59	5,18	6,39	0,13	<0,0001	0,4051	0,3148
PPT, %	30,04	29,61	28,98	27,05	0,33	0,0496	0,0039	0,2019
L*	29,82	34,58	31,19	35,86	0,24	<0,0001	0,0004	0,8935
a*	14,17	15,90	14,33	16,88	0,16	<0,0001	0,0292	0,1050
b*	5,30	6,83	5,39	6,99	0,09	<0,0001	0,3187	0,6421

Chroma	15,14	17,32	15,33	18,28	0,18	<0,0001	0,0348	0,1216
Hue	20,16	23,41	20,33	22,52	0,19	<0,0001	0,4463	0,1825
pH	5,78	5,59	5,82	5,65	0,02	<0,0001	0,0340	0,7060
FC, kg	4,97	3,68	4,08	3,19	0,08	<0,0001	<0,0001	0,5884

¹PPE = Perda de Peso por Evaporação; PPG = Perda de Peso por Gotejamento; PPT = Perda de Peso Total; L* = Luminosidade; a* = Intensidade de vermelho; b* = Intensidade de amarelo; FC = Força de Cisalhamento.

²Erro Padrão da Média.

³Classe sexual.

Como esperado, observou-se efeito de dias de maturação na carne ($P < 0,05$), no qual, carnes maturadas por 10 dias apresentaram menores valores para as variáveis PPE, PPT e FC, independentemente do tratamento.

Para coloração da carne (Tabela 3), notou-se que independentemente da quantidade de dias de maturação, animais castrados tiveram maiores valores ($P < 0,05$) para as variáveis L*, a*, b*, chroma e hue. Todavia, a carne dos animais inteiros apresentou pH mais elevado em relação aos animais castrados ($P < 0,05$). Efeitos semelhantes foram observados para os dias de maturação, onde, carnes maturadas por 10 dias, tiveram maiores valores para L*, a*, chroma e pH, independentemente do tratamento.

Os teores de fósforo e potássio foram influenciados pela castração ($p < 0,05$), pois a carne de animais castrados apresentou menores teores desses minerais quando comparada a dos inteiros. No entanto, os teores de cálcio, sódio e ferro não diferiram entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de minerais do músculo *Longissimus thoracis* bovinos F1 Angus-Nelore inteiros e castrados terminados em confinamento

Mineral	Classe Sexual		EPM ¹	P-valor
	Inteiro	Castrado		
Fósforo (%)	0,288	0,273	0,0037	0,0391
Cálcio (%)	0,008	0,008	0,0017	0,3469
Potássio (%)	0,228	0,214	0,0034	0,0442
Sódio (%)	0,047	0,046	0,0011	0,6876
Ferro (mg/kg)	6,370	7,401	1,8434	0,6950

¹Erro Padrão da Média.

Na análise de imagens do proteoma do músculo LT inicialmente encontrou-se 48 *spots* proteicos diferencialmente expressos aos tratamentos, dessas, foram identificadas 15 proteínas de diferentes funções biológicas, distribuídas em 21 *spots* proteicos (Tabela 5). A castração regulou positivamente ($P < 0,05$) as proteínas: Creatine kinase M-type (CKM), Fructose-bisphosphate aldolase (ALDOA), Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e Troponin T e fast skeletal muscle type (TNNT3). Por outro lado, nos castrados observou-se regulação negativa das proteínas 60 kDa heat shock protein mitochondrial (HSP60), ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5F1B), Heat shock cognate 71 kDa (HSPA8), Malate dehydrogenase (MDH1), Myoglobin (GLNG), Phosphoglucomutase-1 (PGM1), Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB), Triosephosphate isomerase (TPI1), Troponin I2, fast skeletal type (TNNI2) (Figura 2).

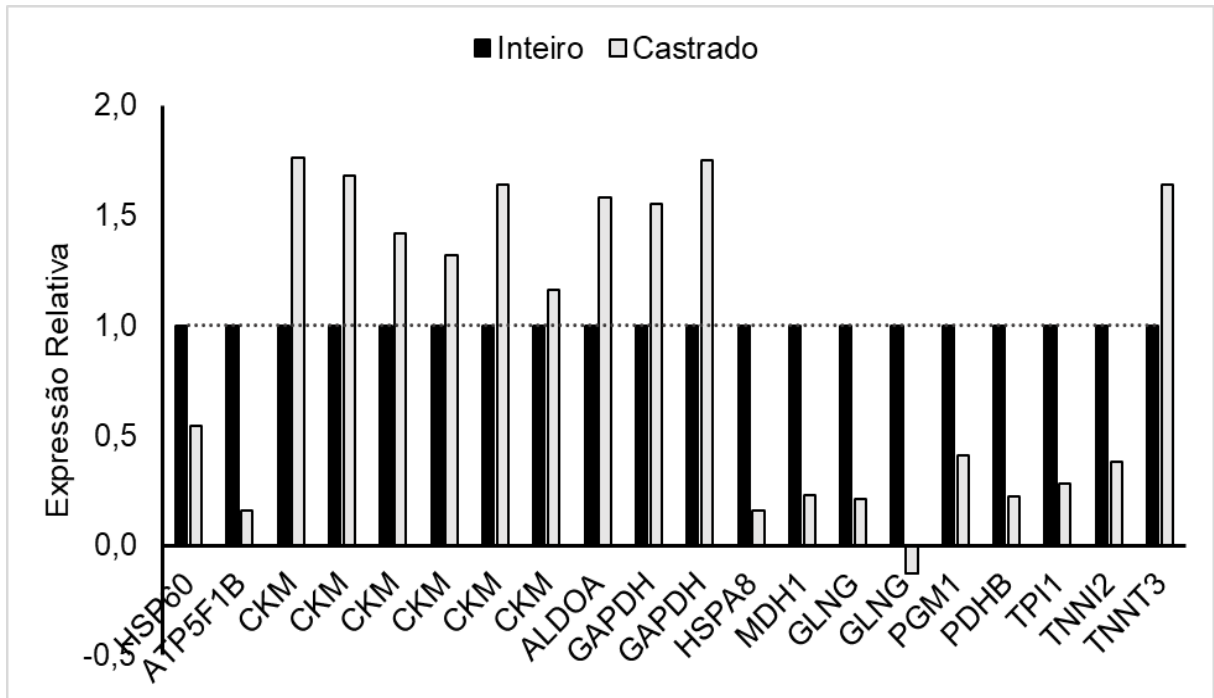


Figura 2. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus Thoracis* de bovinos inteiros e castrados terminados em confinamento.

As proteínas Adenylosuccinate lyase (ADSL) e Alpha-enolase (ENO1), foram observadas apenas em amostras de animais castrados.

Tabela 5. Proteínas diferencialmente abundantes do músculo *Longissimus thoracis* bovinos F1 Angus-Nelore inteiros e castrados terminados em confinamento

Nome da Proteína	Abre ¹	ID Proteína ²	SPOT	pI Teor/Exp ³	kDa Teor/Exp ⁴
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSP60	<u>P31081</u>	14	5,71/5,61	60,68/63,21
Adenylosuccinate lyase	ADSL	<u>A3KN12</u>	17	6,45/6,81	55,48/55,09
Alpha-enolase	ENO1	<u>Q9XSJ4</u>	29	6,37/6,37	47,33/50,54
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5F1B	<u>P00829</u>	13	5,15/5,29	56,28/50,94
Creatine kinase M-type	CKM	<u>Q9XSC6</u>	10	6,63/7,22	42,99/36,02
			20	6,63/7,22	42,99/42,06
			21	6,63/7,11	42,99/42,06
			22	6,63/7,02	42,99/43,76
			23	6,63/6,85	42,99/36,74
			24	6,63/6,70	42,99/37,18
Frutose-bisfosfato aldolase	ALDOA	<u>A6QLL8</u>	11	8,45/7,94	39,44/38,38
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	<u>P10096</u>	44	8,51/8,97	35,87/30,83
			45	8,51/8,90	35,87/32,61
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	<u>P19120</u>	30	5,37/5,67	71,24/75,83
Malate dehydrogenase	MDH1	<u>A0A452DIW4</u>	9	6,15/6,53	35,86/32,35
Myoglobin	GLNG	<u>A0A1K0FUF3</u>	3	6,90/7,80	17,08/14,20
			4	6,90/7,69	17,08/16,23
Phosphoglucomutase-1	PGM1	<u>Q08DP0</u>	32	6,36/7,21	61,59/67,26

Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	<u>P11966</u>	8	6,21/5,77	39,13/30,97
Triosephosphate isomerase	TPI1	<u>Q5E956</u>	7	6,45/7,27	26,69/24,23
Troponin I2, fast skeletal type	TNNI2	<u>F6QIC1</u>	18	9,30/9,78	20,97/20,70
Troponin T, fast skeletal muscle	TNNT3	<u>Q8MKI4</u>	23	5,93/6,85	32,12/36,74

¹Abreviação

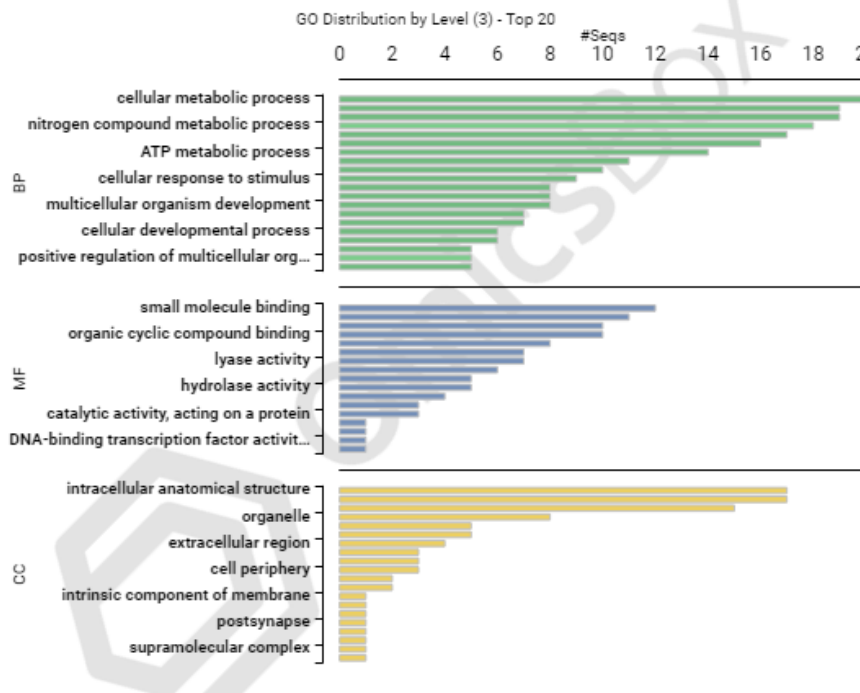
²Identificação da proteína

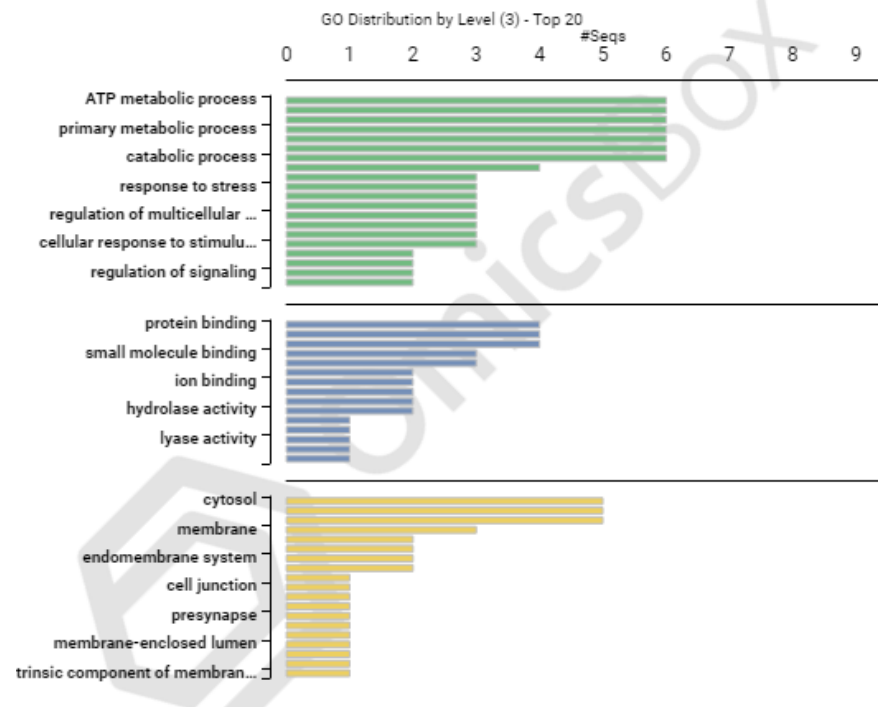
³Ponto Isoelétrico Teórico/Experimental

⁴Peso molecular de proteínas em kDa Teórico/Experimental

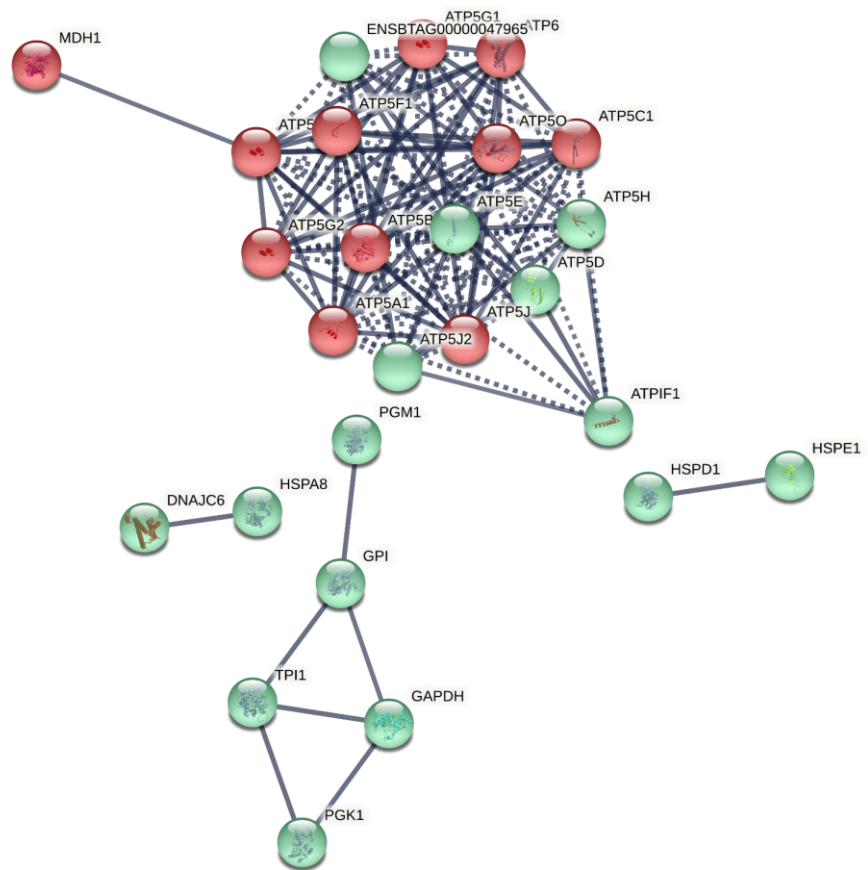
A quantidade de processos biológicos (BP), função molecular (MF) e componentes celulares (CC) das proteínas identificadas divergiu entre bovinos inteiros (Figura 3) versus castrados (Figura 4). Considerando a distribuição dos top 20 níveis (*Gene Ontology*), os BP foram identificados em maiores quantidades nos inteiros, entre os quais destacam-se os metabólicos celulares (20), compostos nitrogenados (18), formação de ATP e resposta ao estímulo (16). Processos divergentes foram observados em menores quantidades nos castrados, sendo os principais aqueles relacionados ao ATP (6), processos primários e catabólicos (6).

Com relação às MF, observou-se predominância nos inteiros de proteínas transportadoras de membrana (12) e de ligação iônica (8). Proteínas com função de hidrólise e catalítica também foram verificadas em maiores quantidades nos inteiros comparados aos castrados. Já sobre os CC identificados, destacam-se nos inteiros diversas proteínas de organização da estrutura celular, enquanto nos castrados foram identificadas mais proteínas do citosol e de membranas.

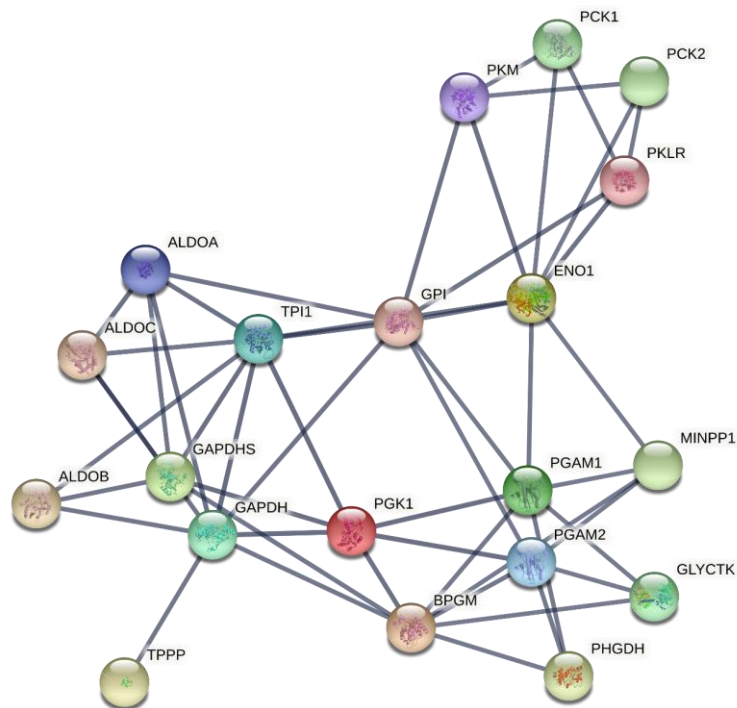




Identificou-se interações entre as proteínas caracterizadas nas amostras de tecido muscular bovino inteiros (Figura 5) e castrados (Figura 6). Dois principais grupos (clusters) foram distinguidos nas inteiros, sendo: Cluster I - proteínas de estresse oxidativo e defesa celular (DNAJ e HSPs), proteínas relacionadas a contração muscular (TPI1), e proteínas do metabolismo energético (GAPDH e PGK1); e Cluster II - proteínas do metabolismo energético (MDH e ATP sintases).



Com relação às proteínas identificadas nos castrados, não foram verificados grupos (clusters), contudo, identificou-se interações entre proteínas de contração muscular (TPP e TPI1) e metabolismo energético (GAPDH e ALDO). Adicionalmente, as interações entre enzimas glicolíticas (PCK1, PKM e PGM1) foram bem consistentes.



Discussão

Os melhores desempenhos de animais inteiros comparados a castrados são consequência principalmente dos efeitos anabólicos da testosterona (Moreira et al., 2018; Blanco et al., 2020), pois a castração reduz a produção de hormônios androgênicos (Bong et al., 2012; Nogalski et al., 2018) e, conseqüentemente, reduz o poder anabólico do animal (Needham et al., 2017). Animais castrados apresentam menor desenvolvimento muscular, entretanto, quando alimentados intensivamente aumentam a deposição de gordura (Silva et al., 2019). Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os descritos na literatura, nos quais também foram observados menores GMD, PF, PCQ, PCF e AOL e maior EGS nos animais castrados em relação aos inteiros (Moreira et al., 2018).

Um dos principais fatores que influenciam a qualidade da carne é o pH (Needham et al., 2017). Este pode ser afetado por diversas causas como estresse pré-abate, composição de fibra muscular e classe sexual (Gómez et al., 2017). O estresse pré-abate reduz os níveis de glicogênio muscular (Zhu et al., 2011), limitando o declínio do pH, resultando em valores mais elevados do pH final carne (Pighin et al.,

2014). Os maiores valores de pH da carne dos animais inteiros do presente estudo podem ser associados ao fato de que essa classe sexual possui maior susceptibilidade ao estresse pré-abate, quando comparados a animais castrados (Resende et al., 2014). Mesmo dada a curta distância de transporte (aproximadamente 10 km) dos animais da fazenda ao abate. Outros estudos na literatura também observaram maiores valores de pH final na carne de bovinos inteiros versus castrados, terminados em confinamento (Kuss et al., 2010; Jacinto-Valderrama et al., 2020).

Valores mais altos de pH final promove o consumo de oxigênio mitocondrial, resultando em uma aparência escura da carne bovina (Ashimore et al., 1972), dessa forma, podendo explicar a menor luminosidade observada na carne de animais inteiros, corroborando com o nosso resultado Miguel et al. 2014 encontraram maiores valores de pH na carne de animais inteiros cruzados Angus x Nelore, comparados aos animais castrados. Em pesquisa sobre coloração da carne Guignot et al. (1994) demonstraram correlação entre o pH final e a coloração da carne, sendo que os valores de L^* e a^* diminuiriam quando o pH final aumentou, corroborando com os resultados encontrados da cor da carne dos animais inteiros com menor teor de vermelho, dado o pH mais alto para essa classe sexual (Nian et al., 2018). Já os menores valores de b^* , provavelmente devido ao menor teor de gordura intramuscular (figura 3, $P < 0,05$) para animais inteiros, pois estes correlacionam-se positivamente (Waritthitham et al., 2010).

As perdas por cozimento podem ser um fator importante na qualidade sensorial da carne, já que esta correlaciona-se negativamente com algumas das características da textura da carne, como, maciez e suculência (Sandowska, 2017). De acordo Zhang. (2010) a classe sexual afeta a capacidade de retenção de água da carne bovina, e menores perdas por cozimento foram observadas em animais castrados comparados a animais inteiros (Moran et al., 2017; Cafferky et al., 2019). Em contraposição, Gómez et al., (2017) relataram que animais inteiros apresentam menores perdas de cozimento, devido apresentar maior valor final de pH, por este favorecer o aumento da capacidade de retenção de água da carne e consequentemente, diminuição da perda por cozimento. Entretanto em nosso estudo, observou-se maior perda por cocção para os animais inteiros, assim, infere-se que as

diferenças na perda por cocção em carnes derivadas desses animais, são explicados pelas diferenças nos teores de gordura intramuscular (Figura 3) entre as classes sexuais (Zhang et al., 2010). A capacidade de retenção de água da carne é influenciada pelo teor de gordura intramuscular, conforme o teor de gordura intramuscular aumenta, o teor de umidade diminui, conseqüentemente, as perdas de água durante o cozimento são menores em carnes com alto teor de gordura (Frank, Joo & Warner, 2016). Além disso, animais inteiros têm maior diâmetro das fibras musculares, induzida por andrógenos, músculos de área transversal aumentada exibem maior perda de cozimento (Cafferky et al., 2019).

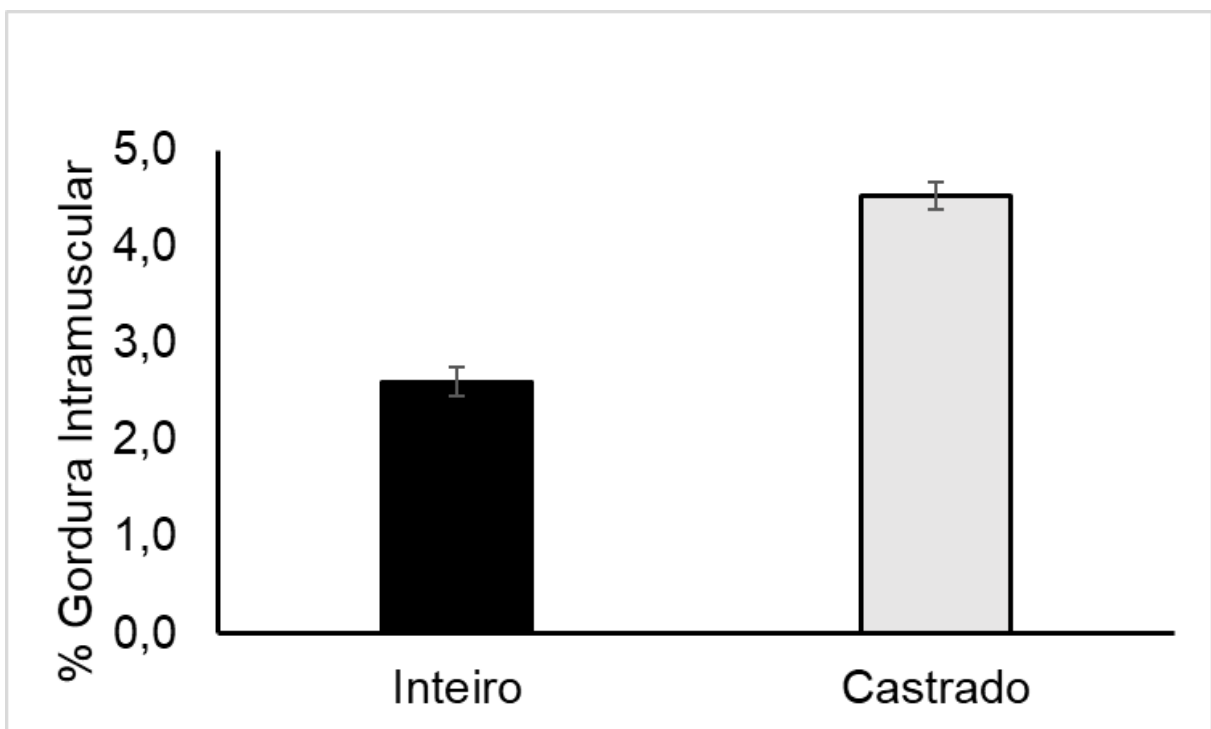


Figura 3. Teor de gordura intramuscular do músculo *Longissimus Thoracis* de bovinos inteiros e castrados terminados em confinamento.

A maciez é considerada uma das características de qualidade da carne mais importantes, mas também é altamente variável (Koochmaraie et al., 2002). A caracterização desse atributo da carne, depende da estrutura de dois principais componentes proteicos de um músculo, ou seja, proteínas do tecido conjuntivo intramuscular e proteínas miofibrilares (Nogalski et al, 2017). A condição sexual atua na hipertrofia muscular de animais inteiros pode ser suportada pelo aumento da atividade da calpastatina (Morgan et al., 1993), o que reduz a taxa de amaciamento pós-morte (Huff-Lonergan et al., 1995). A gordura intramuscular também contribui

indiretamente para a maciez da carne, causando a remodelação das estruturas do tecido conjuntivo intramuscular e reduzindo sua resistência mecânica (Zhang et al., 2010), suportando os resultados encontrados (Figura 3). Savell e Cross (1988) apoiaram a relação entre aumento da gordura intramuscular e maciez da carne pela teoria da densidade do volume, como a densidade da gordura é menor do que a proteína desnaturada pelo calor na carne cozida, à medida que o percentual de gordura aumenta, a densidade geral da carne diminui, aumentando a maciez.

Além disso, a deficiência de potássio causa relaxamento muscular, uma condição que pode resultar em carne mais macia após o abate. Dessa forma, menor teor de potássio na carne de animais castrados ajudam a explicar maior maciez, pois o maior teor desse mineral na carne foi relacionado a uma carne mais dura em bovinos Nelore (Tizioto et al., 2014).

Pesquisas têm reportado a influência da condição sexual sobre o proteoma muscular (Silva et al., 2019) e os avanços nessa área da ciência indica proteínas que contribuem para a estabilidade da cor (Gobert et al., 2014), principalmente as envolvidas na contração muscular, metabolismo energético, vias de sinalização, chaperonas e que possuem funções de apoptose (Veiseth-Kent et al., 2018). A intensidade dessas atividades pela célula é controlada pela atividade das mitocôndrias, organelas responsáveis pela respiração celular (Ramanathan e Mancini, 2014; Osellame et al., 2017). Cortes mais escuros da carne bovina podem ser resultado de pH mais alto, que impede a diminuição da atividade mitocondrial que normalmente ocorre à medida que o pH muscular diminui após o abate do animal. Como resultado, um aumento na atividade mitocondrial promove o consumo de oxigênio e escurece o músculo devido à diminuição da pressão parcial de oxigênio (Ramanathan e Mancini, 2014). Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, onde animais inteiros apresentaram regulação positiva para as proteínas com diferentes funções dentro da mitocôndria, sendo elas a HSP60 (importante regulador de coenzimas e enzimas, que interagem com ATP), ATP5F1B (produtor de ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana que é gerada por complexos de transporte de elétrons da cadeia respiratória), PDHB (responsável por catalisar a conversão global do piruvato para acetil-CoA e CO₂, ligando a via glicolítica a ciclo tricarboxílico) e a GLNG que tem função de reservar e

facilitar o movimento de oxigênio dentro dos músculos. Além disso, a mioglobina (menos expressa no músculo LT dos castrados) faz parte do proteoma sarcoplasmático que possui 30% das proteínas totais do músculo esquelético e regulam diferentes processos bioquímicos que influenciam a estabilidade da cor da carne (Joseph et al., 2012).

Ao avaliar o proteoma, Canto et al. (2015) encontraram correlação positiva da variável a^* (intensidade de vermelho) com cinco proteínas, dentre elas a GAPDH, corroborando com os resultados da avaliação do proteoma do músculo LT, no qual observou-se maior expressão dessa proteína em animais castrados. Em outro estudo, Gagaoua et al. (2015) observaram correlação positiva da proteína MDH1 com a variável a^* no LT de animais Blonde d'Aquitaine. A maior expressão de GAPDH e MDHY, bem como as interações proteína-proteína observadas, podem ajudar a explicar as diferenças na cor da carne observadas no presente estudo.

A relação entre a concentração de mioglobina e a estabilidade da cor do músculo (Canto et al., 2015). Na literatura são encontrados relatos divergentes, (King et al., 2011) observaram maiores concentrações de mioglobina nas carnes com cor instável em relação com cor estável, enquanto, Jeong et al. 2009; Canto et al. 2015 relataram concentração mais baixa de mioglobina no músculo bovino apresentaram coloração mais estável em relação ao com maior concentração de mioglobina. No presente estudo foi observado maiores expressões da proteína mioglobina (GLNG) em animais inteiros. Ressaltando que dos parâmetros de qualidade que influenciam a comercialização da carne bovina fresca, a cor é o mais importante porque, no ponto de venda, os consumidores costumam associar vermelho-cereja brilhante da carne bovina fresca e vermelho-púrpura da carne bovina embalada a vácuo como indicadores de salubridade (Suman et al., 2014).

A proteína PGM1 foi selecionada como um biomarcador da cor da carne bovina (Gagaoua, et al., 2020). Sua implicação nas características de qualidade da carne pode ser atribuída a dois mecanismos (Gagaoua et al., 2021). Primeiro, o estado de hipóxia no músculo post-mortem aumenta a atividade e abundância de PGM1, o que afeta o equilíbrio entre glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato (Gustafsson et al., 2020) e, conseqüentemente, a taxa e extensão de declínio do pH (Gagaoua et al., 2020). Outra maneira seria que a PGM1 sofre modificações pós-tradução por meio de

fosforilação, acetilação e metilação, assim, as associações de PGM1 com parâmetros de cor podem ser influenciadas por suas isoformas (Anderson et al., 2014). Dessa forma, a segunda maneira poderia explicar nossos resultados, entretanto, não foi avaliado fosforilação de proteínas no presente estudo. Dentre as proteínas reguladas de forma diferente, em carnes macias foram observados maior abundância de enzimas glicolíticas (ENO1, PGM1, TPI) (D'Alessandro et al., 2012), divergindo dos resultados observados no presente estudo. Em contrapartida, Silva et al., 2019, observaram que abundância da PGM1 na amostra de carne não maturada foi negativamente correlacionada com força de cisalhamento, sugerindo que este poderia ser um biomarcador para prever a maciez da carne antes do abate. Ao relacionar com a maciez, observa-se resultados semelhantes sobre a PGM1 ao encontrado em nosso trabalho.

De acordo (Gobert et al. 2014; Baldassini et al. 2015) às proteínas da família HSPs, são potenciais biomarcadores de sensibilidade, assim, as maiores expressões das proteínas HSP60 e HSPA8 em animais inteiros parecem ter influenciado a maciez da carne deste grupo de animais. Nesse sentido, de acordo com (Ouali et al., 2013; Veiseth-Kent et al., 2018) as proteínas de choque térmico como têm diversas funções a propriedades anti-apoptóticas e podem contribuir para atrasar o início da apoptose pós-morte e, portanto, também influenciar no desenvolvimento de maciez e na taxa de conversão de músculo em carne (Gagaoua et al., 2021).

Silva et al. (2019) observaram que a castração regulou positivamente a expressão da isoforma TNNT3, que foi listada como bom biomarcador molecular (Gagaoua et al., 2021). A castração também foi responsável por elevar a abundância da proteína CKM (Silva et al., 2019). Quanto correlacionada com a maciez da carne, a CKM mostrou correlação negativa da maciez da carne proteína com, enquanto, a proteína GAPDH apresentou correlação positiva.

A CKM desempenha um papel central na transformação de energia em tecidos com grandes demandas energéticas, como músculo esquelético (Hornemann et al., 2003). A presença da CKM na banda M sugere um papel enzimático adicional para a banda M dentro do sarcômero e impacto no amaciamento da carne pós-morte (Gagaoua et al., 2021). De forma semelhante, a maior expressão de CKM nos animais castrados versus inteiros pode ter contribuído para as diferenças observadas na

maciez instrumental da carne. A relação de maciez e abundância de GAPDH podem ser relacionadas a diferenças na sensibilidade à insulina ou hormônios sexuais entre os gêneros. Os estrogênios e seus receptores regulam as vias do metabolismo energético, incluindo transporte de glicose, glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória mitocondrial e β -oxidação de ácidos graxos (Gagaoua et al., 2021).

Abundância e atividade elevadas de ALDOA são indicativas de aumento da atividade glicolítica no abate (Gagauoua et al., 2021), ou maiores proporções de fibras musculares rápidas (Picard et al., 2018), ambos estão frequentemente associados à sensibilidade (Reiche et al., 2019). Em relação à glicolise, os resultados observados foram consistentes em relação às diferenças no metabolismo de glicose entre inteiros e castrados, o que ajuda a explicar diferenças em maciez e cor, por exemplo.

Ao avaliar biomarcadores de maciez da carne de acordo com o tipo de músculo e animal (Guillemin et al., 2011) observaram que a abundância de Eno1 e Eno3 (enzimas glicolíticas) foi maior em castrados do que em inteiros. A Eno1, é uma enzima glicolítica que catalisa a conversão de 2-fosfo-D-glicerato em fosfoenolpiruvato. De acordo com os autores, os músculos dos castrados são mais glicolíticos do que os dos inteiros (Brandstetter et al., 1998).

Outra importante proteína que tem contribuído para as diferenças observadas na maciez da carne é a MDH1 que está presente tanto no citosol como nas mitocôndrias, desempenhando um papel fundamental no complexo malato-aspartato, na última etapa do ciclo de Krebs, ele usa a redução de NAD⁺ em NADH para catalisar reversivelmente a oxidação de malato a oxaloacetato (Gagaoua et al., 2015; Gagauoua et al., 2021). Além disso, a MDH1 também pode implicar no apoptose, como resposta à privação de glicose (Gagaoua et al., 2015), sugerindo a sua atuação na maciez da carne. Entretanto, essa atuação é divergente, estudos encontraram maiores expressões em carne mais macias, enquanto outros, em carne menos macias Picard et al., 2019, a exemplo dos resultados encontrados neste estudo.

A enzima TPI1 da via glicolítica desempenha um papel importante na geração de energia para as células musculares; catalisando a interconversão de dihidroxi-acetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, substrato diretamente envolvido na via glicolítica (Picard et al., 2018). A enzima TPI é necessária para o crescimento e manutenção celular (Chen et al., 2017). O gene TPI1 foi mais expressa em bovinos

com alto teor de marmoreio (Shin & Chung, 2016). Foi ainda proposto como um biomarcador potencial estabilidade de cor e desenvolvimento durante o armazenamento em carne bovina (Gagaoua et al., 2017a; Gagaoua et al., 2017b) e pH final (Gagaoua et al., 2017a). Divergente de nossos resultados, a TPI1 foi observada com maior abundância no grupo de carne macia (Malheiros et al., 2018).

Conclusão

A castração reduz o desempenho animal e aumenta a deposição de gordura subcutânea em bovinos confinados. Bovinos F1 Angus-Nelore castrados produzem carnes com melhor coloração e maciez em comparação aos inteiros. Essas melhorias resultaram de diferenças observadas no teor de gordura intramuscular, perfil mineral e maior expressão de proteínas do metabolismo energético e enzimas glicolíticas, bem como suas interações no músculo *Longissimus thoracis*. Além disso, nos castrados a menor expressão de proteínas de estresse oxidativo contribui para as diferenças observadas em qualidade de carne.

Referências

Ashimore, C. R., Parker, W., & Doerr, L. (1972). Respiration of mitochondria isolated from dark- cutting beef: postmortem changes 1. *Journal of animal science*, *34*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Baldassini, W. A., Braga, C. P., Chardulo, L. A. L., Silva, J. A. V., Malheiros, J. M., Albuquerque, L. G., Fernandes, T. T., & Padilha, P. M. (2015). Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine *longissimus thoracis* muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry*, *169*, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.131>

Baldassini, W. A., Chardulo, L. A. L., Silva, J. A. V., Malheiros, J. M., Dias, V. A. D., Espigolan, R., Baldi, F. S., Albuquerque, L. G., Fernandes, T. T., & Padilha, P. M. (2017). Meat quality traits of Nellore bulls according to different degrees of backfat thickness: A multivariate approach. *Animal Production Science*, *57*(2), 363–370. <https://doi.org/10.1071/AN15120>

Bjarnadottir, S. G., Hollung, K., Høy, M., Bendixen, E., Codrea, M. C., & Veiseth-Kent, E. (2012). Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine *Longissimus thoracis* muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *Journal of Animal Science*, *90*(6), 2035-2043.

Blanco, M., Ripoll, G., Delavaud, C., & Casasús, I. (2020). Performance, carcass and meat quality of young bulls, steers and heifers slaughtered at a common body weight. *Livestock Science*, *240*(April), 104156. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104156>

Bong, J. J., Jeong, J. Y., Rajasekar, P., Cho, Y. M., Kwon, E. G., Kim, H. C., Paek, B. H., & Baik, M. (2012). Differential expression of genes associated with lipid metabolism in *longissimus dorsi* of Korean bulls and steers. *Meat Science*, *91*(3), 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.004>

Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Grove, R. A., Boone, C. H. T., Leite, A. de L.,

Buzalaf, M. A. R., Fernandes, A. A. H., Adamec, J., & Padilha, P. de M. (2017). A proteomic approach to identify metalloproteins and metal-binding proteins in liver from diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 817–832.

Brandstetter, A. M., Picard, B., & Geay, Y. (1998). Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle: II. Effect of castration and feeding level. *Livestock Production Science*, 53(1), 25-36.

Cafferky, J., Hamill, R. M., Allen, P., O'Doherty, J. V., Cromie, A., & Sweeney, T. (2019). Effect of Breed and Gender on Meat Quality of *M. longissimus thoracis et lumborum* Muscle from Crossbred Beef Bulls and Steers. *Foods*, 8(5), 173.

Cañeque, V., Pérez, C., Velasco, S., Díaz, M. T., Lauzurica, S., Álvarez, I., Ruiz De Huidobro, F., Onega, E., & De La Fuente, J. (2004). Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. *Meat Science*, 67(4), 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.002>

Canto, A. C., Suman, S. P., Nair, M. N., Li, S., Rentfrow, G., Beach, C. M., ... & King, D. A. (2015). Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef *Longissimus lumborum* color stability. *Meat science*, 102, 90-98.

D'Alessandro, A., Rinalducci, S., Marrocco, C., Zolla, V., Napolitano, F., & Zolla, L. (2012). Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network. *Journal of proteomics*, 75(14), 4360-4380.

Frank, D., Joo, S. T., Warner, R. (2016). Consumer Acceptability of Intramuscular Fat. *Korean journal of food science of animal resources*. 36. 699-708. [10.5851/kosfa.2016.36.6.699](https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.699).

Gagaoua, M., Terlouw, E. C., Micol, D., Boudjellal, A., Hocquette, J. F., & Picard, B. (2015). Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the *Longissimus thoracis* muscle of young Blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(30), 6799-6809.

Gagaoua, M., Terlouw, E. C., Mullen, A. M., Franco, D., Warner, R. D., Lorenzo, J. M., Purslow, P. P., Gerrard, D., Hopkins, D. L., Troy, D., & Picard, B. (2021). Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. *Meat science*, 108311.

Gagaoua, M., Terlouw, E. C., Mullen, A. M., Franco, D., Warner, R. D., Lorenzo, J. M., Purslow, P. P., Gerrard, D., Hopkins, D. L., Troy, D., & Picard, B. (2020). Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. *Meat science*, 108311.

Gobert, M., Sayd, T., Gatellier, P., & Sante-Lhoutellier, V. (2014). Application to proteomics to understand and modify meat quality. *Meat science*, 98(3), 539-543.

Gómez, J. F. M., Netto, A. S., Antonelo, D. S., Silva, J., Sene, G. A., Silva, H. B., Dias, N. P., Leme, P. R., & Silva, S. L. (2017). Effects of immunocastration on the performance and meat quality traits of feedlot-finished *Bos indicus* (Nellore) cattle. *Animal Production Science*, 59(1), 183–190. <https://doi.org/10.1071/AN17102>

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 177, 751–766.

Guignot, F., Touraille, C., Ouali, A., Renner, M., & Monin, G. (1994). Relationships between post-mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal. *Meat Science*, 37(3), 315–325. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90049-3)

Guillemin, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Renand, G., & Picard, B. (2011). Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal*, 5(6), 885-894.

Hocquette, J.F., Botreau, R., Legrand, I., Polkinghorne, R., Pethick, D. W., Lherm, M., Picard, B., Doreau, M., Terlouw, E. M. C. (2014). Win–win strategies for high beef quality, consumer satisfaction, and farm efficiency, low environmental impacts, and improved animal welfare. *Animal Production Science*, 54(10), 1537-

1548.

Hornemann, T., Kempa, S., Himmel, M., Hayeß, K., Fürst, D. O., & Wallimann, T. (2003). Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *Journal of molecular biology*, 332(4), 877-887.

Huff-Lonergan, E., Parrish Jr, F. C., & Robson, R. M. (1995). Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine *longissimus* muscle. *Journal of animal science*, 73(4), 1064-1073.

Jacinto-Valderrama, R. A., Sampaio, G. S. L., Lima, M. L. P., Cyrillo, J. N. D. S. G., & Pflanzler, S. B. (2021). Immunocastration on performance and meat quality of *Bos indicus* (Nelore) cattle under different nutritional systems. *Scientia Agricola*, 78(2).

Jeong, J. Y., Hur, S. J., Yang, H. S., Moon, S. H., Hwang, Y. H., Park, G. B., & Joo, S. T. (2009). Discoloration characteristics of 3 major muscles from cattle during cold storage. *Journal of food science*, 74(1), C1-C5.

Joseph, P., Suman, S. P., Rentfrow, G., Li, S., & Beach, C. M. (2012). Proteomics of muscle-specific beef color stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3196-3203.

King, D. A., Shackelford, S. D., Rodriguez, A. B., & Wheeler, T. L. (2011). Effect of time of measurement on the relationship between metmyoglobin reducing activity and oxygen consumption to instrumental measures of beef *longissimus* color stability. *Meat Science*, 87, 26–32.

Koohmaraie, M., Kent, M. P., Shackelford, S. D., Veiseth, E., & Wheeler, T. L. (2002). Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. *Meat science*, 62(3), 345-352.

Kuss, F., López, J., Restle, J., Barcellos, J. O. J., Moletta, J. L., & Paula-Leite, M. C. D. (2010). Qualidade da carne de novilhos terminados em confinamento e abatidos aos 16 ou 26 meses de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(4), 924-931.

Malheiros, J. M., Braga, C. P., Grove, R. A., Ribeiro, F. A., Calkins, C. R., Adamec, J., & Chardulo, L. A. L. (2019). Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach. *Meat science*, 148, 64-71.

Miguel, G. Z., Faria, M. H., Roça, R. O., Santos, C. T., Suman, S. P., Faitarone, A. B. G., Delbem, N. L. C., Girao, L. V. C., Homem, J. M., Barbosa, E. K., Su, L. S., Resende, F. D., Siqueira, G. R., Moreira, A. D., & Savian, T. V. (2014). Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore×Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. *Meat Science*, 96(2), 884–891. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.030>

Moran, L., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., Picard, B., McGee, M., O'riordan, E. G., & Moloney, A. P. (2017). Effect of a grazing period prior to finishing on a high concentrate diet on meat quality from bulls and steers. *Meat science*, 125, 76-83.

Moreira, A. D., Siqueira, G. R., Lage, J. F., Benatti, J. M. B., Moretti, M. H., Miguel, G. Z., De Oliveira, I. M., & De Resende, F. D. (2018). Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. *Animal Production Science*, 58(7), 1307–1315. <https://doi.org/10.1071/AN16580>

Morgan, J. B., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Crouse, J. D., & Savell, J. W. (1993). Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 71(2), 408-414.

Needham, T., Lambrechts, H., & Hoffman, L. C. (2017). Castration of male livestock and the potential of immunocastration to improve animal welfare and production traits: Invited review. *South African Journal of Animal Sciences*, 47(6), 731–742. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i6.1>

Nian, Y., Allen, P., Harrison, S. M., & Kerry, J. P. (2018). Effect of castration and carcass suspension method on the quality and fatty acid profile of beef from male dairy cattle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4339–4350. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8960>

Nogalski, Z., Pogorzelska-Przybyłek, P., Sobczuk-Szul, M., Nogalska, A., Modzelewska-Kapituła, M., & Purwin, C. (2018). Carcass characteristics and meat quality of bulls and steers slaughtered at two different ages. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 279–288. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1383861>

Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 26(6), 711-723.

Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., & Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regard to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat science*, 95(4), 854-870.

Picard, B., Gagaoua, M., Al Jammal, M., & Bonnet, M. (2019). Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: Effect of gender and rearing practices. *Journal of proteomics*, 200, 1-10.

Picard, B., Gagaoua, M., Al-Jammal, M., De Koning, L., Valais, A., & Bonnet, M. (2018). Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. *PeerJ*, 6, e4891.

Pighin, D. G., Brown, W., Ferguson, D. M., Fisher, A. D., & Warner, R. D. (2014). Relationship between changes in core body temperature in lambs and post-slaughter muscle glycogen content and dark-cutting. *Animal Production Science*, 54(4), 459–463. <https://doi.org/10.1071/AN12379>

Ponnampalam, E. N., Hopkins, D. L., Bruce, H., Li, D., Baldi, G., & Bekhit, A. E. D. (2017). Causes and contributing factors to “dark cutting” meat: Current trends and future directions: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 400-430.

Ramanathan, R., & Mancini, R. A. (2018). Role of mitochondria in beef color: A review. *Meat and Muscle Biology*, 2(1).

Reiche, A. M., Oberson, J. L., Silacci, P., Messadène-Chelali, J., Hess, H. D.,

Dohme-Meier, F., ... & Terlouw, E. M. C. (2019). Pre-slaughter stress and horn status influence physiology and meat quality of young bulls. *Meat science*, 158, 107892.

Resende, F. D., Gesualdi Junior, A., Queiroz, A. C., Faria, M. H., & Viana, A. P. (2014). Carcass characteristics of feedlot-finished Zebu and Caracu cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(2), 67–72. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982014000200003>.

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., Silva, M. T (2017) Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. *PLoS ONE*, 12:1–21.

Sadowska, A., Swiderski, F., Rakowska, R., & Nogalski, Z. (2017). The quality of steer and bull meat obtained by crossing Holstein-Friesian cows with Charolais bulls. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(4).

Savell, J. W., Cross, H. R. (1988). The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb. *Designing foods: Animal product options in the marketplace*, 345.

Silva, L. H. P., Assis, D. E. F., Estrada, M. M., Assis, G. J. F., Zamudio, G. D. R., Carneiro, G. B., Valadares Filho, S. C., Paulino, M. F., & Chizzotti, M. L. (2019). Carcass and meat quality traits of Nellore young bulls and steers throughout fattening. *Livestock Science*, 229(May), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.09.012>

Silva, L. H., Rodrigues, R. T., Assis, D. E., Benedeti, P. D., Duarte, M. S., & Chizzotti, M. L. (2019). Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. *Journal of proteomics*, 199, 51-66.

Suman, S. P., Hunt, M. C., Nair, M. N., & Rentfrow, G. (2014). Improving beef color stability: Practical strategies and underlying mechanisms. *Meat science*, 98(3), 490-504.

Tizioto, P. C., Gromboni, C. F., de Araujo Nogueira, A. R., de Souza, M. M., de Alvarenga Mudadu, M., Tholon, P., Rosa, A. N., Tullio, R. R., Medeiros, S. R., Nassu,

R. T., Regitano, L. C. A. (2014). Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. *Meat science*, 96(1), 436-440.

Veiseth-Kent, E., de Almeida, A. M., Picard, B., & Hollung, K. (2018). Proteomics in skeletal muscle research. In *Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology* (pp. 195-217). Springer, Cham.

Waritthitham, A., Lambertz, C., Langholz, H. J., Wicke, M., & Gauly, M. (2010). Assessment of beef production from Brahmanx Thai native and Charolaisx Thai native crossbred bulls slaughtered at different weights. II: Meat quality. *Meat science*, 85(1), 196-200.

Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (1996). Sampling, cooking, and coring effects on Warner-Bratzler shear force values in beef. *Journal of Animal Science*, 74(7), 1553-1562.

Zhang, Q., Lee, H.G., Han, J.A., Kim, E.B., Kang, S.K., Yin, J., Baik, M., Shen, Y., Kim, S. H., Seo, K, S., Choi, Y.J. Differentially expressed proteins during fat accumulation in bovine skeletal muscle. *Meat science*, v. 86, n. 3, p. 814-820, 2010.

Zhu, Y., Gagaoua, M., Mullen, A. M., Kelly, A. L., Sweeney, T., Cafferky, J., Viala, D., Hamill, R. M. (2021). A Proteomic Study for the Discovery of Beef Tenderness Biomarkers and Prediction of Warner–Bratzler Shear Force Measured on Longissimus thoracis Muscles of Young Limousin-Sired Bulls. *Foods*, 10(5), 952.