

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE,
SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA
ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA**

Flabiele Soares da Silva
Zootecnista

2023

**T
E
S
E
/
S
I
L
V
A
F.
S.**

**2
0
2
3**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE,
SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA
ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA**

Discente: Msc. Flabiele Soares da Silva
Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto
Curso: Doutorado em Zootecnia

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

S586q

Silva, Flabiele Soares da

Qualidade da carne de bovinos F1 Angus-Nelore, superprecoces de diferentes classes sexuais: uma abordagem transcriptômica e proteômica / Flabiele Soares da Silva. -- Jaboticabal, 2024
143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Otavio Rodrigues Machado Neto

1. Classe sexual. 2. Expressão gênica. 3. Imunocastração. 4.
Marmoreiro. 5. Proteômica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA

AUTORA: FLABIELE SOARES DA SILVA

ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO

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

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

 Documento assinado digitalmente
OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO
Data: 08/11/2023 11:42:13 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

 Documento assinado digitalmente
MARCOS ROBERTO CHIARATTI
Data: 07/11/2023 11:58:02 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

 Documento assinado digitalmente
LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO
Data: 08/11/2023 11:04:53 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

 Documento assinado digitalmente
WELDER ANGELO BALDASSINI
Data: 08/11/2023 08:24:52 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pós-doutorando GERMÁN DARÍO RAMÍREZ ZAMUDIO (Participação Virtual)
FZEA USP / Pirassununga/SP

 Documento assinado digitalmente
GERMAN DARIO RAMIREZ ZAMUDIO
Data: 07/11/2023 12:32:56 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 07 de novembro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FLABIELE SOARES DA SILVA – Nascida na cidade de Cuiabá MT, no dia 16 de novembro de 1993. Filha de Fátima Maria Caldas da Silva e Leopoldo Soares da Silva Filho (*in memoriam*). Em novembro de 2012 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT no Campus de Cuiabá e obteve o título de Bacharel em julho de 2017. Em agosto de 2017 iniciou o curso de mestrado no programa de pós-graduação em Zootecnia da UFMT – Sinop e obteve título de Mestre em Zootecnia em fevereiro de 2019. Em março de 2019 iniciou o curso 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. Otavio Rodrigues Machado Neto.

*“Se uma mesa bagunçada é sinal de uma mente desordenada,
uma mesa vazia é sinal de quê?”*

Albert Einstein

“Ao meu querido pai (*in memoriam*), que sempre me apoiou em todos os momentos e decisões na minha vida e que me ensinou a ter humildade, respeito e servir as pessoas com amor”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Hozane Alves que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e que me incentivou a ser melhor a cada dia. Te admiro e amo muito.

Aos meus pais, Fátima Maria Caldas da Silva e Leopoldo Soares da Silva Filho (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e por todo o apoio que depositaram em mim em toda essa trajetória. Vocês são a minha inspiração.

Aos meus irmãos e sobrinhas, Flábia, Sebastião, Júnior, Fabiana, Andrielly, Ester e Andressa. Vocês são a minha força.

À toda minha família, por todo apoio e pelas orações que fizeram por mim.

Ao Professor Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, pela imensa oportunidade de crescimento, orientação, convivência, compreensão, paciência e discernimento. Muito obrigada por tudo, as suas decisões foram muito importantes para o meu crescimento.

Ao Professor Dr. Welder Baldassini, por todo apoio e disposição que sempre teve em me ajudar e contribuir com os nossos trabalhos. Te considero um grande coorientador.

Aos amigos de Botucatu que me ajudaram nessa jornada. São eles: Lais Tomaz, Bismarck Moreira, Mariane Genari, Richard Vaquero, Luiz Antônio Fogaça, Jean Galvão, Matheus Rossi, Lucas Rodrigues, Mateus Parra, Isabella Romão, Maria Carolina, Rafaela Rodrigues, Iasmin Calaça, Camila Pereira, Camila Prado, Anderson Kloster, Pedro Garcia, Gianni Aguiar, Rayssa Scapol, Irene Alexandre e Juliana Akamine.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela oportunidade.

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

Ao pesquisador Dr. Germán Darío Ramírez Zamudio pelas contribuições na condução do experimento, nos exames de qualificação e defesa e pela grande amizade.

Ao professor Dr. Luis Arthur Loyola Chardulo pelas contribuições durante o experimento, análises e ensinamentos no exame de qualificação e defesa.

Ao professor Dr. Marcos Roberto Chiaratti pela orientação durante toda a execução das análises de sequenciamento e pelas contribuições na qualificação e defesa.

Ao professor Dr. Guilherme Luis Pereira pela orientação e apoio no entendimento das análises estatísticas.

A Unesp de Botucatu, Confinamento experimental pela oportunidade de usufruir suas dependências e infraestrutura bem como todos os seus funcionários.

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

Ao Laboratório de Ciência e Qualidade da Carne “MeatLab” pela parceria nas análises laboratoriais.

Ao Laboratório de Ciência e Qualidade da Carne e Dra. Mirele Daiana Poleti, pela parceria nas análises laboratoriais.

A Trouw Nutrition pelo financiamento da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – por ter concedido a bolsa de estudos.

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 obrigada, de coração!

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT.	vi
1 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1.1 Introdução	1
1.2 Classe sexual e qualidade de carne	2
1.3 Síntese de ácidos graxos	5
1.4 Transcriptômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne	6
1.5 Proteômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne	8
2 REFERÊNCIAS.....	11
3 CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E TRANSCRIPTÔMA DO MÚSCULO DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS	25
4 INTRODUÇÃO	28
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Animais e tratamentos	29
5.2 Abate e amostragem	31
5.3 Composição química da carne	32
5.4 Perfil de ácidos graxos	32
5.5 Extração e sequenciamento de RNA.....	33
5.6 Identificação de genes exclusivamente expressos	34
5.7 Análise de co-expressão e fatores de transcrição (<i>inteiro vs castrado</i>)	34
5.8 Análise de enriquecimento funcional	35
5.9 Análises estatísticas	35
6 RESULTADOS.....	36
6.1 Características de carcaça	36
6.2 Composição química da carne	36
6.3 Perfil de ácidos graxos	37

6.4 Genes exclusivamente expressos	39
6.5 Análise de co-expressão e fatores de transcrição (<i>inteiro vs castrado</i>)	43
7 DISCUSSÃO	46
7.1 Características de carcaça e qualidade de carne	46
7.2 Transcriptoma do tecido muscular	48
7.3 Genes exclusivamente expressos	50
7.4 Via de resistência à insulina	51
7.5 Via de sinalização PPAR	52
7.6 Via de sinalização AMPK.....	53
7.7 Via de sinalização cAMP e FoxO.....	54
8 CONCLUSÕES	55
9 REFERÊNCIAS.....	57
10 CAPÍTULO 3 – QUALIDADE DA CARNE E PROTEOMA DO MÚSCULO DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS	71
11 INTRODUÇÃO	74
12 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
12.1 Animais e tratamentos	76
12.2 Abate, amostragem e características de carcaça.....	78
12.3 Composição química.....	79
12.4 Análises físicas e maturação.....	79
12.5 Proteoma do tecido muscular	80
12.6 Análises estatísticas.....	84
13 RESULTADOS.....	85
13.1 Características de carcaça.....	85
13.2 Composição química da carne	85
13.3 Características físicas da carne	86
13.4 Proteoma do tecido muscular	90
14 DISCUSSÃO	113

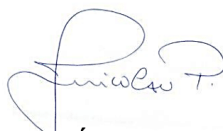
14.1 Características de carcaça.....	113
14.2 Proteoma do tecido muscular e características de qualidade de carne	114
15 CONCLUSÕES	119
16 REFERÊNCIAS.....	120

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Qualidade de carne e perfil proteômico do músculo L. dorsi em bovinos F1 Angus-Nelore de diferentes classes sexuais" **Protocolo CEUA 0208/2019**, a ser conduzido por FLABIELE SOARES DA SILVA, responsável/orientador OTÁVIO RODRIGUES MACHADO NETO, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	03/02/2020 a 01/02/2021
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS / NAO SE APLICA
Raça	F1 Angus-Nelore
Nº de animais machos	12
Nº de animais fêmeas	6
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	140
Peso médio de animais fêmeas	120
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 4 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Rebanho da FMVZ.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 11/03/2020



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

QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA ABORDAGEM TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA

RESUMO - O estudo investigou o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, qualidade de carne, transcriptoma e proteoma do músculo *Longissimus thoracis* (LT) de bovinos F1 Angus-Nelore. Dezoito bezerros (seis fêmeas e doze machos) foram desmamados aos 120 dias de idade e condicionados em um sistema de confinamento. Os tratamentos consistiram em três classes sexuais: seis machos não castrados (inteiro), seis machos selecionados aleatoriamente para imunocastração (castrado) e seis fêmeas imunocastradas (novilha). O protocolo de imunocastração consistiu em três doses da vacina anti-GnRH aplicadas aos 250, 280 e 370 dias de idade. Após 230 dias de experimento (480 dias de idade em média) os animais foram abatidos em frigorífico comercial para as mensurações de características de carcaça e coleta de amostras do *Longissimus thoracis* (LT) para a análise de biologia molecular. Após 48 horas de resfriamento das carcaças e durante a desossa, amostras do LT entre a 12^a e 13^a vertebra torácicas foram coletadas para as análises químicas e físicas da carne. Observou-se maior peso de carcaça quente e área de olho de lombo para machos inteiros ($p<0,05$) em comparação aos machos castrados e novilhas. A deposição de gordura intramuscular (GIM) foi maior em machos castrados e novilhas em comparação aos inteiros ($p<0,05$). Novilhas apresentaram maior grau de maciez da carne ($p<0,05$) em comparação aos machos castrados e inteiros. O transcriptoma do tecido muscular realizado apenas em machos castrados e inteiros, revelou a expressão de genes exclusivos associados metabolismo de lipídios (*FABP7*, *ACOT12*, *UGT8*, *ACER2*, *PLAG1*, *ALOX15*) e vias metabólicas como as de sinalização de PPAR, AMPK, cAMP e FoxO (principalmente *FABP4*, *PLIN1*, *FASN*, *PFKFB3*) em machos castrados, que afetaram positivamente a deposição de gordura intramuscular, bem como o perfil de ácidos graxos na carne em comparação aos machos inteiros. O proteoma do tecido muscular realizado em machos inteiros, castrados e novilhas revelou maior abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético (*ALB*, *PGM1*, *GAPDH*, *PGAM2*, *ENO3*, *LDHA*) em machos castrados e novilhas em comparação aos machos inteiros, que estão associadas a maior potencial glicolítico e sugere maior deposição de GIM nesses animais. Adicionalmente, a maior abundância de proteínas ligadas a estrutura e contração muscular (*ACTA1*, *ACTB*, *ANXA2*), metabolismo energético e oxidativo (*TPI1*, *CKM*, *PRDX6*, *MDH2*) em novilhas, que indicam maior associação com a maciez da carne, comparado aos machos do estudo. Conclui-se que novilhas apresentam carne com melhores características de qualidade de carne como maior deposição de gordura intramuscular e maciez da carne, onde tais respostas foram justificadas por meio do proteoma do tecido muscular, e que a imunocastração em machos pode também ser uma alternativa estratégica com foco em mercado de carnes com valor agregado.

Palavras-chave: classe sexual, enriquecimento, expressão gênica, imunocastração, *longissimus thoracis*, marmoreio, transcriptômica, proteômica

MEAT QUALITY IN F1 ANGUS-NELORE CATTLES, SUPER EARLY OF DIFFERENT GENDER STATUS: A TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC APPROACH

ABSTRACT - The study investigated the effect of sex class on carcass traits, meat quality, transcriptome and proteome of the Longissimus thoracis (LT) muscle of F1 Angus-Nellore cattle. Eighteen calves (six females and twelve males) were weaned at 120 days of age and conditioned in a feedlot system. The treatments consisted of three sex classes: six uncastrated males (intact), six males randomly selected for immunocastration (castrated) and six immunocastrated females (heifer). The immunocastration protocol consisted of three doses of the anti-GnRH vaccine applied at 250, 280 and 370 days of age. After 230 days of experiment (480 days of age on average) the animals were slaughtered in a commercial slaughterhouse for measurements of carcass traits and collection of Longissimus thoracis (LT) samples for molecular biology analysis. After 48 hours of carcass cooling and during deboning, samples of the LT between the 12th and 13th thoracic vertebrae were collected for chemical and physical analyses of the meat. Higher hot carcass weight and loin eye area were observed for entire males ($p < 0.05$) compared to barrows and heifers. Intramuscular fat deposition (IMF) was higher in barrows and heifers compared to entire males ($p < 0.05$). Heifers presented a higher degree of meat tenderness ($p < 0.05$) compared to barrows and entire males. The muscle tissue transcriptome performed only in castrated and intact males revealed the expression of exclusive genes associated with lipid metabolism (FABP7, ACOT12, UGT8, ACER2, PLAG1, ALOX15) and metabolic pathways such as PPAR, AMPK, cAMP and FoxO signaling (mainly FABP4, PLIN1, FASN, PFKFB3) in castrated males, which positively affected intramuscular fat deposition, as well as the fatty acid profile in meat compared to intact males. The muscle tissue proteome performed in intact males, castrated males and heifers revealed a higher abundance of proteins related to energy metabolism (ALB, PGM1, GAPDH, PGAM2, ENO3, LDHA) in castrated males and heifers compared to intact males, which are associated with greater glycolytic potential and suggests greater GIM deposition in these animals. Additionally, the greater abundance of proteins linked to muscle structure and contraction (ACTA1, ACTB, ANXA2), energy and oxidative metabolism (TPI1, CKM, PRDX6, MDH2) in heifers, which indicate a greater association with meat tenderness, compared to males in the study. It is concluded that heifers present meat with better meat quality characteristics such as greater intramuscular fat deposition and meat tenderness, where such responses were justified by the proteome of muscle tissue, and that immunocastration in males can also be a strategic alternative with a focus on the value-added meat market.

Keywords: gender status, enrichment, gene expression, immunocastration, longissimus thoracis, marbling

1 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

A maciez da carne e o teor de gordura intramuscular são duas características importantes relacionadas a qualidade da carne (Silva et al. 2019). Enquanto que a carne macia é uma exigência comum e predominante, carnes com níveis mais elevados de gordura intramuscular buscam suprir uma demanda mercadológica (Mullins et al., 2016). A gordura intramuscular e o seu perfil de ácidos graxos tem relação com palatabilidade, suculência e com o sabor da carne, características que ajudam a promover maior valorização aos cortes comerciais da carne bovina (Park, Kang, et al., 2018a). Assim, a utilização de fêmeas ou a castração de machos se torna uma boa alternativa, pois diferem na composição corporal, características de carcaça e o teor de gordura intramuscular (Blanco et al., 2020; Bures & Barton, 2012; Cafferky et al., 2019).

Animais não castrados tem maior ganho de peso devido aos efeitos da testosterona, porém esse benefício pode limitar a um menor grau de acabamento da carcaça (Gómez et al., 2017; Santiago et al., 2023). Além disso, animais não castrados apresentam maior incidência de carnes com coloração indesejável e menor maciez (Andreo et al., 2016b; Gómez et al., 2017).

Além da classe sexual, no que diz respeito à qualidade da carne bovina, é dada especial importância à raça e ao sistema de alimentação dos animais (Venkata Reddy et al., 2015b). A raça Nelore (*Bos taurus indicus*) é a base do rebanho bovino brasileiro (Carvalho et al., 2014), contudo, fisiologicamente são mais tardios no acabamento de carcaça que animais de origem Britânica (*Bos taurus taurus*) (Pereira et al., 2017). Por essa razão, a utilização de cruzamentos entre animais de origem zebuína e taurina vem sendo adotada, especialmente, com uso de touros Aberdeen Angus.

A deposição de gordura intramuscular é um processo determinado pelo equilíbrio entre a captação, síntese e degradação de ácidos graxos no músculo esquelético (Bong et al., 2012). O consumo de energia líquida excedente é crucial para o acúmulo de gordura (Nguyen et al., 2021a; Park, Beak, et al., 2018). Vários estudos concluíram que bovinos de corte alimentados com dietas com alto teor de concentrado têm teores de gordura intramuscular mais elevados do que aqueles alimentados com dietas com baixo teor de concentrado (Hwang & Joo, 2017; Nguyen et al., 2021a; Nogalski et al., 2023).

Os estudos de biologia molecular podem auxiliar na manipulação de características de interesse econômico (Lim et al., 2015). Esses estudos permitiram a identificação de biomarcadores, que podem explicar diferentes características da carne, como maciez, cor, marmoreio e conteúdo de tecido adiposo entre outras modificações que ocorrem no músculo *post mortem* (Du et al., 2022; Gagaoua, Hughes, et al., 2020; Pas et al., 2017; Picard et al., 2014).

Boa parte dos estudos conduzidos utilizaram animais Nelore ou mesmo F1 Angus-Nelore, mas com idade superior a 24 meses (Andreo et al., 2016b; Gómez et al., 2017; Jacinto-Valderrama et al., 2020; Miguel et al., 2014), e terminados em confinamento por no máximo de 90 dias. Ainda, poucos estudos avaliaram simultaneamente machos inteiros, castrados e novilhas e em nenhum desses estudos foram utilizados animais com idade inferior a 18 meses e submetidos a terminação em confinamento por mais de 180 dias. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, qualidade de carne, transcriptômica e proteômica do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore superprecoces e terminados em confinamento por 230 dias.

1.2 Classe sexual e qualidade de carne

A exigência dos consumidores em relação aos indicadores de qualidade dos produtos e sua procedência é crescente. A maciez da carne e o teor de gordura intramuscular são duas características importantes relacionadas a qualidade da carne (Silva et al., 2019a) que contribuem para a valorização do produto final (Mullins et al., 2016). Vários fatores afetam as características de qualidade de carne, como genética, nutrição, sistema de criação e a classe sexual. O sexo dos animais influencia o ganho de peso, composição corporal, características de carcaça e a qualidade da carne (Blanco et al., 2020; Bures & Barton, 2012; Cafferky et al., 2019). No estudo de Blanco et al. (2020), avaliando fêmeas e machos castrados, animais não castrados atingiram o peso de 475 kg com 55 dias de antecedência.

Machos castrados e fêmeas tem níveis sanguíneos de testosterona expressivamente baixos em comparação a machos não castrados (Baatar & Hwang, 2020). A testosterona é um esteroide anabolizante derivado do colesterol, mais de 95% é sintetizado nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático das células de Leydig dos testículos, e o restante é produzido nas glândulas

suprarrenais (McCullough & Khan, 2022). A testosterona promove a espermatogênese nas células de Sertoli e pode ser transportada na circulação periférica pelas proteínas séricas, globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) (~70%), e em quantidades menores, pela albumina (~30%) ou permanecendo não ligadas (~2%) (Dirikolu & Lehner, 2023). A proliferação de células satélites e a maturação das células musculares é estimulada pela testosterona (Sinha-Hikim, Roth, Lee, & Bhasin, 2003), bem como uma supressão na diferenciação dos pré-adipócitos (Ren et al., 2017a).

Os métodos de castração mais tradicionais são a cirúrgica e a mecânica (Ahmed et al., 2022). A castração cirúrgica pode ser realizada através da remoção completa dos testículos, enquanto no método mecânico, o cordão espermático é esmagado para bloquear o suprimento de sangue aos testículos, o que causa necrose dos testículos (Ibrahim et al., 2016). No entanto, estes métodos potencialmente causam dor e infecção e devido a crescente preocupação com o bem-estar animal há uma pressão progressiva para acabar com a castração tradicional (Brunius et al., 2011; Garside et al., 2014). Variados estudos sugerem que a imunocastração pode ser utilizada para melhorar características de carcaça e cor da carne em animais Nelore, Nelore ×Angus terminados em confinamento ou a pasto (Amatayakul-Chantler et al., 2013; Andreo et al., 2016b; Miguel et al., 2014).

Os principais objetivos da castração eram reduzir comportamentos negativos e agressivos, controlar o estado reprodutivo das fêmeas, que comumente dividiam espaço com os machos e facilitar a engorda dos animais (Warner et al., 2022). Os touros geralmente são mais pesados e tem maior proporção de tecido magro que os novilhos devido ao efeito anabólico da testosterona no tecido muscular esquelético, enquanto que os novilhos apresentam maior gordura de cobertura e na carcaça (Santiago et al., 2023; Silva et al., 2019). O melhor desempenho produtivo em animais inteiros em relação aos castrados pode ser limitado ao menor grau de acabamento de gordura (Silva et al., 2019) e a predisposição a sofrer o encurtamento pelo frio (Chardulo et al., 2013). Portanto, o metabolismo lipídico no tecido adiposo pode ser alterado pela condição sexual dos bovinos (Nguyen et al., 2021b).

A redução do número de adipócitos diminui os locais disponíveis para deposição de gordura e a maior hipertrofia de células musculares implicam em

menor teor de gordura e maior ganho de peso nos machos não castrados em relação a machos castrados e fêmeas. O aumento no teor de gordura intramuscular é bem consolidado na literatura (Blanco et al., 2020b; Bures & Barton, 2012; Cafferky et al., 2019; Moran et al., 2017), independentemente do método de castração (Marti et al., 2017). A gordura influencia positivamente as características de qualidade sensorial da carne, e há uma relação positiva entre gordura intramuscular e palatabilidade geral (Frank et al., 2016).

O peso da carcaça e a gordura de cobertura são importantes porque interferem na velocidade de resfriamento da carcaça. Carcaças mais pesadas possuem maiores desafios no resfriamento e na queda de pH (Warner et al., 2022). Carcaças menores resfriam mais rapidamente devido a maior área superficial específica, e esse resfriamento acelerado pode induzir ao encurtamento pelo frio e em consequência tornar-se menos macias (Savell et al., 2005). Além disso, a gordura de cobertura fornece uma camada de proteção e diminui a velocidade da queda da temperatura (Chardulo et al., 2013). Ainda, à medida que a gordura aumenta, o teor de umidade diminui devido a um efeito de substituição (King et al., 2006), consequentemente, a perda por gotejamento e a perda de água durante o cozimento são menores em carnes com maior teor de gordura. A redução da perda de água durante o cozimento é uma vantagem, pois há menor perda de peso, melhor rendimento e menor perda de nutrientes (Frank et al., 2016).

A castração também é empregada para diminuir a agressividade dos animais. O estresse pré-abate pode levar ao esgotamento do glicogênio muscular, e interferir na queda do pH nos músculos post-mortem (Miguel et al., 2014). Associado à queda do pH no músculo “normal” post-mortem de 7,0 para 5,5 está o encolhimento da estrutura do miofilamento, com a consequente perda de água da carne. Isto pode ser explicado por mudanças na estrutura como resultado de mudanças na carga química das proteínas. Durante o rigor, à medida que o pH do músculo se aproxima de 5,4 ou menos, a carga líquida das proteínas nas miofibrilas diminui e os filamentos podem aproximar-se uns dos outros, causando encolhimento transversal na miofibrila. Assim, sempre há alguma perda de água quando o pH do músculo cai de 7 para 5,5. O ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares está entre pH 5,0 e 5,2. À medida que o pH final se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas musculares, a capacidade de reter água atinge o

mínimo (Warner, 2017). A carne com um pH final alto é normalmente escura e a cor é o primeiro critério para a apreciação da carne pelo consumidor no momento da compra (Clinquart et al., 2022). A carne de animais castrados e fêmeas pode ter melhores características de comercialização devido a cor mais avermelhada enquanto os não castrados têm carne com maior escurecimento (Miguel et al., 2014). Uma cor vermelho-cereja brilhante é normalmente usada como um indicador da salubridade da carne fresca e desvios desse padrão podem resultar em menor aceitação do consumidor (Baik et al., 2023).

1.3 Síntese de ácidos graxos

A lipogênese é um processo fisiológico de síntese de ácidos graxos endógenos e regulado por diversos fatores (Ladeira et al., 2016). Para que ocorra a síntese de gordura, após a ingestão ou síntese de novo dos ácidos graxos os triglicerídeos devem ser incorporados ao tecido adiposo. Os ácidos graxos são classificados de acordo com o número de ligações duplas entre carbonos. Os ácidos que não possuem essa dupla ligação são chamados de saturados (SFA), os que possuem alguma dupla ligação são insaturados, divididos em uma dupla ligação, os monoinsaturados (MUFA), ou poli-insaturados (PUFA) com duas ou mais duplas ligações (Willian, 2013).

Ao chegar no rúmen, os lipídios dietéticos são rapidamente hidrolisados, liberando ácidos graxos livres, e as ligações duplas são isomerizadas e bio-hidrogenadas, convertendo insaturados principalmente em monoinsaturados e saturados (Vahmani et al., 2020a). Nesse sentido, a carne bovina tem sido associada a doenças cardiovasculares em humanos devido a essa proporção de gordura saturada. Por outro lado, MUFA e PUFA estão mais associados a efeitos benéficos à saúde (Luciano, 2009). Contudo, essas recomendações ignoram os fatos que os ácidos graxos saturados afetam a fisiologia humana de maneira diferente, e que esses efeitos são influenciados pela dieta total (Astrup et al., 2019; Vahmani et al., 2020). Ladeira et al., (2018) comentaram que a alteração do perfil de ácidos graxos na carne bovina na tentativa de aumentar a proporção de ácidos graxos insaturados pode ser uma forma importante de produzir uma carne mais saudável para o consumidor.

A composição de ácidos graxos entre classes sexuais foi comparada em alguns estudos (Andreo et al., 2016b; Bures & Barton, 2012; Nian et al., 2018; B.

M. Santiago et al., 2023a). Menores proporções de MUFA e maiores proporções de PUFA foram registradas em lipídios musculares em machos inteiros comparados a novilhos imunocastrados (Andreo et al., 2016b), e novilhas (Karolyi et al., 2009). Animais com menor teor de gordura intramuscular apresentam maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados, o que pode ser explicado por uma maior proporção de fosfolipídios de membrana, ricos em PUFA, e uma menor proporção de triglicerídeos, lipídeos de reserva e ricos em ácidos graxos monoinsaturados (Wood et al., 2008).

Existe uma correlação positiva entre o teor de gordura e o diâmetro do adipócito intramuscular (Yamada et al., 2020). A quantidade de fosfolipídio permanece razoavelmente constante, ou tem um discreto aumento, enquanto que os triglicerídeos predominam na composição geral dos ácidos graxos (Warren et al., 2008). Os ácidos graxos poliinsaturados são preferencialmente depositados em fosfolipídios, enquanto saturados e monoinsaturados estão presentes especialmente como triacilgliceróis (Nian et al., 2018). Logo, existe uma correlação entre o teor de gordura intramuscular e a concentração de ácidos graxos monoinsaturados e saturados (Bressan et al., 2011). Portanto, a carne com mais gordura intramuscular tem proporcionalmente mais AGs saturado e monoinsaturado.

1.4 Transcriptômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne

Os métodos de pesquisa tradicionais resultaram em notáveis avanços de conhecimento ao longo das últimas décadas. No entanto, ferramentas de biologia, como transcriptômica e proteômica associados a estudos de bioinformática, podem acelerar e aumentar ainda mais o avanço científico e a eficiência produtiva dos sistemas pecuários (Suravajhala et al., 2016). Essas abordagens moleculares estão sendo utilizadas com o intuito de comparar grupos para uma determinada característica e possibilitar o entendimento da ocorrência do fenótipo (Gagaoua, Warner, et al., 2021; Picard et al., 2017).

O transcriptoma, compreende todo o repertório de transcrições de uma espécie e representa a conexão da informação codificada no DNA ao fenótipo (Malone & Oliver, 2011). A transcriptômica estuda a dinâmica do RNA mensageiro (mRNA) em uma amostra e permite compreender as mudanças moleculares nos níveis de ativação/supressão do gene que controla a síntese de proteínas. A

exploração do transcriptoma pode produzir insights sobre os genes e vias envolvidas na regulação molecular e que, portanto, afetam a função e o fenótipo do animal (L. Liu et al., 2019; Suravajhala et al., 2016). Assim, uma melhor compreensão da regulação dos genes pode fornecer informações sobre o funcionamento biológico e a detecção de genes que são importantes em características zootécnicas ou até mesmo em doenças.

O método predominante de avaliação do transcriptoma é através do RNA-Seq, que envolve o sequenciamento completo de transcritos do DNA da amostra (Mortazavi et al., 2008). Com o RNA-Seq, é possível identificar e quantificar: isoformas, expressão específica de exon, expressão específica de alelo e expressão específica de haplótipo (Jiang et al., 2015; Suravajhala et al., 2016). O enriquecimento funcional é uma avaliação realizada para identificar se um conjunto de genes pré-definido, por exemplo, genes expressos diferencialmente, estão sub ou super-representados no processo biológico de interesse (Gu & Hübschmann, 2022). Essa análise requer informações biológicas anteriores, fornecidas pelos estudos de transcriptoma.

Estudos de transcriptômica tem sido conduzidos para avaliar uma série de potenciais marcadores de composição de ácidos graxos e deposição de gordura em várias espécies incluindo estearoil-CoA dessaturase (*SCD*) (Liang et al., 2020), lipase hormônio-sensível (*HSL*) (Fang et al., 2017a), receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*PPARG*) (Albuquerque et al., 2020), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PCK1*) (Xing et al., 2019), proteína de ligação a ácidos graxos tipo 4 (*FABP4*) (Guo et al., 2018), lipoproteína lipase (*LPL*) (L. Liu et al., 2019).

Estudos desenvolvidos por (Bong et al., 2012b) mostraram que machos castrados tinham níveis mais elevados de mRNA no *Longissimus* de lipoproteína lipase e *CD36*, envolvidos na captação de lipídios, e de acetil-CoA carboxilase (*ACC*) e ácido graxo sintase ligados a lipogênese, e níveis mais baixos de genes envolvidos na lipólise (triglicerídeo lipase adiposo, monoglicerídeo lipase), embora a lipase hormônio sensível fosse menor nos machos não castrados. Ainda, alguns genes envolvidos na absorção de ácidos graxos, lipogênese e esterificação de ácidos graxos tem correlação positiva com o conteúdo de gordura intramuscular, enquanto genes ligados a lipólise tem correlação negativa (Jeong et al., 2012). Teixeira et al. (2017) avaliaram as raças Angus e Nelore sobre a expressão de

genes relacionados ao metabolismo lipídico observaram maiores níveis de expressão do gene *SREBF1* (Fator de transcrição de ligação do elemento regulador de esterol-1) e *PPAR γ* em animais Angus, o que resultou em maior teor de gordura intramuscular comparado aos animais Nelore. O gene *SREBF1* tem correlação positiva com a expressão dos genes *ACACA* (Acetil-CoA carboxilase α) e *FASN* (Ácido graxo sintase).

1.5 Proteômica como ferramenta na avaliação da qualidade da carne

O proteoma refere-se a todo o complemento de proteínas traduzidas por um genoma, célula, tecido ou organismo em um determinado momento. A proteômica é o estudo em larga escala da estrutura e função dessas proteínas e como elas interagem entre si e descreve o conjunto de proteínas em um organismo (Berry et al., 2011; Haoudi & Bensmail, 2006). Enquanto os genes são compostos por uma sequência linear de nucleotídeos relativamente invariável, as proteínas resultantes de tais genes são muito mais variadas em estrutura e, consequentemente, função (Berry et al., 2011).

As técnicas proteômicas utilizadas envolvem abordagens baseadas em gel e sem gel, juntamente com espectrometria de massa (MS), métodos baseados em array e análises estatísticas (Bazile et al., 2019; Gagaoua, Bonnet, et al., 2020; Lana & Zolla, 2016; Picard et al., 2019). O mapeamento das redes de interação proteína-proteína para o fenótipo e as vias metabólicas de interesse é um método de abordagem oportuno para a compreensão de vários processos biológicos (Suravajhala et al., 2016). Os avanços na proteômica da carne permitiram a descoberta de proteínas e vias moleculares associadas a importantes características de carne bovina como cor, marmoreio e maciez (Carvalho et al., 2014; Gagaoua, Terlouw, et al., 2021; Huang et al., 2020).

As decisões de compra são impulsionadas inicialmente pela cor da carne, já que os consumidores consideram a cor um importante indicador de segurança alimentar (Hughes et al., 2020; Matarneh et al., 2021). Recentemente um estudo conduzido a partir do material de 5 músculos em 13 estudos independentes baseados em proteômica, apontou que uma série de proteínas estão associadas a cor da carne bovina. No total, 79 proteínas que compõem as vias biológicas foram significativamente correlacionadas com características de cor, e incluem: 1) acompanhantes e proteínas de choque térmico; 2) processos catalíticos,

metabólicos e metabolismo de ATP; 3) estresse oxidativo e homeostase redox celular; 4) proteínas contráteis e associadas; 5) proteólise e proteínas associadas; 6) proteínas de ligação, cofator e transporte, incluindo sinalização ou apoptose (Gagaoua, Hughes, et al., 2020). Das 27 proteínas mais relatadas, 8 pertencem à via catalítica, metabólica e metabolismo do ATP; 7 eram acompanhantes e proteínas de choque térmico; 6 eram proteínas contráteis e associadas; 4 pertencem à via do estresse oxidativo e da homeostase redox celular e uma proteína para cada uma das outras duas vias. As proteínas β -enolase (*ENO3*) Peroxiredoxina 6 (*PRDX6*) *HSP27* (*HSPB1*); e Fosfoglucomutase 1 (*PGM1*), a Superóxido Dismutase (*SOD1*) e a subunidade catalítica Calpain-1 ou μ -calpaína (*CAPN1*) compunham o topo da lista, e foram correlacionadas a cor em pelo menos 5 estudos.

A castração pode regular positivamente a abundância muscular de importantes enzimas glicolíticas (*ALDOA*, *GAPDH*, *CKM* e *TPI*) e também regula negativamente a abundância de proteínas associadas a processos catabólicos (*ATP5B*, *PGM1*) choque térmico (*HSP60*, *HSPA8*) e estresse oxidativo (*GSTP1*) (B. Santiago et al., 2023; Silva et al., 2019b). Esses resultados indicam um aumento no metabolismo da glicose e uma redução da atividade oxidativa no músculo esquelético de novilhos em relação a touros. A glicose é uma importante fonte de carbono para a síntese de novo de ácidos graxos da gordura intramuscular (Smith, 1984), e também é uma via usada para produzir glicerol-3P necessário para a síntese de triglicerídeos (Nye et al., 2008). Esse aumento da glicólise associado a oxidação reduzida sugere uma maior síntese de glicerol-3P e ácidos graxos a partir da glicose, apoiando o nível mais elevado de gordura intramuscular em novilhos.

Em relação a maciez, Carvalho et al., (2014) ao comparar grupos extremos para força de cisalhamento com 7 dias de maturação da carne, identificaram proteínas de choque térmico (*HSP27* e *HSP70-1*) e proteínas estruturais (*ACTA1*, *MLC1/MLC3*, *MLC2*, *TPM1*) como potenciais biomarcadores para maciez de carne em touros nelore. As proteínas de choque térmico (HSPs) são relatadas como biomarcadores de maciez da carne em estudos proteômicos (Ouali et al., 2013; Picard & Gagaoua, 2017). As HSPs são sintetizadas em resposta ao estresse celular, atuando como protetoras, acompanhantes e restauradoras da homeostase celular (Warner et al., 2022). O papel inicial das HSPs é ativar um

processo antiapoptótico nas células musculares, e há indícios que *HSP27* pode interagir direta ou indiretamente com caspase-3 e Calpain-1 para diminuir sua atividade e diminuir a proteólise de proteínas miofibrilares (Ding et al., 2018).

Algumas outras proteínas já associadas a maciez são as enzimas triosefosfato isomerase (*TPI1*), creatina quinase tipo m (CKM), ENO3, malato desidrogenase 1 (*MDH1*), guanidinoacetato n -metiltransferase (GAMT), piruvato quinase (*PKM*), fosfoglucomutase-1 (*PGM1*) e albumina (ALB) (Baldassini et al., 2015; Malheiros et al., 2021; Picard et al., 2014; Rosa et al., 2018; B. Santiago et al., 2023).

2 REFERÊNCIAS

- Ahmed, S., Jiang, X., Liu, G., Sadiq, A., Farooq, U., Wassie, T., Saleem, A. H., & Zubair, M. (2022). New trends in immunocastration and its potential to improve animal welfare: a mini review. *Tropical Animal Health and Production* 2022 54:6, 54(6), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11250-022-03348-8>
- Albuquerque, A., Óvilo, C., Núñez, Y., Benítez, R., López-García, A., García, F., Félix, M. D. R., Laranjo, M., Charneca, R., & Martins, J. M. (2020). Comparative Transcriptomic Analysis of Subcutaneous Adipose Tissue from Local Pig Breeds. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 422, 11(4), 422. <https://doi.org/10.3390/GENES11040422>
- Amatayakul-Chantler, S., Hoe, F., Jackson, J. A., Roca, R. O., Stegner, J. E., King, V., Howard, R., Lopez, E., & Walker, J. (2013). Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine bopriva or surgical castration of bos indicus bulls raised on pasture in brazil. *Meat Science*, 95(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.008>
- Andreo, N., Bridi, A. M., Soares, A. L., Prohmann, P. E. F., Peres, L. M., Tarsitano, M. A., de Lima Giangareli, B., & 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>
- Astrup, A., Bertram, H. C. S., Bonjour, J. P., De Groot, L. C. P., De Oliveira Otto, M. C., Feeney, E. L., Garg, M. L., Givens, I., Kok, F. J., Krauss, R. M., Lamarche, B., Lecerf, J. M., Legrand, P., McKinley, M., Micha, R., Michalski, M. C., Mozaffarian, D., & Soedamah-Muthu, S. S. (2019). WHO draft guidelines on dietary saturated and trans fatty acids: Time for a new approach? In *The BMJ* (Vol. 366). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.l4137>
- Baatar, D., & Hwang, S. G. (2020). Effect of testosterone on the differentiation control of stromal vascular cells isolated from longissimus muscle of Hanwoo beef cattle. *Meat Science*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107916>

- Baik, M., Lee, J., Kim, S. Y., & Namal Ranaweera, K. K. T. (2023). — Invited Review — Factors affecting beef quality and nutrigenomics of intramuscular adipose tissue deposition. *Animal Bioscience*, 36(2), 350–363. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0380>
- Baldassini, W. A., Braga, C. P., Chardulo, L. A. L., Silva, J. A. I. V., Malheiros, J. M., De Albuquerque, L. G., Fernandes, T. T., & Padilha, P. D. M. (2015). Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry*, 169, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.131>
- Bazile, J., Picard, B., Chambon, C., Valais, A., & Bonnet, M. (2019). Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses. *Meat Science*, 156, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.018>
- Berry, D. P., Meade, K. G., Mullen, M. P., Butler, S., Diskin, M. G., Morris, D., & Creevey, C. J. (2011). The integration of ‘omic’ disciplines and systems biology in cattle breeding. *Animal*, 5(4), 493–505. <https://doi.org/10.1017/S1751731110002120>
- Blanco, M., Ripoll, G., Delavaud, C., & Casasús, I. (2020a). Performance, carcass and meat quality of young bulls, steers and heifers slaughtered at a common body weight. *Livestock Science*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104156>
- Blanco, M., Ripoll, G., Delavaud, C., & Casasús, I. (2020b). Performance, carcass and meat quality of young bulls, steers and heifers slaughtered at a common body weight. *Livestock Science*, 240. <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. (2012a). 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>

- Bong, J. J., Jeong, J. Y., Rajasekar, P., Cho, Y. M., Kwon, E. G., Kim, H. C., Paek, B. H., & Baik, M. (2012b). 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>
- Brunius, C., Zamaratskaia, G., Andersson, K., Chen, G., Norrby, M., Madej, A., & Lundström, K. (2011). Early immunocastration of male pigs with Improvac® – Effect on boar taint, hormones and reproductive organs. *Vaccine*, 29(51), 9514–9520. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.10.014>
- Bures, D., & Barton, L. (2012). Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech Journal of Animal Science*, 57(1), 34–43.
- 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). <https://doi.org/10.3390/foods8050173>
- Carvalho, M. E., Gasparin, G., Poleti, M. D., Rosa, A. F., Balieiro, J. C. C., Labate, C. A., Nassu, R. T., Tullio, R. R., Regitano, L. C. de A., Mourão, G. B., & Coutinho, L. L. (2014). Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. *Meat Science*, 96(3), 1318–1324. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.014>
- Chardulo, L. A. L., Silveira, A. C., & Vianello, F. (2013). Analytical Aspects for Tropical Meat Quality Assessment. In *Food Quality, Safety and Technology* (pp. 53–62). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1640-1_4

- Clinquart, A., Ellies-Oury, M. P., Hocquette, J. F., Guillier, L., Santé-Lhoutellier, V., & Prache, S. (2022). Review: On-farm and processing factors affecting bovine carcass and meat quality. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 16 Suppl 1, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100426>
- Ding, Z., Huang, F., Zhang, C., Zhang, L., Sun, H., & Zhang, H. (2018). Effect of heat shock protein 27 on the in vitro degradation of myofibrils by caspase-3 and μ -calpain. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 121–128. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13565>
- Dirikolu, L., & Lehner, A. F. (2023). A review of current chemistry, pharmacology, and regulation of endogenous anabolic steroids testosterone, boldenone, and nandrolone in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 46(4), 201–217. <https://doi.org/10.1111/JVP.13397>
- Du, L., Li, K., Chang, T., An, B., Liang, M., Deng, T., Cao, S., Du, Y., Cai, W., Gao, X., Xu, L., Zhang, L., Li, J., & Gao, H. (2022). Integrating genomics and transcriptomics to identify candidate genes for subcutaneous fat deposition in beef cattle. *Genomics*, 114(4), 110406. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2022.110406>
- Fang, X., Zhao, Z., Jiang, P., Yu, H., Xiao, H., & Yang, R. (2017). Identification of the bovine HSL gene expression profiles and its association with fatty acid composition and fat deposition traits. *Meat Science*, 131, 107–118. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2017.05.003>
- Frank, D., Joo, S. T., & Warner, R. (2016). Consumer acceptability of intramuscular fat. In *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* (Vol. 36, Issue 6, pp. 699–708). Korean Society for Food Science of Animal Resources. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.699>
- Gagaoua, M., Bonnet, M., & Picard, B. (2020). Protein Array-Based Approach to Evaluate Biomarkers of Beef Tenderness and Marbling in Cows: Understanding of the Underlying Mechanisms and Prediction. *Foods*, 9(9), 1180. <https://doi.org/10.3390/foods9091180>

- Gagaoua, M., Hughes, J., Terlouw, E. M. C., Warner, R. D., Purslow, P. P., Lorenzo, J. M., & Picard, B. (2020). Proteomic biomarkers of beef colour. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 234–252. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.05.005>
- Gagaoua, M., Terlouw, E. M. 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*, 172, 108311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108311>
- Gagaoua, M., Warner, R. D., Purslow, P., Ramanathan, R., Mullen, A. M., López-Pedrouso, M., Franco, D., Lorenzo, J. M., Tomasevic, I., Picard, B., Troy, D., & Terlouw, E. M. C. (2021). Dark-cutting beef: A brief review and an integromics meta-analysis at the proteome level to decipher the underlying pathways. *Meat Science*, 181, 108611. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2021.108611>
- Garside, D., Gebril, A., Alsaadi, M., & Ferro, V. A. (2014). Fertility Control in Wildlife: Review of Current Status, Including Novel and Future Technologies. 467–488. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_18
- Gómez, J. F. M., Saran Netto, A., 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, 183–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN17102> Effects
- Gu, Z., & Hübschmann, D. (2022). Simplify enrichment: A bioconductor package for clustering and visualizing functional enrichment results. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.04.008>
- Guo, L., Cui, H., Zhao, G., Liu, R., Li, Q., Zheng, M., Guo, Y., & Wen, J. (2018). Intramuscular preadipocytes impede differentiation and promote lipid

- deposition of muscle satellite cells in chickens. *BMC Genomics*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-018-5209-5/FIGURES/6>
- Haoudi, A., & Bensmail, H. (2006). Bioinformatics and data mining in proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 3(3), 333–343. <https://doi.org/10.1586/14789450.3.3.333>
- Huang, C., Hou, C., Ijaz, M., Yan, T., Li, X., Li, Y., & Zhang, D. (2020). Proteomics discovery of protein biomarkers linked to meat quality traits in post-mortem muscles: Current trends and future prospects: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 416–432. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.030>
- Hughes, J. M., Clarke, F. M., Purslow, P. P., & Warner, R. D. (2020). Meat color is determined not only by chromatic heme pigments but also by the physical structure and achromatic light scattering properties of the muscle. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 44–63. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12509>
- Hwang, Y. H., & Joo, S. T. (2017). Fatty Acid Profiles, Meat Quality, and Sensory Palatability of Grain-fed and Grass-fed Beef from Hanwoo, American, and Australian Crossbred Cattle. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2), 153. <https://doi.org/10.5851/KOSFA.2017.37.2.153>
- Ibrahim, A., Ali, M. M., Abou-Khalil, N. S., & Ali, M. F. (2016). Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: Testosterone as an endpoint marker. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0670-3/FIGURES/8>
- Jacinto-Valderrama, R. A., Sampaio, G. S. L., Lima, M. L. P., dos Santos Gonçalves Cyrillo, J. N., & Pflanze, S. B. (2020). Immunocastration on performance and meat quality of *Bos indicus* (Nellore) cattle under different nutritional systems. *Scientia Agricola*, 78(2). <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0136>

- 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 1. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4753>
- Jiang, Z., Zhou, X., Li, R., Michal, J. J., Zhang, S., Dodson, M. V., Zhang, Z., & Harland, R. M. (2015). Whole transcriptome analysis with sequencing: Methods, challenges and potential solutions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(18), 3425–3439. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1934-Y>
- Karolyi, D., Dikić, M., Salajpal, K., & Jurić, I. (2009). Fatty acid composition of muscle and adipose tissue of beef cattle. *Italian Journal of Animal Science*, 8(SUPPL. 3), 264–266. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.s3.264>
- King, D. A., Morgan, W. W., Miller, R. K., Sanders, J. O., Lunt, D. K., Taylor, J. F., Gill, C. A., & Savell, J. W. (2006). Carcass merit between and among family groups of *Bos indicus* crossbred steers and heifers. *Meat Science*, 72(3), 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.08.015>
- Ladeira, M. 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). <https://doi.org/10.3390/ijms17060918>
- Ladeira, M. M., Schoonmaker, J. P., Swanson, K. C., Duckett, S. K., Gionbelli, M. P., Rodrigues, L. M., & Teixeira, P. D. (2018). Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12(s2), s282–s294. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001933>
- Lana, A., & Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, 147, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.011>
- Liang, H., Xu, L., Zhao, X., Pan, K., Yi, Z., Bai, J., Qi, X., Xin, J., Li, M., Ouyang, K., Song, X., Liu, C., & Qu, M. (2020). RNA-Seq analysis reveals the potential

- molecular mechanisms of daidzein on adipogenesis in subcutaneous adipose tissue of finishing Xianan beef cattle. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/JPN.13218>
- Liu, L., Liu, X., Cui, H., Liu, R., Zhao, G., & Wen, J. (2019). Transcriptional insights into key genes and pathways controlling muscle lipid metabolism in broiler chickens. *BMC Genomics*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-6221-0/FIGURES/5>
- Luciano, F. B. (2009). Impactos del consumo de carne roja magra en la salud humana: Una revisión. *CYTA - Journal of Food*, 7(2), 143–151. <https://doi.org/10.1080/19476330902940523>
- Malheiros, J. M., Enríquez-Valencia, C. E., Braga, C. P., Vieira, J. C. S., Vieira, D. S., Pereira, G. L., Curi, R. A., Neto, O. R. M., Oliveira, H. N., Padilha, P. M., & Chardulo, L. A. L. (2021). Application of proteomic to investigate the different degrees of meat tenderness in Nellore breed. *Journal of Proteomics*, 248, 104331. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2021.104331>
- Malone, J. H., & Oliver, B. (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biology*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-34/FIGURES/3>
- Marti, S., Jackson, J. A., Sloomans, N., Lopez, E., Hodge, A., Pérez-Juan, M., Devant, M., & Amatayakul-Chantler, S. (2017). Effects on performance and meat quality of Holstein bulls fed high concentrate diets without implants following immunological castration. *Meat Science*, 126, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.013>
- Matarneh, S. K., Silva, S. L., & Gerrard, D. E. (2021). New Insights in Muscle Biology that Alter Meat Quality. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419>
- McCullough, A. R., & Khan, M. (2022). Testosterone Replacement Options. *Urologic Clinics of North America*, 49(4), 679–693. <https://doi.org/10.1016/J.UCL.2022.07.010>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.021>
- Mullins, C. R., Zerby, H. N., Fitzpatrick, L. A., & Parker, A. J. (2016). *Bos indicus* cattle possess greater basal concentrations of HSP27 , alpha B-crystallin , and HSP70 in skeletal muscle in vivo compared with *Bos taurus* cattle 1. *Journal of Animal Science*, 94, 424–429. <https://doi.org/10.2527/jas2015-9630>
- Nguyen, D. V., Nguyen, O. C., & Malau-Aduli, A. E. O. (2021a). Main regulatory factors of marbling level in beef cattle. *Veterinary and Animal Science*, 14, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100219>
- Nguyen, D. V., Nguyen, O. C., & Malau-Aduli, A. E. O. (2021b). Main regulatory factors of marbling level in beef cattle. *Veterinary and Animal Science*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100219>
- 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., Modzelewska-Kapituła, M., & Tkacz, K. (2023). Effects of Silage Type and Feeding Intensity on Carcass Traits and Meat Quality of Finishing Holstein–Friesian Bulls. *Animals* 2023, Vol. 13, Page 3065, 13(19), 3065. <https://doi.org/10.3390/ANI13193065>

- Nye, C. K., Hanson, R. W., & Kalhan, S. C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27565–27574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804393200>
- 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 regards to our current understanding of the mechanisms involved. In *Meat Science* (Vol. 95, Issue 4, pp. 854–870). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.010>
- Park, S. J., Beak, S. H., Jung, D. J. S., Kim, S. Y., Jeong, I. H., Piao, M. Y., Kang, H. J., Fassah, D. M., Na, S. W., Yoo, S. P., & Baik, M. (2018). Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(7), 1043–1061. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0310>
- Park, S. J., Kang, H. J., Na, S., Lee, S. H., & Baik, M. (2018). Differential expression of extracellular matrix and integrin genes in the longissimus thoracis between bulls and steers and their association with intramuscular fat contents. *Meat Science*, 136(June 2017), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.008>
- Pas, T. M. F. W., Lebret, B., & Oksbjerg, N. (2017). Invited Review: Measurable biomarkers linked to meat quality from different pig production systems. *Archives Animal Breeding*, 60(3), 271–283. <https://doi.org/10.5194/aab-60-271-2017>
- PEREIRA, J. R., Montagner, M. M., Fluck, A. C., Santiago, A. P., & Neres, M. A. (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. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653574008>
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2017). Proteomic Investigations of Beef Tenderness. *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork*, 177–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.010>
- Picard, B., Gagaoua, M., & Hollung, K. (2017). Proteomics as a tool to explain/predict meat and fish quality. In *New Aspects of Meat Quality - from genes to ethics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100593-4/00013-8>
- Picard, B., Gagaoua, M., Micol, D., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., & Terlouw, C. E. M. (2014). Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9808–9818. https://doi.org/10.1021/JF501528S/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2014-01528S_0004.JPEG
- Ren, X., Fu, X., Zhang, X., Chen, S., Huang, S., Yao, L., & Liu, G. (2017). Testosterone regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and epididymal fat accumulation in mice through modulating macrophage polarization. *Biochemical Pharmacology*, 140, 73–88. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2017.05.022>
- Rosa, A. F., Moncau, C. T., Poleti, M. D., Fonseca, L. D., Balieiro, J. C. C., Silva, S. L. E., & Eler, J. P. (2018). Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. *Meat Science*, 138, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.12.006>
- Santiago, B., Baldassini, W., Neto, O. M., Chardulo, L. A., Torres, R., Pereira, G., Curi, R., Chiaratti, M. R., Padilha, P., Alessandroni, L., & Gagaoua, M. (2023). Post-mortem muscle proteome of crossbred bulls and steers: Relationships with carcass and meat quality. *Journal of Proteomics*, 278, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.104871>
- Santiago, B. M., Baldassini, W. A., Chiaratti, M. R., Pandey, A. K., Torrecilhas, J. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, R. V., Lanna, D. P. D., Pereira, G. L., Curi, R. A.,

- Chardulo, L. A. L., & Machado Neto, O. R. (2023). Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nellore young steers and bulls feedlot finished. *Livestock Science*, 268, 105151. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105151>
- Savell, J. W., Mueller, S. L., & Baird, B. E. (2005). The chilling of carcasses. *Meat Science*, 70(3), 449–459. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2004.06.027>
- Silva, L. H. P., Rodrigues, R. T. S., Assis, D. E. F., Benedeti, P. D. B., Duarte, M. S., & Chizzotti, M. L. (2019a). Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. *Journal of Proteomics*, 199(March), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.004>
- Silva, L. H. P., Rodrigues, R. T. S., Assis, D. E. F., Benedeti, P. D. B., Duarte, M. S., & Chizzotti, M. L. (2019b). Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. *Journal of Proteomics*, 199, 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.004>
- Sinha-Hikim, I., Roth, S. M., Lee, M. I., & Bhasin, S. (2003). Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285(1 48-1), 197–205. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00370.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H10731345004.JPEG>
- Smith, S. B., & Crouse, J. D. (1984). Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *The Journal of Nutrition*, 114(4), 792–800. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/114/4/792/4755721>
- Suravajhala, P., Kogelman, L. J. A., & Kadarmideen, H. N. (2016). Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. *Genetics Selection Evolution* 2016 48:1, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12711-016-0217-X>

- 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(November 2016), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.06.009>
- Vahmani, P., Ponnampalam, E. N., Kraft, J., Mapiye, C., Bermingham, E. N., Watkins, P. J., Proctor, S. D., & Dugan, M. E. R. (2020a). Bioactivity and health effects of ruminant meat lipids. Invited Review. In *Meat Science* (Vol. 165). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108114>
- Vahmani, P., Ponnampalam, E. N., Kraft, J., Mapiye, C., Bermingham, E. N., Watkins, P. J., Proctor, S. D., & Dugan, M. E. R. (2020b). Bioactivity and health effects of ruminant meat lipids. Invited Review. In *Meat Science* (Vol. 165). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108114>
- Venkata Reddy, B., Sivakumar, A. S., Jeong, D. W., Woo, Y., Park, S., Lee, S., Byun, J., Kim, C., Cho, S., & Hwang, I. (2015). Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *Animal Science Journal*, 86(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/asj.12266>
- Warner, R. D. (2017). The Eating Quality of Meat—IV Water-Holding Capacity and Juiciness. *Lawrie's Meat Science: Eighth Edition*, 419–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00014-5>
- Warner, R. D., Wheeler, T. L., Ha, M., Li, X., Bekhit, A. E. D., Morton, J., Vaskoska, R., Dunshea, F. R., Liu, R., Purslow, P., & Zhang, W. (2022). Meat tenderness: advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. In *Meat Science* (Vol. 185). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108657>
- Warren, H. E., Scollan, N. D., Enser, M., Hughes, S. I., Richardson, R. I., & Wood, J. D. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Science*, 78(3), 256–269. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2007.06.008>

- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78(4), 343–358. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019>
- Xing, K., Wang, K., Ao, H., Chen, S., Tan, Z., Wang, Y., Xitong, Z., Yang, T., Zhang, F., Liu, Y., Ni, H., Sheng, X., Qi, X., Wang, X., Guo, Y., & Wang, C. (2019). Comparative adipose transcriptome analysis digs out genes related to fat deposition in two pig breeds. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49548-5>
- Yamada, T., Kamiya, M., & Higuchi, M. (2020). Fat depot-specific effects of body fat distribution and adipocyte size on intramuscular fat accumulation in Wagyu cattle. *Animal Science Journal*, 91(1), e13449. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13449>

3 CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E TRANSCRIPTÔMA DO MÚSCULO DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS

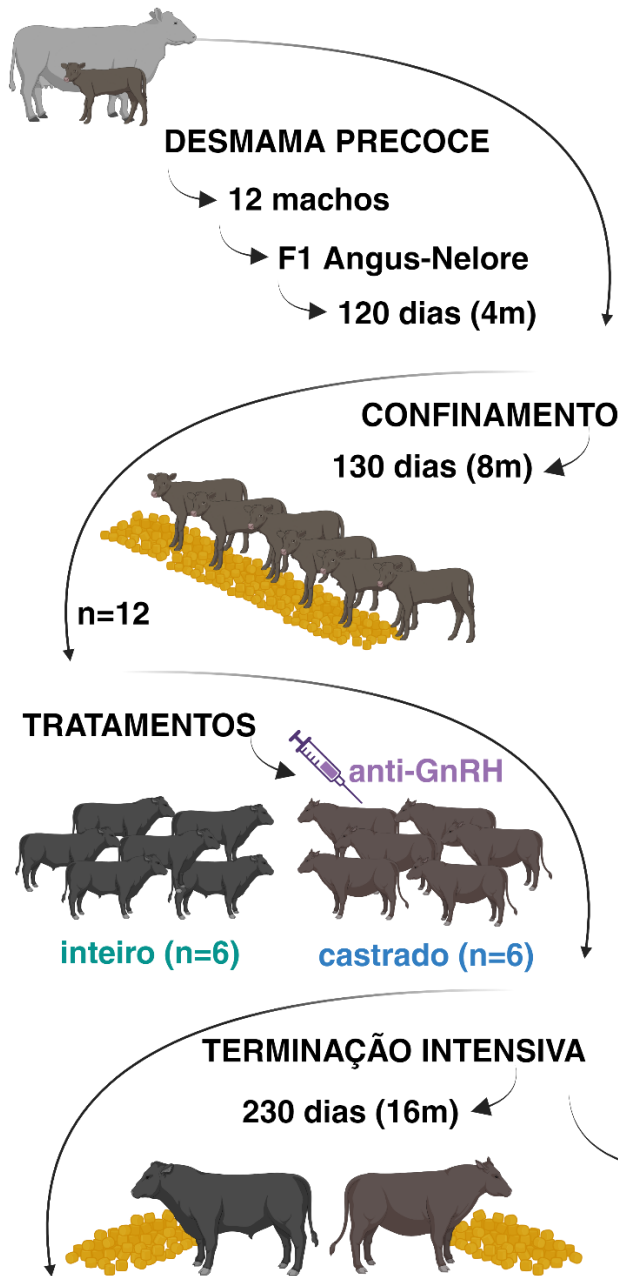
RESUMO - O estudo investigou o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, composição química, perfil de ácidos graxos da carne e transcriptoma do músculo *Longissimus thoracis* (LT) de bovinos F1 Angus-Nelore. Doze bezerros (machos) foram desmamados aos 120 dias de idade e condicionados em um sistema de confinamento por 230 dias. Os tratamentos consistiram em duas classes sexuais: seis machos não castrados (inteiro) e seis machos selecionados aleatoriamente para imunocastração (castrado). O protocolo de imunocastração consistiu em três doses da vacina anti-GnRH aplicadas aos 250, 280 e 370 dias de idade. Após 230 dias de experimento (480 dias de idade em média) os animais foram abatidos em frigorífico comercial para as mensurações de características de carcaça. Logo após o abate (carcaça quente) foram coletadas amostras do músculo LT para a análise do transcriptoma. Amostras do *Longissimus thoracis* (LT) entre a 12^a e 13^a vértebras torácicas foram coletadas na desossa para as análises químicas da carne. Observou-se maior peso de carcaça quente e área de olho de lombo para machos inteiros (353 vs. 310 kg; 88,5 vs. 76,5 cm²; $p<0,05$). A deposição de gordura intramuscular (GIM) foi maior em machos castrados (2,9 vs. 6,5%; $p<0,05$). Machos castrados apresentaram carne com maiores valores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados ($p<0,05$). A classe sexual afetou o proteoma no músculo LT. A expressão de genes exclusivos associados ao metabolismo de lipídios (*FABP7*, *ACOT12*, *UGT8*, *ACER2*, *PLAG1*, *ALOX15*) e vias metabólicas como as de sinalização de PPAR, AMPK, cAMP e FoxO (principalmente *FABP4*, *PLIN1*, *FASN*, *PFKFB3*) em machos castrados, afetaram positivamente a deposição de gordura intramuscular, bem como o perfil de ácidos graxos na carne em comparação aos machos inteiros. Machos castrados apresentam carne com melhores características de qualidade de carne e suas respostas foram justificadas por meio do transcriptoma do tecido muscular, podendo ser uma alternativa para o mercado de carne com valor agregado.

Palavras-chave: classe sexual, enriquecimento, expressão gênica, imunocastração, *longissimus thoracis*, marmoreio

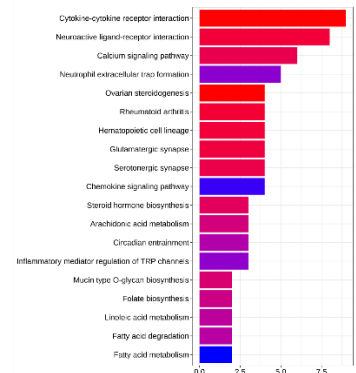
CHAPTER 3 - CARCASS CHARACTERISTICS, CHEMICAL COMPOSITION, FATTY ACID PROFILE AND MUSCLE TRANSCRIPTOME OF F1 ANGUS-NELORE CATTLES, SUPER EARLY OF DIFFERENT GENDER STATUS

ABSTRACT - The study investigated the effect of sex class on carcass characteristics, chemical composition, meat fatty acid profile and transcriptome of the Longissimus thoracis (LT) muscle of F1 Angus-Nellore cattle. Twelve calves (males) were weaned at 120 days of age and conditioned in a confinement system for 230 days. The treatments consisted of two sex classes: six non-castrated males (intact) and six males randomly selected for immunocastration (castrated). The immunocastration protocol consisted of three doses of the anti-GnRH vaccine applied at 250, 280 and 370 days of age. After 230 days of experiment (480 days of age on average) the animals were slaughtered in a commercial slaughterhouse for measurements of carcass characteristics. Immediately after slaughter (hot carcass) samples of the LT muscle were collected for transcriptome analysis. Longissimus thoracis (LT) samples between the 12th and 13th thoracic vertebrae were collected at deboning for chemical analysis of the meat. Higher hot carcass weight and loin eye area were observed for entire males (353 vs. 310 kg; 88.5 vs. 76.5 cm²; $p < 0.05$). Intramuscular fat (IMF) deposition was higher in castrated males (2.9 vs. 6.5%; $p < 0.05$). Castrated males presented meat with higher values of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids ($p < 0.05$). Sexual class affected the proteome in the LT muscle. The expression of exclusive genes associated with lipid metabolism (FABP7, ACOT12, UGT8, ACER2, PLAG1, ALOX15) and metabolic pathways such as PPAR, AMPK, cAMP and FoxO signaling (mainly FABP4, PLIN1, FASN, PFKFB3) in barrows positively affected intramuscular fat deposition, as well as the fatty acid profile in meat compared to intact males. Barrows have meat with better meat quality characteristics and their responses were justified through the transcriptome of muscle tissue, and may be an alternative for the value-added meat market.

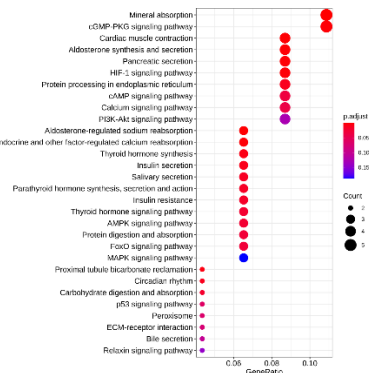
Keywords: bulls, steers, enrichment, gene expression, immunocastration, longissimus thoracis, marbling score



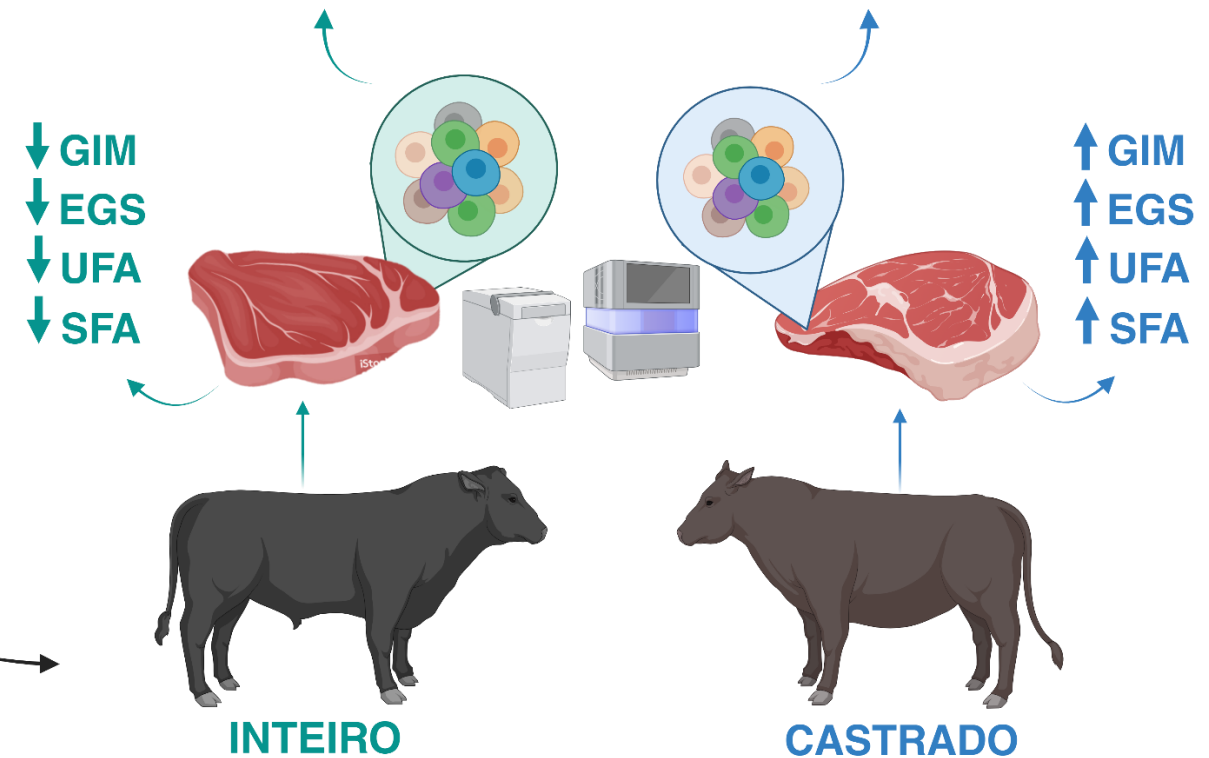
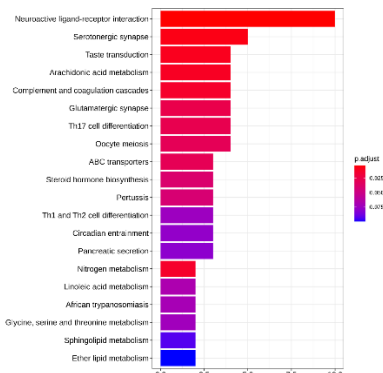
Vias enriquecidas KEGG por meio de genes exclusivos -> inteiros



Vias enriquecidas KEGG por meio de genes co-expressos e FTs



Vias enriquecidas KEGG por meio de genes exclusivos -> castrados



4 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos cárneos com alto valor nutricional e melhores características de qualidade são fatores que influenciam o poder de compra no mercado do consumidor (Mwangi et al., 2019), e também o desenvolvimento da indústria da carne bovina (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021). Dessa forma, sabe-se que o protocolo de castração (convencional ou imunológica) tem sido tema de alguns estudos com o objetivo de melhorar certas características de qualidade como, maciez da carne, gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos (Andreo et al., 2016b; Severino et al., 2022; Silva et al., 2019b).

Contudo, é pouco elucidado os efeitos da castração em bovinos cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares que controlam essas características de qualidade da carne, principalmente animais superprecoces (<24 meses) condicionados à terminação intensiva em confinamento de longo período (230 dias). Dessa forma, a análise de transcriptoma no tecido muscular tem sido utilizada na ciência da carne como uma ferramenta de identificação de genes expressos que regulam características de interesse na qualidade do produto (Trapnell et al., 2010).

Nossa hipótese é baseada em que machos inteiros condicionados a terminação intensiva por período de 230 dias apresentem carne com características de qualidade semelhantes à de bovinos castrados. E, que essas características podem ser elucidadas através do transcriptoma no tecido muscular. Diante disso, nosso objetivo foi investigar o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, composição química, perfil de ácidos graxos na carne e transcriptoma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore, superprecoces e terminados em confinamento por 230 dias.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos seguiram os padrões éticos de pesquisa, estabelecidos pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP (protocolo nº 0208/2019).

5.1 Animais e tratamentos

O estudo foi conduzido no Confinamento Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, no período de outubro de 2019 a junho de 2020. Foram utilizados doze animais, cruzados F1 Angus-Nelore, meios-irmãos com 8 meses de idade média.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com duas classes sexuais: seis machos não castrados (inteiro) e seis machos submetidos a imunocastração (castrado). Para a imunocastração dos machos, foram selecionados seis bezerros aleatoriamente. O protocolo de imunocastração consistiu em três doses da vacina anti-GnRH (Bopriva®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinária LTDA, São Paulo, SP, Brasil) aplicadas por via subcutânea do lado esquerdo dos animais aos 250, 280 e 370 dias de idade.

No período pré-experimental (130 dias), os bezerros foram desmamados precocemente aos 120 dias de idade, identificados e vacinados de acordo com o manejo sanitário de entrada dos animais no confinamento. Foram alojados em única baia externa (20 m x 30 m) com bebedouro tipo cincho onde permaneceram juntos até o início do experimento. Durante o período pré-experimental, os bezerros receberam uma dieta de crescimento (Crescimento-1, Tabela 1) até o início do experimento.

No período experimental (230 dias), os animais foram separados em baias externas (20 m x 10 m) de acordo com os tratamentos (6 animais/baia). Os animais entraram com um peso corporal médio de $292\text{kg} \pm 27$ para machos inteiros e $289\text{kg} \pm 26$ para machos castrados. Durante o período experimental, os animais receberam duas dietas, sendo uma de crescimento e outra de terminação (Crescimento-2 e Terminação, Tabela 1) por 110 e 120 dias, respectivamente. O manejo alimentar diário foi ajustado de acordo com o consumo da baia no dia anterior e fornecida duas vezes ao dia em horários fixos, às 10:00 h. e às 16:00 h.

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas fornecidas durante os períodos de pré-experimento e experimento.

Item	Pré-experimento	Experimento	
	Crescimento-1	Crescimento-2	Terminação
Ingredientes (%MS)			
Feno <i>Coast-Cross</i> Moído	15.0	10.0	4.0
Bagaço de Cana <i>in natura</i>	15.0	10.0	11.0
Milho Moído	30.9	60.9	67.9
Farelo de Soja	12.7	16.0	13.8
Caroço de Algodão	17.5	-	-
Núcleo Mineral e Vitamínico	8.9	3.1	3.3
Composição Nutricional (%MS)			
Proteína Bruta	16.2	14.4	13.4
Extrato Etéreo	2.1	3.0	3.2
Nutrientes Digestíveis Totais	64.8	75.1	76.5
Núcleo Mineral e Vitamínico (g/kg)			
Cálcio	30.5	7.0	7.0
Fósforo	6.0	3.4	3.4
Sódio	4.0	2.0	2.1
Potássio	7.5	8.7	8.7
Magnésio	4.0	3.7	3.6
Enxofre	3.6	6.0	6.0
Núcleo Mineral e Vitamínico (mg/kg)			
Manganês	100	38.3	38.3
Zinco	128	59.4	59.4
Cobre	35	14.5	14.5
Cobalto	2.6	0.9	0.9
Iodo	2.6	0.6	0.6
Selênio	0.5	0.2	0.2
Núcleo Mineral e Vitamínico (UI/kg)			
Vitamina A	10000	1206	1231
Vitamina D	1400	576	576
Vitamina E	100	46.5	46.5

5.2 Abate e amostragem

Após 230 dias de experimento, os animais foram submetidos a duas pesagens seguidas sem jejum hídrico e alimentar para obtenção do peso corporal final (PCF). O peso corporal em jejum foi estimado de acordo com o NRC (2000). Em seguida, os animais foram transportados para um abatedouro comercial (Frigorífico Cowpig, Boituva, São Paulo, Brasil), localizado a 120 km do confinamento experimental. No dia seguinte, os animais foram insensibilizados por concussão cerebral com auxílio de dardo cativa e secção da veia jugular, seguido da esfolagem e evisceração, seguindo as normas de inspeção.

As carcaças foram divididas longitudinalmente e amostras do músculo *Longissimus thoracis* (aproximadamente 20 g) foram coletadas da meia carcaça direita entre a 12ª e 13ª vertebrae torácicas, armazenadas em N líquido e, posteriormente em ultra freezer a -80°C até o início da análise molecular. As carcaças foram pesadas para obtenção do peso de carcaça quente (PCQ) e para o rendimento de carcaça (RC) foi calculado com a seguinte equação: $RC = PCQ / PCF \times 100$. Posteriormente, as carcaças foram lavadas e resfriadas em câmara fria por 48 h a 4°C.

Após 48 h de resfriamento as meias carcaças direitas foram seccionadas entre a 12ª e 13ª vertebrae torácicas (antes da desossa) para a mensuração da área de olho de lombo (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) do músculo LT. A AOL foi registrada em plástico transparente, digitalizadas e analisadas com auxílio do software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA). A EGS foi determinada com paquímetro digital e apresentada em milímetros (mm).

Após a desossa uma porção do LT com aproximadamente 6 cm de comprimento, a partir do ponto de secção citado anteriormente e no sentido cranial, foi retirada e após ser identificada e embalada individualmente a vácuo foi transportada para o laboratório de qualidade de carne (MeatLab, Unesp – Botucatu). As amostras foram seccionadas em 2 bifos de 2,54 cm de espessura, embalados individualmente a vácuo e armazenados a -20°C até a análise da composição química e do perfil de ácidos graxos.

5.3 Composição química da carne

A composição química do músculo LT foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIRS) para determinar os valores médios de proteína, gordura e colágeno total. Os bifes foram descongelados em uma incubadora BOD modelo MA 415 (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 24 horas. Posteriormente, foram removidos os tecidos conjuntivos visíveis e gordura subcutânea dos bifes. Em seguida, os bifes foram moídos e homogeneizados por 5 minutos em misturador. Logo, aproximadamente 180 g da amostra foram distribuídos uniformemente na placa de leitura FoodScan LabTM (Foss NIRSystems, Inc., EUA) (Anderson et al., 2007) e foram realizadas três leituras por amostra, onde a cada leitura as amostras foram homogeneizadas novamente. Em relação ao teor de cinzas, estas foram determinadas pelo método sugerido pelo AOAC (2005).

5.4 Perfil de ácidos graxos

A extração de lipídeos foi realizada de acordo com o método de Hara e Radin (1978) a partir de uma amostra de aproximadamente 3,0 g do músculo LT dissecado, utilizando solventes hexano/isopropanol (3: 2 vv-1). Para a transesterificação de ácidos graxos foi utilizada uma solução de metanol de metóxido de sódio de acordo com a metodologia descrita por Christie (1982).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados em cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo modelo Focus GC-Finnigan (Thermo Finnigan, San Jose, Califórnia, Estados Unidos), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida com dimensões de 100 m × 0,25 mm × 0,20 µm (CP-Sil 88; Varian, Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos). O gás carreador utilizado foi o hidrogênio com vazão de 1,8 ml/min. A temperatura inicial do forno foi de 70°C, mantida por 4 min. Então, aumentou em 13°C/min até 175°C, onde foi mantida por 27 min. Logo, foi aumentada de 4°C/min até 215°C, onde foi mantida por 9 min, seguida de outro aumento de 7°C/min até 230°C, onde foi mantida por 5 min, totalizando 65 min. A temperatura do injetor foi de 225°C e do detector de 260°C.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com os obtidos com amostras padrão de ésteres metílicos nas amostras com padrões de ácidos graxos usando Supelco TM Component Mix

(cat. 18919; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, Estados Unidos) e ácido c9 rumênico, t11 CLA (cat. 05632; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por meio do software Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Milão, Itália).

Foi calculado o total de ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos insaturados (UFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e as razões UFA/SFA, MUFA/SFA e PUFA/SFA.

Os índices de atividades enzimáticas da $\Delta 9$ -dessaturase para os ácidos graxos C16 e C18 e elongase foram estimados de acordo com (Malau-Aduli et al., 1997).

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

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

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

5.5 Extração e sequenciamento de RNA

Três amostras do LT dos machos inteiros e castrados foram utilizadas para a análise de sequenciamento de RNA (RNAseq). A extração do RNA total do tecido muscular para análise de RNAseq foi realizada por meio de kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foi avaliado a quantidade e qualidade do RNA por meio de Fluorômetro Qubit 3 (ThermoFisher Scientific, EUA) e Bioanalyzer 2100® (RNA 6000 Nano Kit, Agilent, EUA).

A síntese e purificação do cDNA durante o preparo da biblioteca foi realizada através do Kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, EUA), a partir de 500 mg de RNA total, conforme protocolo. Em resumo, a cauda poly-A do mRNA foi capturada por meio de oligos Poly-T aderidos à beads magnéticas (AMPure XP Beads – Beckman Coulter), e posteriormente fragmentados e submetidos a síntese de cDNA dupla fita, ligada por adaptadores duplamente indexados. Foi realizada PCR para enriquecimento, seguido de purificação das bibliotecas. A concentração e o perfil das bibliotecas foram determinados por meio do Fluorômetro Qubit dsDNA Assay Kit High Sensitivity (ThermoFisher Scientific, EUA) e Bioanalyzer 2100® (High Sensitivity DNA Kit, Agilent, EUA), respectivamente.

Finalmente, as bibliotecas foram agrupadas e a concentração ajustada para 4 nM para então ser sequenciada em equipamento NextSeq2000 (Illumina, San Diego, EUA) considerando leituras de 2x100 pb. Toda a análise de sequenciamento foi realizada no Centro Genômico, localizado no Laboratório de Genética e Biotecnologia a UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.

Adaptadores de sequenciamento e leituras de baixa complexidade foram removidas em passo inicial de filtragem por meio do Trim Galore 0.6.5 software. Somente as leituras com tamanho acima de 70 nucleotídeos e um score Phred menor que 33 foram mantidas após o corte. Controle de qualidade e a estatística das leituras foram estimadas com software FASTQC versão 0.11.8 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/). As reads foram mapeadas ao genoma bovino referência (*Bos taurus* – ARS-UCD.1.2.1), disponível em: www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/. A abundância (contagem de leituras) de mRNAs de todos os genes anotados foram calculados por meio de featureCounts pertencente ao pacote Rsubread (Liao et al., 2019).

5.6 Identificação de genes exclusivamente expressos

Foram considerados genes como diferencialmente expressos, os que foram exclusivamente expressos em uma das classes sexuais, inteiro ou castrado (expressos em um grupo com mínimo de 3 contagens em 70% das amostras) e não expressas em outro grupo (zero contagens em todas as amostras do mesmo grupo) dentro da comparação, utilizou-se o filterByExpr (Robinson et al., 2009) do pacote DESeq2 R (Love et al., 2014).

5.7 Análise de co-expressão e fatores de transcrição (*inteiro vs castrado*)

A análise de CeTF é uma ferramenta que auxilia na identificação de associações gene-gene significativas e dos principais fatores de transcrição em redes de co-expressão (Oliveira de Biagi et al., 2021). A análise de correlação parcial e teoria da informação (PCIT) (Reverter & Chan, 2008) é utilizada para a reconstrução de redes de co-expressão de genes, que permite identificar as associações significativas gene-gene. Enquanto que, a análise de fatores de impacto regulatórios (RIF) (Reverter et al., 2010) é utilizada para calcular uma correlação de co-expressão entre os fatores de transcrição e genes para cada

condição. Ambas as análises foram realizadas através do pacote “CeTF” do software R desenvolvido por Biagi et al. (2021).

5.8 Análise de enriquecimento funcional

A análise de enriquecimento funcional dos genes detectados foi realizada por meio da análise de super-representação (ORA – Over Representation Analysis) através de um teste hipergeométrico do pacote ClusterProfiler do software R (Yu et al., 2012). Vias metabólicas foram enriquecidas com anotações Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) utilizando *Bos taurus taurus* se pelo menos dois genes fossem presenciados (Benjamini-Hochberg, $p < 0,1$).

5.9 Análises estatísticas

Os dados de características de carcaça, composição química e perfil de ácidos graxos foram submetidos a análise de normalidade dos resíduos por meio do teste Shapiro-Wilk, PROC UNIVARIATE do software estatístico SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram alinhados usando o procedimento PROC RANKS (SAS 9.4). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados utilizando o procedimento PROC MIXED (SAS 9.4), sendo o animal a unidade experimental. Quando encontrado os efeitos entre as classes sexuais o teste Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre as médias ($p \leq 0,05$).

$$Y_{ij} = \mu + \text{csi} + \varepsilon_{ij},$$

Onde: μ = média geral, csi = efeito da classe sexual, ε_{ij} = é o erro experimental.

6 RESULTADOS

6.1 Características de carcaça

A classe sexual afetou as características de carcaça nos animais ($p < 0,05$; Tabela 2). A castração em machos reduziu o peso de carcaça quente (PCQ) em 12% e área de olho de lombo (AOL) em 14% comparado aos machos inteiros. Por outro lado, machos castrados apresentaram maior espessura de gordura subcutânea (EGS) comparado aos machos inteiros, 2,7 mm a mais (Tabela 2).

Tabela 2. Características de carcaça de machos inteiros, castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Variável ¹	Classe sexual		EPM ²	<i>p</i> -valor
	Inteiro	Castrado		
Peso de carcaça quente, kg	353	310	9,399	0,0120
Rendimento de carcaça quente, %	59,0	58,4	0,401	0,5074
Área de olho lombo, cm ²	88,5	76,5	2,498	0,0066
AOL/100 kg PCQ, cm ²	25,1	24,7	0,591	0,5882
Espessura de gordura subcutânea, mm	9,4	12,1	0,636	0,0245

As médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

¹PCQ: peso em carcaça quente, RC: rendimento de carcaça quente, AOL: área de olho de lombo, AOL/100 kg PCQ: área de olho de lombo cm² / 100 kg de PCQ; EGS: espessura de gordura subcutânea.

²EPM: Erro padrão da média.

6.2 Composição química da carne

Houve um efeito da classe sexual sobre a composição química da carne apenas para gordura e umidade ($p = 0,002$; Tabela 3). Assim, foi observado uma diferença aproximada de 124% no teor de gordura intramuscular (GIM) em machos castrados em comparação aos machos inteiros (Figura 1), e contrário para a umidade da carne (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química do *Longissimus thoracis* de machos inteiros e castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Variáveis (%)	Classe sexual		EPM ¹	P-valor
	Inteiro	Castrado		
Umidade	72.5	69.3	0.052	0.0002
Proteína	22.2	21.8	0.617	0.2042
Gordura	2.9	6.5	0.137	0.0002
Cinzas	1.1	1.1	0.553	0.4370
Colágeno	1.3	1.3	0.014	0.9409

¹EPM: Erro padrão da média.

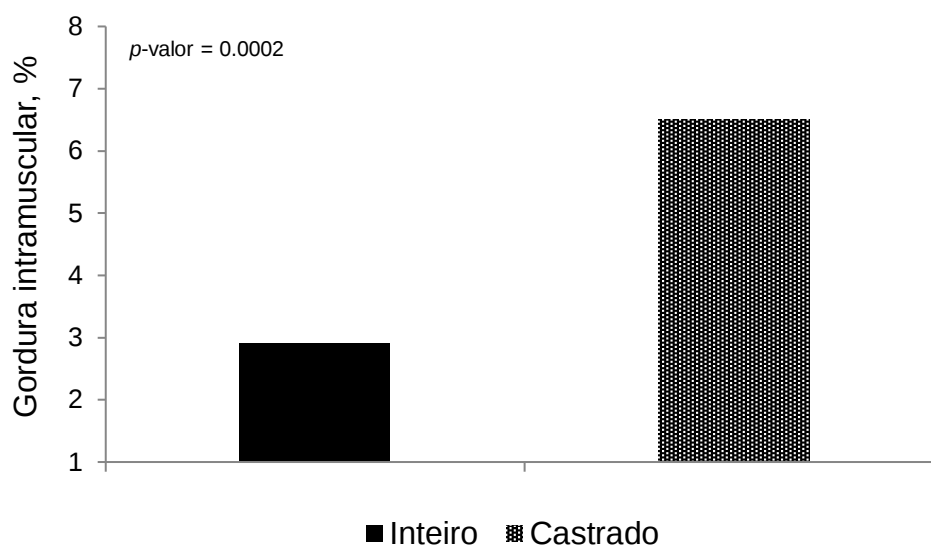


Figura 1. Teor de gordura intramuscular do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros e castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p < 0,05$).

6.3 Perfil de ácidos graxos

A castração em machos estimulou um aumento no teor de ácidos graxos saturados totais, monoinsaturados e insaturados totais em machos castrados ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros e castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Variável	Classe sexual		EPM ¹	p-valor
	Inteiro	Castrado		
Ácido cáprico (C10:0)	1,61	2,93	0,310	0,0225
Ácido láurico (C12:0)	1,85	3,41	0,344	0,0347
Ácido mirístico (C14:0)	73,5	173	20,09	0,0047
Ácido miristoléico (C14:1 cis-9)	18,3	43,5	4,764	0,0130
Ácido pentadecanóico (C15:0)	10,2	16,4	1,823	0,3419
Ácido palmítico (C16:0)	693	1284	139,4	0,0173
Ácido palmitoléico (C16:1 cis-9)	94,1	178	19,15	0,0275
Ácido margárico (C17:0)	24,2	48,4	5,643	0,0173
Ácido heptadecanóico (C17:1)	17,8	37,9	4,650	0,0193
Ácido esteárico (C18:0)	353	583	46,95	0,0025
Ácido oléico (C18:1 cis-9)	1043	2014	209,5	0,0050
Ácido linoléico (C18:2 cis-9 cis-12)	114	153	9,255	0,0261
Ácido araquidônico (C20:0)	1,57	1,97	0,208	0,5830
Ácido γ linolênico (C18:3 n6)	0,29	0,43	0,089	0,4403
Ácido α linolênico (C18:3 n3)	2,31	2,94	0,459	0,5125
CLA (C18:2 cis-9 trans-11)	4,42	5,55	0,439	0,2141
Ácido di-homo α linolênico (C20:3 n6)	3,58	3,63	0,336	0,9428
Ácido araquidônico (C20:4 n6)	19,4	19,7	1,771	0,9307
Ácido eicosapentaenóico (C20:5 n3)	0,78	0,53	0,102	0,2434
Ácido decosapentaenóico (C22:5)	2,89	2,52	0,262	0,5077
Ácido docosahexaenóico (C22:6 n3)	0,21	0,19	0,022	0,7071
SFA	1100	2310	207,6	0,0038
MUFA	1171	2761	273,2	0,0038
PUFA	148	194	10,92	0,2550
UFA	1319	2955	281,6	0,0038
MUFA/SFA	1,06	1,21	0,057	0,2406
PUFA/SFA	0,13	0,08	0,009	0,0038
UFA/SFA	1,20	1,29	0,057	0,4461
n3	3,29	3,66	0,502	0,7275

n6	23,3	22,5	1,814	0,9588
$\omega 6/\omega 3$	7,51	7,56	0,936	0,9812
Δ^9 - dessaturase C16	12,1	12,2	0,398	0,9927
Δ^9 - dessaturase C18	73,5	79,7	1,581	0,0426
Elongase	65,1	62,7	0,485	0,3756

¹EPM: Erro padrão da média.

De forma geral, a imunocastração em machos promoveu maiores níveis ácidos graxos saturados, monoinsaturados e insaturados totais comparado aos machos inteiros (Tabela 4). Entretanto, ácidos graxos insaturados como, γ linolênico (C18:3 n6), α linolênico (C18:3 n3), CLA (C18:2 cis-9 trans-11), di-homo α linolênico (C20:3 n6), araquidônico (C20:4 n6), eicosapentaenóico (C20:5 n3) decosapentaenóico (C22:5), docosahexaenóico (C22:6 n3) e o ácido graxo saturado pentadecanóico (C15:0) não foram afetados pela imunocastração em machos ($p>0,05$; Tabela 4). A atividade da enzima Δ^9 – C18 dessaturase também foi maior em machos castrados comparado aos machos inteiros ($p<0,05$; Tabela 4).

6.4 Genes exclusivamente expressos

Foram mapeados 557 genes exclusivamente expressos nas amostras analisadas dos machos inteiros e castrados (Tabela S1). Desse total, 203 genes exclusivos foram expressos em machos inteiros e 354 foram exclusivamente expressos em machos castrados (Tabela S1).

A análise de enriquecimento funcional dos genes exclusivamente expressos (EEGs) permitiu identificar 39 vias metabólicas KEGG ($p<0,1$), sendo 19 vias enriquecidas para os machos inteiros (Figura 2-A) e 20 vias enriquecidas para os machos castrados (Figura 2-B). Para relacionar as vias enriquecidas com os resultados obtidos no experimento de acordo com as classes sexuais selecionamos algumas vias metabólicas KEGG (Tabelas 5 e 6).

Em machos inteiros, duas vias metabólicas KEGG podem estar ligadas aos resultados observados, como maior ganho de peso em carcaça quente e área de olho de lombo e menor deposição de gordura subcutânea e intramuscular ($p<0,1$, Tabela 5). Sendo elas: biossíntese de hormônio esteróide

(bta00140; *AKR1C3* '527068 e 782884', *CYP3A4*) e degradação de ácidos graxos (bta00071; *ACSBG1*, *CPT1C*) (Tabela 5).

Em machos castrados, três vias metabólicas KEGG que podem ser relacionadas com os resultados obtidos, como maior deposição de gordura subcutânea, intramuscular e perfil de ácidos graxos ($p < 0,1$, Tabela 6). Sendo elas: metabolismo do ácido linoléico (bta00591, *ALOX15*, *PLA2G2D1*), metabolismo de esfingolipídio (bta00260, *UGT8*, *ACER2*) e metabolismo de éter lipídico (bta00600; *UGT8*, *PLA2G2D1*) (Tabela 6).

Destacamos alguns GEEs obtidos nos dois grupos, porém não representados na análise de enriquecimento (vias não significativas) que estão ilustrados na Tabela S1, pois também estão relacionados aos processos metabólicos e podem ajudar a explicar as diferenças obtidas entre as classes sexuais no presente estudo.

Em machos inteiros, observou-se alguns GEEs relacionados ao metabolismo de lipídios (*SLC25A22*, *TTPA*, *LRATD1*), degradação de lipídios (*CPT1*, *ACSBG1*, *CYP3A4*, *AZ6P1*, *FGFR2*), metabolismo da proteína quinase (*ACVR1C*, *SGK2*, *TNK1*, *BUB1*, *PRKCG*), biossíntese de hormônios esteróides (*AKR1C3* '527068 e 782884', *CYP3A4*) e ação/secreção de hormônios do crescimento (*GH1*, *FGFR2*, *PRKCG*).

Em machos castrados, observou-se alguns GEEs relacionados ao metabolismo de lipídeos (*FABP7*, *ACOT12*, *UGT8*, *ACER2*, *PLA2G2D*, *PLCB2*, *ESPL1*, *SPNS3*, *HSD17B1*, *MDA1B*, *PLPPR3*, *GLB1L3*, *CD3G*), metabolismo do ácido linoleico (*ALOX15*, *PLA2G2D1*), metabolismo da proteína quinase (*MOK*) e degradação de lipídios (*PLCH2*, *SPTSSB*, *PLA2G2D1*).

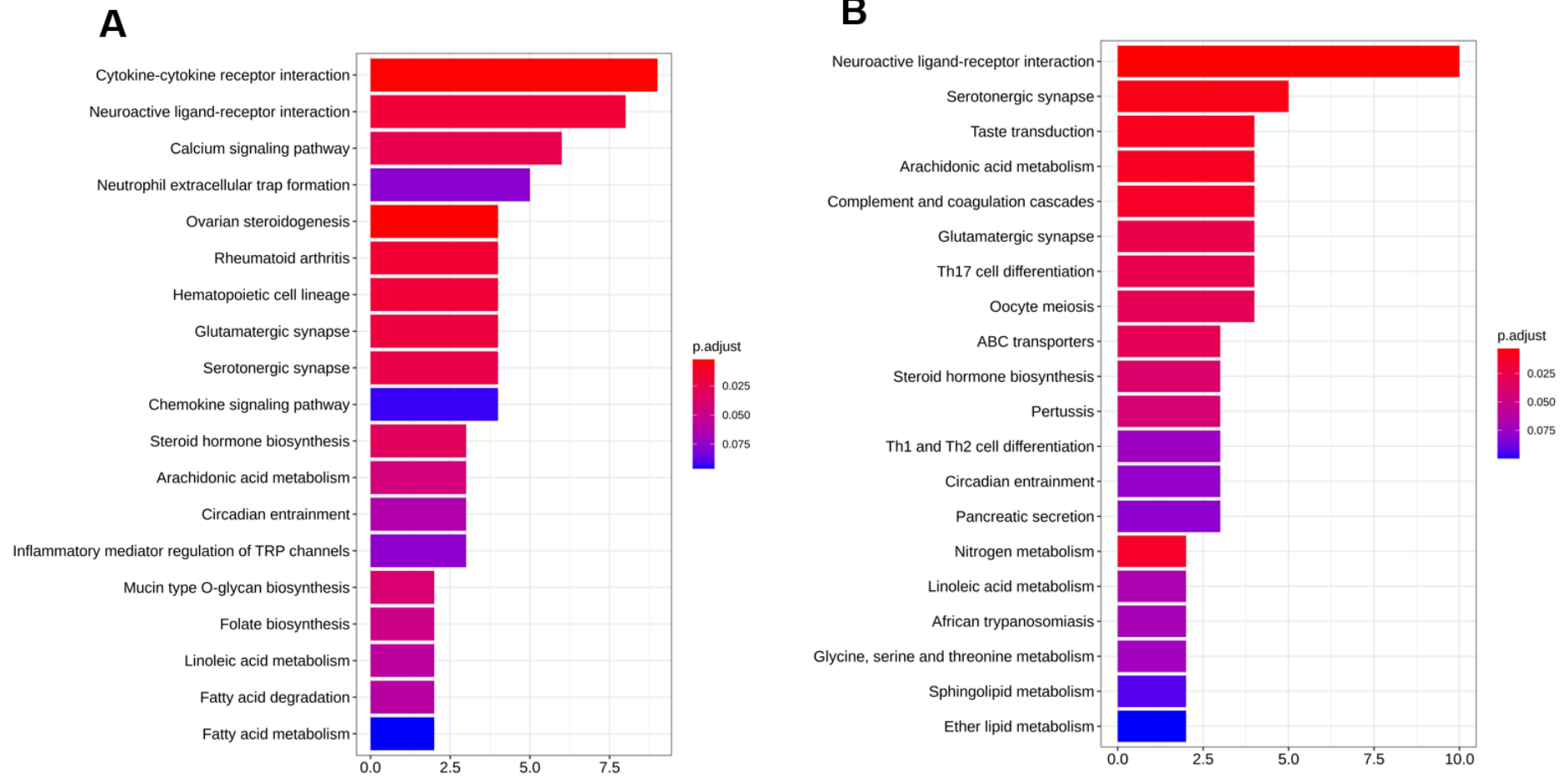


Figura 2: Vias metabólicas enriquecidas KEGG ($p < 0,1$) obtidas pela análise de super-representação (ORA) com base nos genes exclusivamente expressos (GEEs) no músculo *Longissimus thoracis* de machos F1 Angus-Nelore inteiros (A) e castrados (B).

Tabela 5. Vias metabólicas enriquecidas KEGG destacadas da figura 2-A ($p < 0,1$) da análise de super-representação (ORA) dos genes exclusivamente expressos (GEEs) no músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros F1 Angus-Nelore, superprecoces.

ID	Vias KEGG	nº de genes	<i>p</i> -valor	Genes ¹
bta00140	Biossíntese de hormônio esteróide	3	0,0309	<i>AKR1C3</i> (527068 e 782884), <i>CYP3A4</i>
bta00071	Degradação de ácidos graxos	2	0,0594	<i>ACSBG1</i> , <i>CPT1C</i>

¹ AKR1C3: aldo-ceto redutase 1 membro C3 (527068 / 782884); CYP3A4: família 3 do citocromo P450, subfamília A, membro 43; ACSBG1: ácido graxo de cadeia longa - CoA ligase; CPT1C: carnitine O-palmitoyltransferase 1, brain isoform isoform X1.

Tabela 6. Vias metabólicas enriquecidas KEGG destacadas da figura 2-B ($p < 0,1$) da análise de super-representação (ORA) dos genes exclusivamente expressos (GEEs) no músculo *Longissimus thoracis* de machos castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces.

ID	Vias KEGG	nº de genes	<i>p</i> -valor	Genes ¹
bta00591	Metabolismo do ácido linoléico	2	0,0673	<i>ALOX15</i> , <i>PLA2G2D1</i>
bta00260	Metabolismo de esfingolipídio	2	0,0934	<i>UGT8</i> , <i>ACER2</i>
bta00600	Metabolismo de éter lipídico	2	0,0996	<i>UGT8</i> , <i>PLA2G2D1</i>

¹ CLCA3_4: regulador de canal de cloreto ativado por cálcio 3/4; PLCB2: 1-fosfatidilinositol 4,5-bifosfato fosfodiesterase beta-2; PLA2G2D1: precursor da fosfolipase A2 PLA2G2D1 dependente de cálcio; ALOX15: lipoxigenase de ácido graxo poliinsaturado; UGT8: 2-hidroxiacilesfingosina 1-beta-galactosiltransferase; ACER2: ceramidase alcalina 2.

6.5 Análise de co-expressão e fatores de transcrição (*inteiro vs castrado*)

A análise de CeTF foi usada para investigar as diferenças em genes co-expressos e identificar os fatores de transcrição. A análise de enriquecimento funcional permitiu identificar vias metabólicas KEGG ($p < 0,1$) (Figura 3). Foram enriquecidas 32 vias metabólicas de mRNAs (Figura 2-A) e 26 vias enriquecidas pelos fatores de transcrição (Figura 2-B), ambos obtidos por meio da análise de CeTF. Para relacionar as vias enriquecidas com as variáveis analisadas no experimento (características de carcaça, gordura e perfil de ácidos graxos intramuscular) destacamos algumas vias metabólicas KEGG (Tabela 7).

As vias metabólicas KEGG destacadas dos mRNAs foram a sinalização PPAR (bta03320; *PLIN2*, *SCP2*, *FABP4*, *PLIN1*) e sinalização FoxO (bta04068; *BCL6*, *SLC2A4*, *CDKN1A*, *SETD7*) e as destacadas em relação aos fatores de transcrição que foram a resistência à insulina (bta04931; *SLC2A4*, *OGT*, *NR1H2*), sinalização AMPK (bta04152; *SLC2A4*, *PFKFB3*, *FASN*) e sinalização cAMP (bta04024; *ATP2A2*, *ATP1B4*, *ATP1A1*, *ATP2B2*) (Tabela 7).

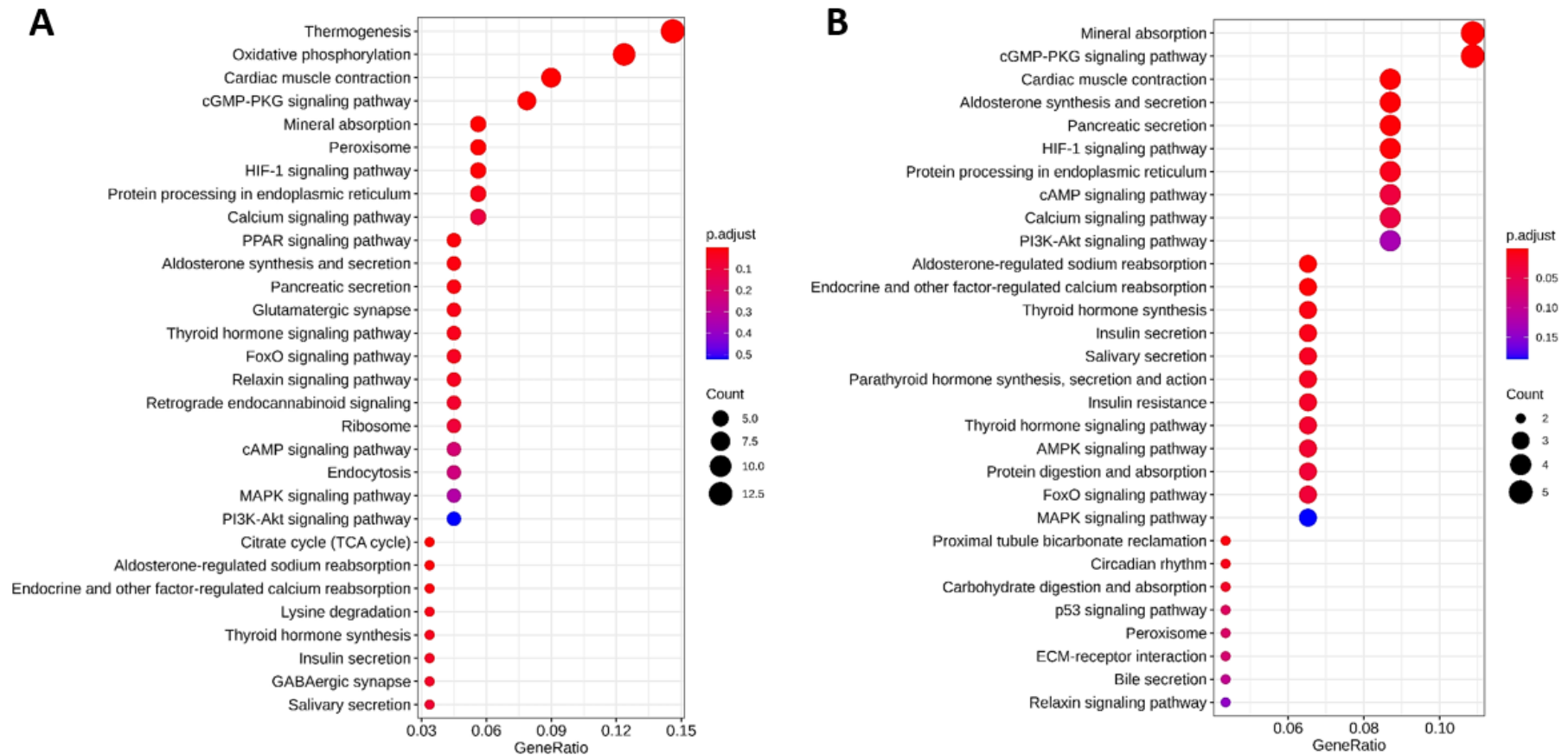


Figura 3: Vias metabólicas enriquecidas KEGG ($p < 0,1$) obtidas pela análise de super-representação (ORA) dos mRNAs (A) e fatores de transcrição (FTs) obtidos por meio da análise de CeTF no músculo *Longissimus thoracis*, em contraste dos machos inteiros vs castrados F1 Angus-Nelore.

Tabela 7. Vias metabólicas enriquecidas KEGG destacadas da figura 3 ($p < 0,1$) destacadas da análise de super-representação (ORA) dos mRNAs e fatores de transcrição obtidos por meio da análise de CeTF, regulados positivamente e negativamente no músculo *Longissimus thoracis*, em contraste dos machos inteiros vs castrados F1 Angus-Nelore.

ID	Vias KEGG	n° de genes	p-valor	Genes regulados ¹	
				positivamente	negativamente
bta04931	Resistência à insulina	3	0,0184	<i>SLC2A4</i>	<i>OGT, NR1H2</i>
bta03320	Via de sinalização de PPAR	4	0,0094	<i>PLIN2, SCP2</i>	<i>FABP4, PLIN1</i>
bta04068	Via de sinalização FoxO	4	0,0291	<i>BCL6, SLC2A4, CDKN1A, SETD7</i>	
bta04152	Via de sinalização AMPK	3	0,0247	<i>SLC2A4</i>	<i>PFKFB3, FASN</i>
bta04024	Via de sinalização cAMP	4	0,0341	<i>ATP2A2, ATP1B4</i>	<i>ATP1A1, ATP2B2</i>

¹ ATP1B4: proteína ATP1B4; ATP1A1: subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio; SLC2A4: família de transportadores de soluto 2, membro transportador de glicose facilitado 4; OGT: UDP-N-acetilglucosamina - peptídeo N-acetilglucosaminiltransferase; NR1H2: receptor de oxisteróis LXR-beta; PLIN1 / PLIN2: perilipina 1 e 2; SCP2: proteína transportadora de esterol 2; FABP4: proteína de ligação a ácidos graxos, adipócitos; BCL6: Proteína 6 do linfoma de células B; CDKN1A: inibidor de quinase dependente de ciclina 1; SETD7: histona-lisina N-metiltransferase isoforma X1; PFKFB3: 6-fosfofruto-2-quinase/frutose-2, 6-bifosfatase 3; FASN: ácido graxo sintase; ATP2A2: retículo sarcoplasmático/endoplasmático cálcio ATPase 2; ATP1B4: proteína ATP1B4; MYH7: cadeia pesada de miosina 7; PPP3CC: isoforma gama da subunidade catalítica serina/treonina-proteína fosfatase 2B; ATP2B2: ATPase 2 transportadora de cálcio da membrana plasmática

7 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que mesmo machos inteiros submetidos a terminação intensiva em confinamento por período de 230 dias, não apresentam carne com teor de gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos semelhante à de machos castrados, tornando nossa hipótese refutada. As diferenças encontradas no presente estudo foram relacionadas com a análise de transcriptoma analisado no músculo *Longissimus thoracis* dos animais.

Através da análise do transcriptoma foi possível associar as respostas de características de carcaça, composição química e perfil de ácidos graxos com as vias metabólicas enriquecidas através dos mRNAs e fatores de transcrição, como resistência à insulina, via de sinalização de PPAR, via de sinalização FoxO, via de sinalização AMPK e via de sinalização cAMP. Adicionalmente, foi possível integrar o estudo alguns genes exclusivos detectados em machos inteiros e castrados para associar as respostas encontradas.

7.1 Características de carcaça e qualidade de carne

De forma geral, os machos inteiros ganharam mais peso em carcaça quente e maior área de olho de lombo comparados aos machos castrados por resposta anabólica do hormônio testosterona (Blanco et al., 2020a; Moreira et al., 2018). A testosterona promove o desenvolvimento de células satélites e maior hipertrofia no tecido muscular (Sinha-Hikim, Roth, Lee, Bhasin, et al., 2003).

Esse hormônio se liga a receptores nos músculos e promove a incorporação de aminoácidos em proteínas, com o aumento da massa muscular sem o incremento de tecido adiposo equivalente (Dayton & White, 2008; Galbraith et al., 1978). Esse mecanismo justifica os maiores valores de PCQ e a AOL observados em machos inteiros comparados aos machos castrados (Tabela 2). Na literatura respostas semelhantes foram amplamente discutidas e consolidadas em comparação a essas duas condições sexuais (Adams et al., 1993; Amatayakul-Chantler et al., 2012; Mueller et al., 2019; Santiago et al., 2023).

Por outro lado, o efeito da testosterona em animais inteiros suprime o desenvolvimento, a proliferação e a maturação dos pré-adipócitos em adipócitos (Ren et al., 2017b), além de, promover efeito inibitório nas atividades das enzimas lipogênicas atuantes no tecido adiposo, levando a taxas lipolíticas basais mais

altas. Além disso, o maior potencial de deposição de gordura em machos castrados é procedido pelas diferenças na curva de crescimento (Owens, Dubeski, & Hansont, 1993). Nesse sentido, a maior deposição de gordura intramuscular em machos castrados comparado aos machos inteiros do estudo foi propiciada por esses fatores fisiológicos.

Houve a redução da umidade e o aumento da gordura intramuscular na carne em machos castrados em comparação aos machos inteiros. Essa associação está relacionada ao diferencial de deposição dos tecidos muscular e adiposo, onde a deposição de tecido muscular armazena aproximadamente 78% de água, enquanto apenas 10% de água é armazenada no tecido adiposo (Owens, Dubeski, & Hanson, 1993). Essa correlação negativa foi relatada em alguns estudos (Ueda et al., 2007; Watanabe et al., 2018), e alguns com animais F1 Angus-Nelore (Lopes et al., 2020; B. M. Santiago et al., 2023).

O maior teor de gordura intramuscular em machos castrados (6,5%) comparado aos machos inteiros (2,9%) justifica as maiores concentrações (mg/100 g de carne) de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), insaturados (UFAs) e saturados (SFAs) no perfil da carne desses animais (Tabela 4). Essa associação é relatada em alguns estudos (Andreo et al., 2016; Bartoň et al., 2010; Santiago et al., 2023).

De acordo com Bartoň et al. (2010) as diferenças na composição de ácidos graxos podem ser explicadas com diferentes atividades enzimáticas na síntese e modificação de ácidos graxos. A dessaturase de ácidos graxos realiza a introdução de ligações duplas em uma posição específica de ácidos graxos de cadeia longa, sendo das três dessaturases presentes nos tecidos animais (Δ^5 , Δ^6 e Δ^9), somente a Δ^9 dessaturase realiza a insaturação em ácidos graxos saturados convertendo-os em seus respectivos ácidos graxos monoinsaturados (Brugiapaglia et al., 2014; Smith, Clare, et al., 2009; Smith et al., 2006).

Em estudo de Andreo et al. (2016) investigaram o efeito da castração (imunológica) sobre o perfil de ácidos graxos na carne de machos da raça Nelore, e após 97 dias de confinamento observaram maiores teores de MUFAs e maior atividade da enzima Δ^9 dessaturase (C18) em machos castrados comparados a machos inteiros. Nesse sentido, nossos resultados corroboram com a maior atividade da enzima Δ^9 dessaturase (C18) atrelada aos maiores teores de MUFAs, através da conversão dos ácidos como o mirístico, palmítico e esteárico em

miristoléico, palmitoléico e oléico, respectivamente, que foram encontrados em machos castrados comparado aos machos inteiros no presente estudo.

Não houve efeito da classe sexual sobre a concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) na carne dos animais (Tabela 4). Existe uma correlação positiva entre o teor de gordura e o diâmetro do adipócito intramuscular (Yamada et al., 2020), contudo a quantidade de fosfolipídio permanece razoavelmente constante, ou tem um discreto aumento, enquanto que os triglicerídeos predominam na composição geral dos ácidos graxos (Warren et al., 2008). Os PUFAs são preferencialmente depositados em fosfolipídios, enquanto saturados e monoinsaturados estão presentes especialmente como triacilgliceróis (Nian et al., 2018). Dessa forma, existe uma correlação entre o teor de gordura intramuscular e a concentração de MUFAs (Smith, Clare, et al., 2009) e SFAs (Bressan et al., 2011), o que está de acordo com os nossos resultados.

O perfil de ácidos graxos na gordura intramuscular influencia o sabor e a palatabilidade da carne (Joo et al., 2017; Ladeira et al., 2014; Nian et al., 2018). Por exemplo, os UFAs produzem alguns compostos de degradação, como cetonas, álcoois e aldeídos alifáticos, que podem participar da reação de Maillard e contribuir com a palatabilidade e sabor da carne (Elmore et al., 1997; Mottram & Edwards, 1983; Oh et al., 2011), principalmente o ácido oléico. Portanto, a castração pode ser utilizada como alternativa na indústria da carne bovina com foco em melhorar o perfil de ácidos graxos, principalmente em relação aos monoinsaturados, como os encontrados no presente estudo.

7.2 Transcriptoma do tecido muscular

Embora machos inteiros não tenham alcançado as mesmas características de qualidade de carne em relação aos machos castrados, a análise do transcriptoma no tecido muscular contribuiu para o entendimento dos mecanismos levaram a essas diferenças.

A análise de CeTF (Oliveira de Biagi et al., 2021) permitiu identificar mRNAs e fatores de transcrição (TFs) relacionados a resistência à insulina, via de sinalização de PPAR, via de sinalização FoxO, via de sinalização AMPK e via de sinalização cAMP.

Além disso, foram detectados genes exclusivamente expressos (EEGs) em machos castrados que participam do metabolismo de lipídios (*FABP7*, *ACOT12*,

UGT8, ACER2, PLAG1, PLA2G2D1, PLCB2, ESPL1, SPNS3, HSD17B1, MDA1B, PLPPR3, GLB1L3, CD3G), metabolismo do ácido linoleico (*ALOX15, PLA2G2D1*) e metabolismo da proteína quinase (*MOK*). Já, em machos inteiros, foram observados EEGs relacionados a degradação de lipídios (*CPT1, ACSBG1, CYP3A4, AZ6P1 (AZGP1), FGFR2*), biossíntese de hormônios esteróides (*AKR1C3 '527068 e 782884', CYP3A4*) e ação/secreção de hormônios do crescimento (*GH1, FGFR2, PRKCG*).

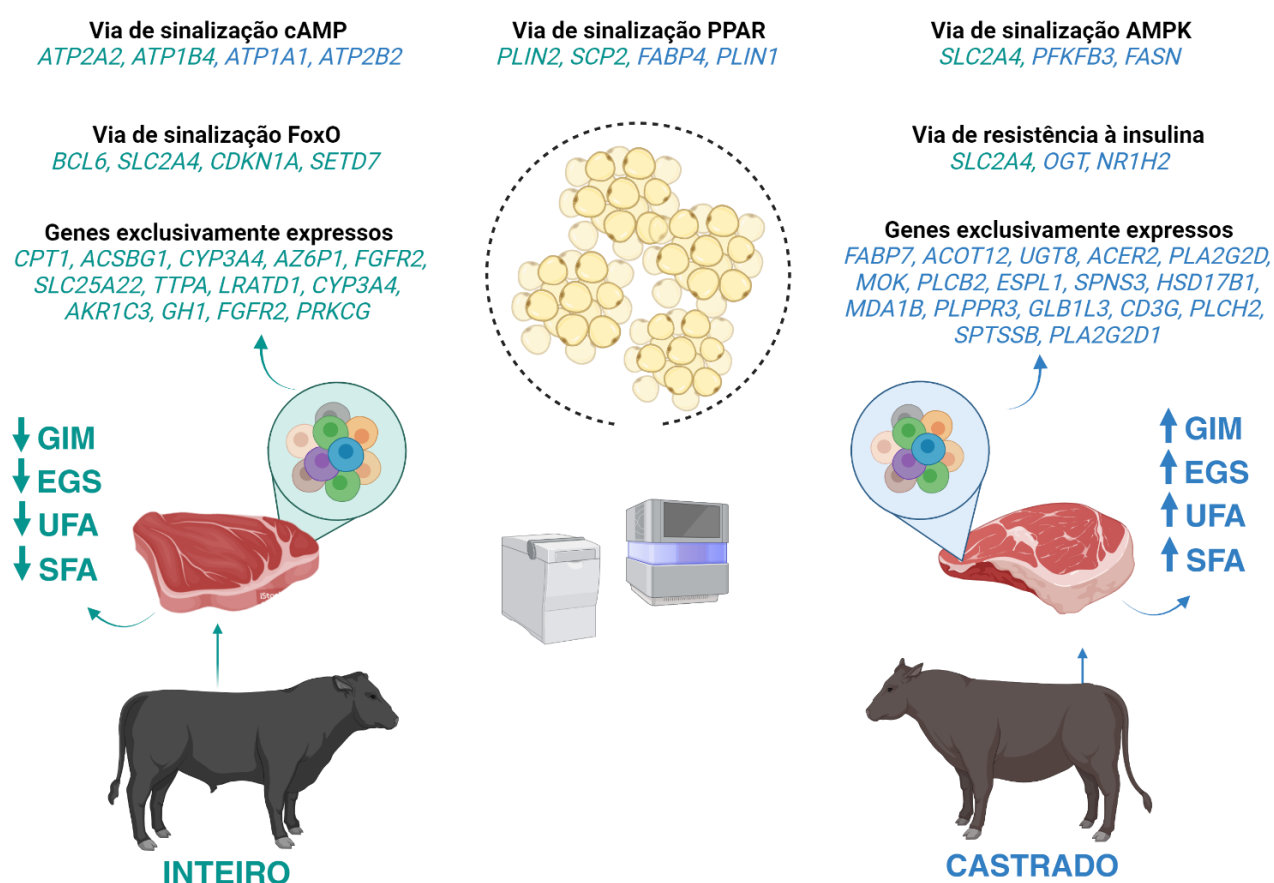


Figura 6: Representação dos genes exclusivos e vias metabólicas enriquecidas em machos inteiros (verde) e castrados (azul).

7.3 Genes exclusivamente expressos

A castração é amplamente conhecida por afetar positivamente a qualidade da carne bovina (Gómez et al., 2019; Mueller et al., 2019; Santiago et al., 2023). Por meio da análise de genes exclusivamente expressos (GEEs) foi possível entender alguns processos que estão relacionados a maior deposição de gordura em machos castrados, e maior ganho de peso em carcaça em machos inteiros. Embora nem todos os genes detectados tenham sido relatados em estudos com bovinos ou tenham sido amplamente elucidados na literatura.

O maior ganho em carcaça atrelado a menor deposição de gordura em machos inteiros pode estar ligado a expressão dos genes exclusivos como o *GH1*, *CPT1*, *ACSBG1*, *FGFR2*, *AZ6P1*, *PRKCG*, *AKR1C3* e *CYP3A4*.

O hormônio do crescimento (codificado pelo gene *GH1*) bem como os genes que codificam receptores e fatores de transcrição estão relacionados a síntese de proteína e desenvolvimento muscular (Cardoso et al., 2014). Machos inteiros são amplamente conhecidos pela eficiência em depositar de tecido muscular em comparação aos animais castrados (Blanco et al., 2020; Santiago et al., 2023), muito atrelado ao poder anabólico do hormônio testosterona (Baatar & Hwang, 2020) que promove a proliferação de células satélites e a maturação de células musculares (Sinha-Hikim, Roth, Lee, Bhasin, et al., 2003). Em estudo com células reprodutoras de bovinos foi observado que a presença de andrógenos aumentou a abundância do gene *FGFR2* (fator de crescimento de fibroblastos-2) (Schütz et al., 2022). Machos inteiros tiveram a expressão exclusiva dos genes *GH1* e *FGFR2* que podem estar associados ao maior desenvolvimento muscular, e consequentemente maior ganho em carcaça nesses em comparação aos machos castrados.

Por outro lado, a testosterona (hormônio esteróide) suprime o desenvolvimento, a proliferação e a maturação dos pré-adipócitos em adipócitos (Ren et al., 2017), que reforça que o estado hormonal altera deposição de tecidos muscular e adiposo entre as classes sexuais (Nguyen et al., 2021a; Owens, Dubeski, & Hanson, 1993). Nesse sentido, nossos resultados detectaram a expressão exclusiva dos genes *CPT1C* (codifica carnitina palmitoiltransferase-1) e *ACSBG1* (ácido graxo de cadeia longa-CoA ligase) que desempenhas reações de beta oxidação e transporte de ácidos graxos de cadeia longa nas mitocôndrias (Ladeira et al., 2016; Steinberg et al., 2000), sugerindo maior catabolismo de

lipídios nesses animais em comparação aos machos castrados e corroborando com nossos resultados.

A maior deposição de gordura subcutânea e intramuscular em machos castrados pode estar associada a expressão exclusiva dos genes *FABP7*, *ACOT12*, *UGT8*, *ACER2*, *PLAG1*, *ALOX15*, *PLA2G2D1*, *PLCB2*, *ESPL1*, *SPNS3*, *HSD17B1*, *MDA1B*, *PLPPR3*, *GLB1L3*, *CD3G*, *MOK*.

A *ACER2* (ceramidase alcalina-2) é uma enzima que atua no metabolismo energético, metabolismo de carboidratos e metabolismo lipídico e foram foi relacionada ao conteúdo de gordura intramuscular em coelhos (Sosa-Madrid et al., 2020). A enzima *UGT8* (2-hidroxiacilesfingosina galactosiltransferase beta-1) catalisa a transferência de galactose para ceramida para sintetizar os esfingolipídios galactosilceramida. Outros genes como o *ACOT12* (acil-CoA tioesterase-12) (Fang et al., 2017b), *ALOX15* (araquidonato lipoxigenase-15) (J. Liu et al., 2024; Zhao et al., 2008), que também participa da síntese de ácidos graxos. A expressão exclusiva desses genes pode sugerir maior potencial lipídico em machos castrados em comparação aos machos inteiros.

7.4 Via de resistência à insulina

A insulina é sintetizada pelas células β -pancreáticas e é considerado o hormônio mais importante na regulação do metabolismo energético (dos Santos Silva et al., 2019). Como a insulina aumenta a captação de glicose pelos tecidos, dietas mais energéticas podem aumentar os potenciais glicogênico e insulinogênico devido a maior produção de propionato no rúmen (precursor de glicose) e, conseqüentemente, maior deposição de gordura intramuscular, uma vez que esse tecido possui maior sensibilidade a insulina do que no tecido adiposo subcutâneo (Dimitriadis et al., 2011; Gilbert et al., 2003; Joseph et al., 2010; Smith et al., 1983; Smith, Kawachi, et al., 2009), além de estimular a maior expressão gênica de codificadores de enzimas lipogênicas (Ladeira et al., 2016).

O gene *SLC2A4* que codifica a proteína transportadora de glicose 4 (*GLUT4*) em adipócitos enriqueceu as vias de resistência à insulina, sinalização de AMPK e FoxO no presente estudo. O *GLUT4* é o principal transportador de glicose estimulado pela insulina, e sua expressão é predominantemente no músculo esquelético, no músculo cardíaco e no tecido adiposo (Nelson & Cox, 2004). O transporte de glicose via *GLUT4* para o tecido muscular e adiposo é a

etapa de controle da taxa de eliminação de glicose mediada por insulina, e está eliminada é reduzida em estados de resistência à insulina (Herman & Kahn, 2006).

Embora a *SLC2A4/GLUT4* tenha sido associado ao aumento da captação de lipídios no tecido adiposo em camundongos (Abel et al., 2001; Tozzo et al., 1995), nosso estudo observou resposta contraditória, sendo que o gene *SLC2A4* teve regulação positiva para machos inteiros, que depositaram menos gordura intramuscular comparado aos machos castrados. Outro estudo também observou a maior expressão de *SLC2A4/GLUT4* em animais inteiros com menor gordura intramuscular (Cesar et al., 2015). O metabolismo lipídico pode ser afetado pelo *SLC2A*, dessa forma, variações no gene *SLC2A4* podem potencialmente afetar o marmoreio, e outras características relacionadas à gordura, bem como a qualidade (Grindflek et al., 2002).

Esse efeito inesperado também pode ser justificado através de um estudo realizado por Poletto et al. (2015) que investigaram os efeitos do ácido graxo oléico e linoléico sobre a regulação do gene *SLC2A4* (in vitro), e observaram que esses ácidos graxos insaturados são potentes inibidores da expressão de *SLC2A4/GLUT4* em células musculares. Resultado que sugere a regulação negativa do gene *SLC2A4* em machos castrados no presente estudo, onde sua expressão é reprimida pela maior concentração de ácidos graxos oléico e linoléico no tecido muscular em comparação aos machos inteiros. Além disso, no mesmo estudo Poletto et al. (2015) verificaram a maior atividade do gene *NR1H3* (antigo LXR α) em altas concentrações do ácido graxo linoleico, que também reforça nossos resultados encontrados em machos castrados, uma vez que a menor expressão do gene *NR1H2* pode ter propiciado devido ao maior teor de ácido linoléico no tecido muscular.

7.5 Via de sinalização PPAR

A adipogênese é regulada em grande parte pelos fatores de transcrição pertencentes à família de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma *PPAR* (M. Du et al., 2010). Os subtipos *PPARA*, *PPARG* e *PPARB* atuam como fatores de transcrição que controlam a regulação de glicose e lipídeos intracelulares (Y. R. Liu et al., 2014). Dentre as isoformas, o *PPARG* é o principal

fator regulatório na adipogênese e lipogênese, mas também atua na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (Grindflek et al., 2000; Sharma et al., 2012).

O *FABP4* é um transportador de lipídios e tem uma baixa expressão no início da lipogênese, o qual aumenta com o processo de diferenciação de adipócitos na via de sinalização PPAR, e é um indicador potencial do número de adipócitos no músculo esquelético (Hausman et al., 2014). Alguns estudos observaram maior expressão de *FABP4* em animais castrados comparados aos inteiros (Bong et al., 2012; Park et al., 2018; Santiago et al., 2023), e tem sido mencionado como biomarcador de adipócitos intramusculares em bovinos (Jurie et al., 1998; Moore et al., 1991; Wang et al., 2015), exercendo o transporte de ácidos graxos para dentro da célula (Ladeira et al., 2018). Além disso, o gene *FABP7* expresso exclusivamente em machos castrados, que embora tenha sua atuação no cérebro através da análise de transcriptoma descobriram que pode estar também envolvido no metabolismo de ácidos graxos no fígado e músculo de ovelhas (Gunawan et al., 2021).

O *PLIN1* é uma das principais proteínas estruturais que revestem as superfícies das gotículas lipídicas maduras dos adipócitos e desempenha um papel importante no armazenamento dos triacilgliceróis (Subramanian et al., 2004), principalmente no músculo esquelético (Bosma et al., 2012). Em estudo de Shijun et al. (2020) consideraram o *PLIN1* como regulador positivo na adipogênese e constataram sua ativação mediada por fatores de transcrição como o gene *PLAG1* (gene do adenoma pleomórfico-1). No presente estudo foi detectado regulação positiva dos genes *FABP4* e *PLIN1* em machos castrados, além de terem expressado exclusivamente o gene *PLAG1*, sugerindo maior regulação desses genes e maior deposição de gordura em comparação aos machos inteiros.

7.6 Via de sinalização AMPK

A via de sinalização da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (*AMPK*) exerce o papel fundamental no equilíbrio energético dentro da célula, atuando na regulação de glicose e lipídios (Ouyang et al., 2019). A ativação dessa via se dá pela codificação das subunidades catalíticas durante a oxidação dos ácidos graxos (Zhang et al., 2021), uma vez ativada promove a glicólise no músculo esquelético (Scheffler, 2022), além de regular numerosas

vias energéticas, como a glicogênese. *AMPK* estimula a utilização de glicose através da fosforilação de moléculas-chaves na captação e transporte de glicose (N. Wu et al., 2013), por exemplo, *AMPK* atua na fosforilação das proteínas *TXNIP* e *PLD1* que ocasionam aumento na membrana dos transportadores de glicose, como o *GLUT4* (J. H. Kim et al., 2010), codificado pelo gene *SLC2A4* que enriqueceu essa via no presente estudo.

Em estudo de Reddy et al. (2017) avaliando o efeito da desmama precoce e em bezerros alimentados com concentrado por setenta dias através da expressão gênica, observaram regulação positiva das vias de biossíntese de ácidos graxos, e alguns dos genes detectados nessa via foi o *PFKFB3*. A enzima *PFKFB3* (fosfofruto-2-quinase/bifosfatase-3) é fosforilada pela *AMPK* e promove a glicólise, sendo considerada uma das enzimas críticas responsáveis por regular a taxa de glicólise (W. Wu et al., 2021).

A enzima codificada pelo gene *FASN* é uma proteína que desempenha várias funções, sendo que a principal é catalisar a síntese de palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA durante a biossíntese de ácidos graxos (ativado pela *SREBP*) (Ladeira et al., 2016). Esse gene tem apresentado correlação com o conteúdo de gordura intramuscular em bovinos (Jeong et al., 2012; Ward et al., 2010), e desempenha um papel importante no crescimento hiperplásico, que tem um efeito positivo na maciez da carne (Santos Silva et al., 2020), característica comumente observada em machos castrados comparados aos machos inteiros (Santiago et al., 2023). Nesse estudo, a via de sinalização *AMPK* está associada com a maior deposição de gordura subcutânea e intramuscular, principalmente pela regulação positiva dos genes *PFKFB3* e *FASN* em machos castrados em comparação aos machos inteiros.

7.7 Via de sinalização cAMP e FoxO

Os principais fatores de transcrição centrais para a adipogênese são *PPARG*, fator de transcrição *CCAAT* (proteína de ligação ao estimulador alfa *C/EBPα*) que uma vez ativos se autorregulam para se manterem expressos (M. Du et al., 2010). A monofosfato de adenosina cíclico (*cAMP*) exerce papel fundamental durante a diferenciação dos adipócitos, uma vez que os níveis intracelulares de *cAMP* são elevados nos pré-adipócitos à medida que ocorre a estimulação adipogênica e a diferenciação (Taskén, 2014), podendo regular a

expressão gênica e os processos associados ao metabolismo de lipídios (Zhu et al., 2023).

O gene *BCL6* que codifica a proteína linfoma de células B-6 (*BCL6*) que também realiza a função de comprometimento das células tronco mesenquimais quanto a diferenciação adipogênica ativando o transdutor de sinal e o ativador da transcrição-1 (*STAT1*) a jusante (Ambele et al., 2020).

A *BCL6* enriqueceu a via de sinalização FoxO no presente estudo, que por sua vez, realiza a importante função reguladora do controle celular, efeito antioxidante, apoptose, inibição tumoral, metabolismo de glicose e lipídios, entre outros processos biológicos (Chae et al., 2019; Chen et al., 2019), e sua atividade transcricional por meio do *FoxO* (proteína forkhead box O1) é regulado por alterações pós-transcricionais como a fosforilação, acetilação e ubiquitinação (Matsuzaki et al., 2005; Qiao & Shao, 2006).

FoxO tem atraído a atenção sobre a interferência de na regulação negativa da expressão de genes marcadores de diferenciação adipogênica, como o *PPARG* (Song et al., 2023), e como fator alvo para perda através da interação com o *CDKN1A* (inibidor do ciclo celular p21) que atua no controle celular e diferenciação de adipócitos (P. Zou et al., 2014). Embora no presente estudo essa proteína não tenha sido observada significativamente, os genes que enriqueceram essa via foram regulados positivamente em machos inteiros, que talvez possa indicar associação negativa com os genes lipogênicos nesses animais em comparação aos machos castrados. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, reforça-se que a interação entre os grupos de genes e vias metabólicas está fortemente associada a regulação da deposição de gordura em animais castrados.

8 CONCLUSÕES

Machos inteiros não produzem carne com teor gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos semelhante à de machos castrados, mesmo que submetidos a terminação em confinamento por 230 dias. Porém, apresentam ganho de carcaça superior as demais classes sexuais.

Machos inteiros e castrados apresentaram carne com força de cisalhamento semelhantes.

A castração propiciou maior deposição de gordura subcutânea, intramuscular e melhor perfil de ácidos graxos na carne. Podendo ser uma alternativa para o mercado de carnes com valor agregado.

A classe sexual afetou fortemente a expressão de genes exclusivos e fatores transcricionais que regulam a deposição de gordura no músculo *Longissimus thoracis*. Os mecanismos moleculares associados ao metabolismo de lipídios mediados, principalmente, pelos genes *FABP4*, *FASN*, *PLIN1* e *PFKFB3* enriqueceram as vias metabólicas de sinalização de PPAR, AMPK, cAMP e FoxO, e os genes exclusivamente expressos *FABP7*, *ACOT12*, *UGT8*, *ACER2*, *PLAG1* e *ALOX15* em machos castrados, que regularam positivamente a deposição de gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos na carne.

9 REFERÊNCIAS

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., & Hadro, E. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409(8). <https://doi.org/10.1038/35055575>.
- Amatayakul-Chantler, S., Hoe, F., Jackson, J. A., Roca, R. O., Stegner, J. E., King, V., Howard, R., Lopez, E., & Walker, J. (2013). Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine bopriva or surgical castration of bos indicus bulls raised on pasture in brazil. *Meat Science*, 95(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.008>
- Ambele, M. A., Dhanraj, P., Giles, R., & Pepper, M. S. (2020). Adipogenesis: A complex interplay of multiple molecular determinants and pathways. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124283>
- Anderson, S., Nanke, M.; K., Perez, ; A, Phelps, ; M, Reitz, ; J, Salazar, ; A, Shinkle, ; T, Strampe, ; M, van Horn, ; K, Williams, ; J, Wipperfurth, ; C, Zelten, ; S, & Zerr, ; S. (2007). Determination of Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan™ Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated. *Journal of AOAC International*, 4(90), 1073–1083. <https://academic.oup.com/jaoac/article/90/4/1073/5657890>
- Andreo, N., Bridi, A. M., Soares, A. L., Prohmann, P. E. F., Peres, L. M., Tarsitano, M. A., de Lima Giangareli, B., & Takabayashi, A. A. (2016a). 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>
- Andreo, N., Bridi, A. M., Soares, A. L., Prohmann, P. E. F., Peres, L. M., Tarsitano, M. A., de Lima Giangareli, B., & Takabayashi, A. A. (2016b). 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>
- Baatar, D., & Hwang, S. G. (2020). Effect of testosterone on the differentiation control of stromal vascular cells isolated from longissimus muscle of Hanwoo beef cattle. *Meat Science*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107916>
- Bartoň, L., Kott, T., Bureš, D., Řehák, D., Zahradková, R., & Kottová, B. (2010).

- The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*, 85(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.11.016>
- 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. <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>
- Bosma, M., Hesselink, M. K. C., Sparks, L. M., Timmers, S., Ferraz, M. J., Mattijssen, F., Van Beurden, D., Schaart, G., De Baets, M. H., Verheyen, F. K., Kersten, S., & Schrauwen, P. (2012). Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels. *Diabetes*, 61(11), 2679–2690. <https://doi.org/10.2337/db11-1402>
- 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>
- Brugiapaglia, A., Lussiana, C., & Destefanis, G. (2014). Fatty acid profile and cholesterol content of beef at retail of Piemontese, Limousin and Friesian breeds. *Meat Science*, 96(1), 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.012>
- Cardoso, D. F., de Souza, F. R. P., de Camargo, G. M. F., Fonseca, P. D. da S., Fonseca, L. F. S., Braz, C. U., Boligon, A. A., Mercadante, M. E. Z., de Albuquerque, L. G., & Tonhati, H. (2014). Polymorphism analysis in genes of the somatotrophic axis in Nellore cattle selected for growth. *Gene*, 545(2), 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.033>
- Cesar, A. S. M., Regitano, L. C. A., Koltes, J. E., Fritz-Waters, E. R., Lanna, D. P. D., Gasparin, G., Mourão, G. B., Oliveira, P. S. N., Reecy, J. M., & Coutinho, L. L. (2015). Putative regulatory factors associated with intramuscular fat

- content. PLoS ONE, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128350>
- Chae, Y. C., Kim, J. Y., Park, J. W., Kim, K. B., Oh, H., Lee, K. H., & Seo, S. B. (2019). FOXO1 degradation via G9a-mediated methylation promotes cell proliferation in colon cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(4), 1692–1705. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1230>
- Chen, J., Lu, Y., Tian, M., & Huang, Q. (2019). Molecular mechanisms of foxo1 in adipocyte differentiation. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 62, Issue 3, pp. R239–R253). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0178>
- Christie, W. W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *Journal of Lipid Research*, 23(7), 1072–1075. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)38081-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)38081-0)
- Dayton, W. R., & White, M. E. (2008). Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. In *Journal of animal science* (Vol. 86, Issue 14 Suppl). <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0456>
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <http://code.google.com>
- Dos Santos Silva, D. B., Fonseca, L. F. S., Pinheiro, D. G., Muniz, M. M. M., Magalhães, A. F. B., Baldi, F., Ferro, J. A., Chardulo, L. A. L., & De Albuquerque, L. G. (2019). Prediction of hub genes associated with intramuscular fat content in Nelore cattle. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5904-x>
- Du, M., Tong, J., Zhao, J., Underwood, K. R., Zhu, M., Ford, S. P., & Nathanielsz, P. W. (2010). Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. In *Journal of animal science* (Vol. 88, Issue 13 Suppl). <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2311>
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., Enser, M., & Wood, J. D. (1997). Novel Thiazoles and 3-Thiazolines in Cooked Beef Aroma.
- Fang, X., Zhao, Z., Jiang, P., Yu, H., Xiao, H., & Yang, R. (2017). Identification of the bovine HSL gene expression profiles and its association with fatty acid composition and fat deposition traits. *Meat Science*, 131, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.05.003>

- Gagaoua, M., Terlouw, E. M. 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*, 172, 108311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108311>
- Galbraith, H., Dempster, D. G., & Miller, T. B. (1978). A note on the effect of castration on the growth performance and concentrations of some blood metabolites and hormones in British Friesian male cattle. *Animal Production*, 26(3), 339–342. <https://doi.org/10.1017/S0003356100040964>
- Gilbert, C. D., Lunt, D. K., Miller, R. K., & Smith, S. B. (2003). Carcass, sensory, and adipose tissue traits of Brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. *J. Anim. Sci*, 81, 2457–2468. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/81/10/2457/4789748>
- 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. (2019). 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>
- Grindflek, E., Sundvold, H., Lien, S., & Rothschild, M. F. (2000). Rapid communication: physical and genetic mapping of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) gene to porcine chromosome 13. *Journal of Animal Science*, 78(5), 1391. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/5/1391/4668499>
- Gunawan, A., Listyarini, K., Harahap, R. S., Jakaria, Roosita, K., Sumantri, C., Inounu, I., Akter, S. H., Aminul Islam, M., & Uddin, M. J. (2021). Hepatic transcriptome analysis identifies genes, polymorphisms and pathways involved in the fatty acids metabolism in sheep. *PLoS ONE*, 16(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260514>
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 90).
- Hausman, G. J., Basu, U., Wei, S., Hausman, D. B., & Dodson, M. V. (2014). Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals: Influence of species and anatomical location. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2,

- 323–351. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114211>
- Herman, M. A., & Kahn, B. B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 116, Issue 7, pp. 1767–1775). <https://doi.org/10.1172/JCI29027>
- 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 1. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4753>
- Joo, S. T., Hwang, Y. H., & Frank, D. (2017). Characteristics of Hanwoo cattle and health implications of consuming highly marbled Hanwoo beef. In *Meat Science* (Vol. 132, pp. 45–51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.262>
- Joseph, J., Robbins, K. R., Pavan, E., Pratt, S. L., & Duckett, S. K. (2010). Effect of Diet supplementation on the expression of Bovine Genes Associated with Fatty Acid synthesis and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 4–19. <http://www.la-press.com>.<http://www.la-press.com>.
- Jurie, C., Picard, B., & Geay, Y. (1998). Influences of the Method of Housing Bulls on Their Body Composition and Muscle Fibre Types. *Meat Science*, 50(4), 457–469.
- Kim, J. H., Park, J. M., Yea, K., Kim, H. W., Suh, P. G., & Ryu, S. H. (2010). Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009600>
- Ladeira, M. M., Santarosa, L. C., Chizzotti, M. L., Ramos, E. M., Neto, O. R. M., Oliveira, D. M., Carvalho, J. R. R., Lopes, L. S., & 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, M. 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). <https://doi.org/10.3390/ijms17060918>
- Ladeira, M. M., Schoonmaker, J. P., Swanson, K. C., Duckett, S. K., Gionbelli, M.

- P., Rodrigues, L. M., & Teixeira, P. D. (2018). Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 12(s2), s282–s294. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001933>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2019). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Research*, 47(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
- Liu, J., Liu, D., Hu, Z., Hu, Y., & Yu, X. (2024). TMT quantitative proteomics analysis reveals molecular mechanism of ferroptosis during beef refrigeration. *Food Chemistry*, 435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137596>
- Liu, Y. R., Hu, T. M., Lan, T. H., Chiu, H. J., Chang, Y. H., Chen, S. F., Yu, Y. H., Chen, C. C., & Loh, E. W. (2014). Association of the PPAR- γ 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., Machado Neto, O. R., Oliveira, H. N., Silva, J. A. I. v., Munari, D. P., & 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>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 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. *Aust. J. Agric. Res*, 48, 715–737. <https://doi.org/10.1071/AR96083>
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Aoyama, H., Yoshimochi, K., & Fukamizu, A. (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation (Vol. 102, Issue 32).

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0502738102

- Moore, K., Ekeren, P., Lunt, D., & Smith, S. (1991). Relationship between fatty acid-binding protein activity and marbling scores in bovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 69, 1515–1521. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/69/4/1515/4705596>
- Moreira, A. D., Siqueira, G. R., Lage, J. F., Benatti, J. M., Moretti, M. H., Miguel, G. Z., Oliveira, I. M., & Resende, F. D. (2018). Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. *Animal Production Science*, 58(7), 1307. <https://doi.org/10.1071/an16580>
- Mottram, D. S., & Edwards, R. A. (1983). The Role of Triglycerides and Phospholipids in the Aroma of Cooked Beef. In *J. Sci. Food Agric* (Vol. 34).
- Mueller, L. F., Balieiro, J. C. C., Ferrinho, A. M., Martins, T. da S., da Silva Corte, R. R. P., de Amorim, T. R., de Jesus Mangini Furlan, J., Baldi, F., & Pereira, A. S. C. (2019). Gender status effect on carcass and meat quality traits of feedlot Angus × Nelore cattle. *Animal Science Journal*, 90(8), 1078–1089. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13250>
- Mwangi, F. W., Charmley, E., Gardiner, C. P., Malau-Aduli, B. S., Kinobe, R. T., & Malau-Aduli, A. E. O. (2019). Diet and genetics influence beef cattle performance and meat quality characteristics. In *Foods* (Vol. 8, Issue 12). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8120648>
- 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>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger-Principles of Biochemistry*.
- Nguyen, D. V., Nguyen, O. C., & Malau-Aduli, A. E. O. (2021). Main regulatory factors of marbling level in beef cattle. *Veterinary and Animal Science*, 14, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100219>
- 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>
- Oh, D. Y., Lee, Y. S., & Yeo, J. S. (2011). Identification of the SNP (single

- necleotide polymorphism) of the stearoyl-CoA desaturase (SCD) associated with unsaturated fatty acid in Hanwoo (Korean cattle). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(6), 757–765.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10410>
- Oliveira de Biagi, C. A., Nociti, R. P., Brotto, D. B., Funicheli, B. O., Cássia Ruy, P. de, Bianchi Ximenez, J. P., Alves Figueiredo, D. L., & Araújo Silva, W. (2021). CeTF: an R/Bioconductor package for transcription factor co-expression networks using regulatory impact factors (RIF) and partial correlation and information (PCIT) analysis. *BMC Genomics*, 22(1), 624.
<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07918-2>
- Ouyang, H., Yao, C., Pang, D., Lu, C., Xu, A., Huang, P., & Yu, H. (2019). Data mining and validation of ampk pathway as a novel candidate role affecting intramuscular fat content in pigs. *Animals*, 9(4).
<https://doi.org/10.3390/ani9040137>
- Owens, F. N., Dubeski, P., & Hanson, C. F. (1993). Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science*, 71(11), 3138–3150. <https://doi.org/10.2527/1993.71113138X>
- Owens, F. N., Dubeski, P., & Hansont, C. F. (1993). Factors that Alter the Growth and Development of Ruminants. *Journal of Animal Science*, 71(3), 3138–3150.
- Park, S. J., Kang, H. J., Na, S., Lee, S. H., & Baik, M. (2018). Differential expression of extracellular matrix and integrin genes in the longissimus thoracis between bulls and steers and their association with intramuscular fat contents. *Meat Science*, 136, 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.008>
- Poletto, A. C., Furuya, D. T., David-Silva, A., Ebersbach-Silva, P., Corrêa-Giannella, M. L., Passarelli, M., & Machado, U. F. (2015). Oleic and linoleic fatty acids downregulate Slc2a4/GLUT4 expression via NFkB and SREBP1 in skeletal muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 401, 65–72.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.001>
- Qiao, L., & Shao, J. (2006). SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein α transcriptional complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39915–39924.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M607215200>

- Reddy, K. E., Jeong, J. Y., Lee, S. D., Baek, Y. C., Oh, Y. K., Kim, M., So, K. M., Kim, D. W., Kim, jae H., Park, S., & Lee, H. J. (2017). Effect of different early weaning regimens for calves on adipogenic gene expression in Hanwoo loin at the fattening stage. *Livestock Science*, 195, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.014>
- Ren, X., Fu, X., Zhang, X., Chen, S., Huang, S., Yao, L., & Liu, G. (2017a). Testosterone regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and epididymal fat accumulation in mice through modulating macrophage polarization. *Biochemical Pharmacology*, 140, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.022>
- Ren, X., Fu, X., Zhang, X., Chen, S., Huang, S., Yao, L., & Liu, G. (2017b). Testosterone regulates 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation and epididymal fat accumulation in mice through modulating macrophage polarization. *Biochemical Pharmacology*, 140, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.022>
- Reverter, A., & Chan, E. K. F. (2008). Combining partial correlation and an information theory approach to the reversed engineering of gene co-expression networks. *Bioinformatics*, 24(21), 2491–2497. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn482>
- Reverter, A., Hudson, N. J., Nagaraj, S. H., Pérez-Enciso, M., & Dalrymple, B. P. (2010). Regulatory impact factors: Unraveling the transcriptional regulation of complex traits from expression data. *Bioinformatics*, 26(7), 896–904. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq051>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rogne, M., & Taskén, K. (2014). Compartmentalization of cAMP signaling in adipogenesis, lipogenesis, and lipolysis. In *Hormone and Metabolic Research* (Vol. 46, Issue 12, pp. 833–840). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1389955>
- Santiago, B., Baldassini, W., Neto, O. M., Chardulo, L. A., Torres, R., Pereira, G., Curi, R., Chiaratti, M. R., Padilha, P., Alessandroni, L., & Gagaoua, M. (2023). Post-mortem muscle proteome of crossbred bulls and steers: Relationships with carcass and meat quality. *Journal of Proteomics*, 278, 104871.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.104871>

- Santiago, B. M., Baldassini, W. A., Chiaratti, M. R., Pandey, A. K., Torrecilhas, J. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, R. V., Lanna, D. P. D., Pereira, G. L., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., & Machado Neto, O. R. (2023a). Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nelore young steers and bulls feedlot finished. *Livestock Science*, 268, 105151. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105151>
- Santiago, B. M., Baldassini, W. A., Chiaratti, M. R., Pandey, A. K., Torrecilhas, J. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, R. V., Lanna, D. P. D., Pereira, G. L., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., & Machado Neto, O. R. (2023b). Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nelore young steers and bulls feedlot finished. *Livestock Science*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105151>
- Santos Silva, D. B. dos, Fonseca, L. F. S., Magalhães, A. F. B., Muniz, M. M. M., Baldi, F., Ferro, J. A., Chardulo, L. A. L., Pinheiro, D. G., & Albuquerque, L. G. de. (2020). Transcriptome profiling of muscle in Nelore cattle phenotypically divergent for the ribeye muscle area. *Genomics*, 112(2), 1257–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.012>
- Scheffler, T. L. (2022). Connecting Heat Tolerance and Tenderness in *Bos indicus* Influenced Cattle. In *Animals* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12030220>
- Schütz, L. F., Hemple, A. M., Morrell, B. C., Schreiber, N. B., Gilliam, J. N., Cortinovis, C., Totty, M. L., Caloni, F., Aad, P. Y., & Spicer, L. J. (2022). Changes in fibroblast growth factor receptors-1c, -2c, -3c, and -4 mRNA in granulosa and theca cells during ovarian follicular growth in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2022.106712>
- 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://academic.oup.com/jas/article-abstract/55/4/826/4632395>
- Severino, M., Gagaoua, M., Baldassini, W., Ribeiro, R., Torrecilhas, J., Pereira, G., Curi, R., Chardulo, L. A., Padilha, P., & Neto, O. M. (2022). Proteomics Unveils Post-Mortem Changes in Beef Muscle Proteins and Provides Insight

- into Variations in Meat Quality Traits of Crossbred Young Steers and Heifers Raised in Feedlot. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12259. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012259/S1>
- Sharma, S., Sun, X., Rafikov, R., Kumar, S., Hou, Y., Oishi, P. E., Datar, S. A., Raff, G., Fineman, J. R., & Black, S. M. (2012). PPAR- γ Regulates Carnitine Homeostasis and Mitochondrial Function in a Lamb Model of Increased Pulmonary Blood Flow. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041555>
- Shijun, L., Khan, R., Raza, S. H. A., Jieyun, H., Chugang, M., Kaster, N., Gong, C., Chunping, Z., Schreurs, N. M., & Linsen, Z. (2020). Function and characterization of the promoter region of perilipin 1 (PLIN1): Roles of E2F1, PLAG1, C/EBP β , and SMAD3 in bovine adipocytes. *Genomics*, 112(3), 2400–2409. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.012>
- Silva, L. H. P., Rodrigues, R. T. S., Assis, D. E. F., Benedeti, P. D. B., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.004>
- Sinha-Hikim, I., Roth, S. M., Lee, M. I., Bhasin, S., & Indrani, S.-H. (2003). Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285, 197–205. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00370.2002.-Testosterone>
- Smith, S. B., Clare, A. G., 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.
- Smith, S. B., Kawachi, H., Choi, C. B., Choi, C. W., Wu, G., & Sawyer, J. E. (2009). Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. In *Journal of animal science* (Vol. 87, Issue 14 Suppl). <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1340>
- Smith, S. B., Lunt, D. K., Chung, K. Y., Choi, C. B., Tume, R. K., & Zembayashi, M. (2006). Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. In *Animal Science Journal* (Vol. 77, Issue 5, pp. 478–486). <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00375.x>
- Smith, S. B., Prior, R. L., & Mersmann, H. J. (1983). Interrelationships between Insulin and Lipid Metabolism in Normal and Alloxan-Diabetic cattle. *Journal of*

- Nutrition, 113, 1002–1015.
- Song, Y., Zhang, J., Jiang, C., Song, X., Wu, H., Zhang, J., Raza, S. H. A., Zhang, L., Zhang, L., Cai, B., Wang, X., Reng, Z. L., Ma, Y., & Wei, D. (2023). FOXO1 regulates the formation of bovine fat by targeting CD36 and STEAP4. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248, 126025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126025>
- Sosa-Madrid, B. S., Varona, L., Blasco, A., Hernández, P., Casto-Rebollo, C., & Ibáñez-Escriche, N. (2020). The effect of divergent selection for intramuscular fat on the domestic rabbit genome. *Animal*, 14(11), 2225–2235. <https://doi.org/10.1017/S1751731120001263>
- Steinberg, S. J., Morgenthaler, J., Heinzer, A. K., Smith, K. D., & Watkins, P. A. (2000). Very long-chain acyl-CoA synthetases: Human “bubblegum” represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35162–35169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006403200>
- Subramanian, V., Rotlienber, A., Gomez, C., Cohen, A. W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M. P., & Brasaemle, D. L. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42062–42071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407462200>
- Tozzo, E., Shepherd, P. R., Gnudi, L., Kahn, B. B., & Thorndike, H. (1995). Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis. *Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 268(5), 956–964. www.physiology.org/journal/ajpendo
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- 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(2), 189–194. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2007.00424.x>
- Ulbricht, T. L. v., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease and dietary

factors.

- Wang, L., Li, L., Jiang, J., Wang, Y., Zhong, T., Chen, Y., Wang, Y., & Zhang, H. (2015). Molecular characterization and different expression patterns of the FABP gene family during goat skeletal muscle development. *Molecular Biology Reports*, 42(1), 201–207. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3759-4>
- Ward, R. E., Woodward, B., Otter, N., & Doran, O. (2010). Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle. *Livestock Science*, 127(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.09.005>
- Warren, H. E., Scollan, N. D., Enser, M., Hughes, S. I., Richardson, R. I., & Wood, J. D. (2008). Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Science*, 78(3), 256–269. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2007.06.008>
- 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. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0640>
- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C. H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., & Cantley, L. C. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Molecular Cell*, 49(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.035>
- Wu, W., Zhang, Z., Chao, Z., Li, B., Li, R., Jiang, A., Kim, K. H., & Liu, H. (2021). Transcriptome analysis reveals the genetic basis of skeletal muscle glycolytic potential based on a pig model. *Gene*, 766. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145157>
- Yamada, T., Kamiya, M., & Higuchi, M. (2020). Fat depot-specific effects of body fat distribution and adipocyte size on intramuscular fat accumulation in Wagyu cattle. *Animal Science Journal*, 91(1), e13449. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13449>
- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>

- Zhang, M., Zheng, D., Peng, Z., Zhu, Y., Li, R., Wu, Q., Li, Y., Li, H., Xu, W., Zhang, M., Hung, Q., & Sun, Y. (2021). Identification of differentially expressed genes and lipid metabolism signaling pathways between muscle and fat tissues in broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 58(2), 131–137. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0200040>
- Zhao, Y., Chen, Y. Q., Bonacci, T. M., Bredt, D. S., Li, S., Bensch, W. R., Moller, D. E., Kowala, M., Konrad, R. J., & Cao, G. (2008). Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8258–8265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710422200>
- Zhu, C., Wang, L., Nie, X., Yang, X., Gao, K., & Jiang, Z. (2023). Dietary dibutyril cAMP supplementation regulates the fat deposition in adipose tissues of finishing pigs via cAMP/PKA pathway. *Animal Biotechnology*, 34(4), 921–934. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2003373>
- Zou, P., Liu, L., Zheng, L., Liu, L., Stoneman, R. E., Cho, A., Emery, A., Gilbert, E. R., & Cheng, Z. (2014). Targeting FoxO1 with AS1842856 suppresses adipogenesis. *Cell Cycle*, 13(23), 3759–3767. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.965977>

10 CAPÍTULO 3 – QUALIDADE DA CARNE E PROTEOMA DO MÚSCULO DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE, SUPERPRECOSES DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS

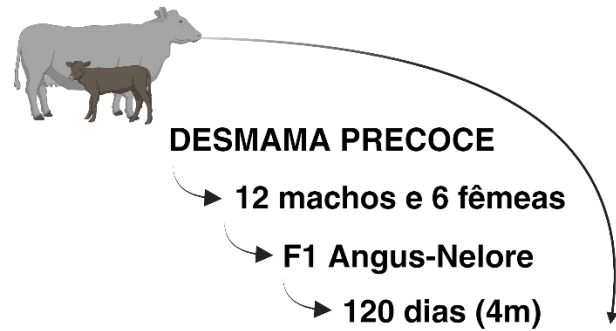
RESUMO - O estudo investigou o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, composição química e proteoma do músculo *Longissimus thoracis* (LT) de bovinos F1 Angus-Nelore. Dezoito bezerros (seis fêmeas e doze machos) foram desmamados aos 120 dias de idade e condicionados em um sistema de confinamento de 230 dias. Os tratamentos consistiram em três classes sexuais: seis machos não castrados (inteiro), seis machos selecionados aleatoriamente para imunocastração (castrado) e seis fêmeas imunocastradas (novilha). O protocolo de imunocastração consistiu em três doses da vacina anti-GnRH aplicadas aos 250, 280 e 370 dias de idade. Após 230 dias de experimento (480 dias de idade em média) os animais foram abatidos em frigorífico comercial para as mensurações de características de carcaça. Logo após o abate (carcaça quente) foram coletadas amostras do músculo LT para a análise de biologia molecular (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas). E, amostras do LT entre a 12^a e 13^a vertebrae torácicas foram coletadas na desossa para as análises químicas e físicas da carne. Observou-se maior peso de carcaça quente e área de olho de lombo para machos inteiros ($p<0,05$) em comparação aos machos castrados e novilhas. A deposição de gordura intramuscular (GIM) foi maior em machos castrados e novilhas em comparação aos inteiros ($p<0,05$). Novilhas apresentaram maior grau de maciez da carne ($p<0,05$) em comparação aos machos do estudo. O estudo do proteoma no músculo LT mostrou maior abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético (*ALB*, *PGM1*, *GAPDH*, *PGAM2*, *ENO3*, *LDHA*) em machos castrados e novilhas em comparação aos machos inteiros, que estão associadas a maior potencial glicolítico e sugere maior deposição de GIM nesses animais. Maior abundância de proteínas ligadas a estrutura e contração muscular (*ACTA1*, *ACTB*, *ANXA2*) metabolismo energético e oxidativo (*TPI1*, *CKM*, *PRDX6*, *MDH2*) indicaram maior associação com a maciez da carne, comparado aos machos do estudo. Novilhas apresentam carne com melhores características de qualidade de carne e suas respostas foram justificadas por meio do proteoma do tecido muscular, podendo ser alternativas interessantes com foco em mercado de carnes com valor agregado.

Palavras-chave: classe sexual, imunocastração, *Longissimus thoracis*, maciez da carne, marmoreio, proteômica, superprecoce

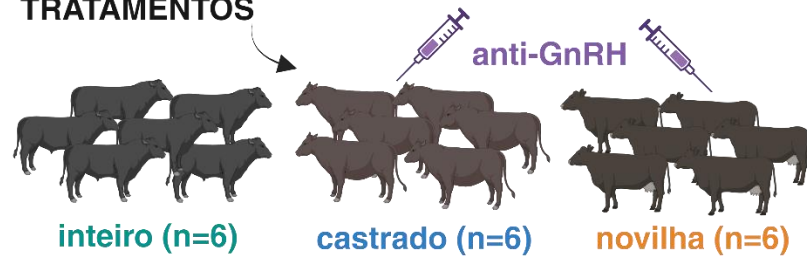
CHAPTER 3 - MEAT QUALITY AND MUSCLE PROTEOME OF SUPER EARLY F1 ANGUS-NELORE CATTLES OF DIFFERENT GENDER STATUS

ABSTRACT – The study investigated the effect of gender status on carcass characteristics, chemical composition and proteome of the Longissimus thoracis (LT) muscle of F1 Angus-Nelore cattle. Eighteen calves (six females and twelve males) were weaned at 120 days of age and conditioned in a confinement system for 230 days. Treatments consisted of three sex classes: six uncastrated males (bulls), six males randomly selected for immunocastration (steers) and six immunocastrated females (heifers). The immunocastration protocol consisted of three doses of the anti-GnRH vaccine applied at 250, 280 and 370 days of age. After 230 days of experiment (480 days of age on average), the animals were slaughtered in a commercial slaughterhouse to measure carcass characteristics. Shortly after slaughter (hot carcass), samples of the LT muscle were collected for molecular biology analysis (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry). And, samples from the LT between the 12th and 13th ribs were collected during boning for chemical and physical analyzes of the meat. Greater hot carcass weight and rib eye area were observed for intact males ($p < 0.05$) compared to castrated males and heifers. Intramuscular fat deposition (IFM) was greater in castrated males and heifers compared to intact ones ($p < 0.05$). Heifers had a higher degree of meat tenderness ($p < 0.05$) compared to the males in the study. The study of the proteome in the LT muscle showed a greater abundance of proteins related to energy metabolism (*ALB*, *PGM1*, *GAPDH*, *PGAM2*, *ENO3*, *LDHA*) in castrated males and heifers compared to intact males, which are associated with greater glycolytic potential and suggests greater GIM deposition in these animals. Greater abundance of proteins linked to muscle structure and contraction (*ACTA1*, *ACTB*, *ANXA2*) and energetic and oxidative metabolism (*TPI1*, *CKM*, *PRDX6*, *MDH2*) indicated a greater association with meat tenderness, compared to the males in the study. Heifers present meat with better meat quality characteristics and their responses were justified through the muscle tissue proteome, and could be interesting alternatives focused on the value-added meat market.

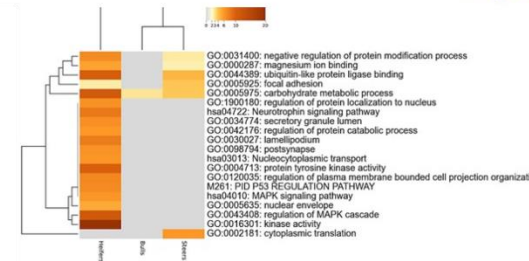
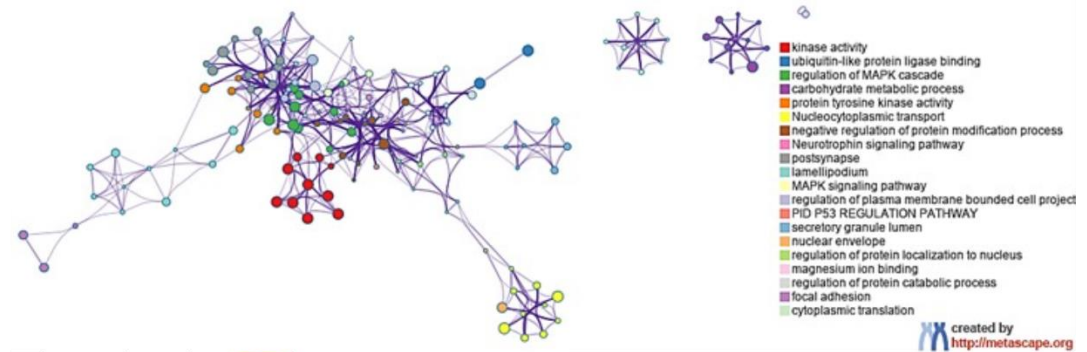
Keywords: enrichment, gene expression, immunocastration *longissimus thoracis*, marbling, sex class



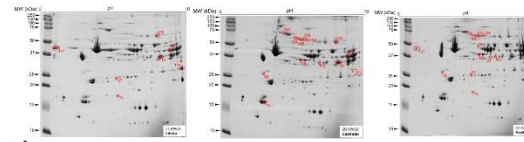
TRATAMENTOS



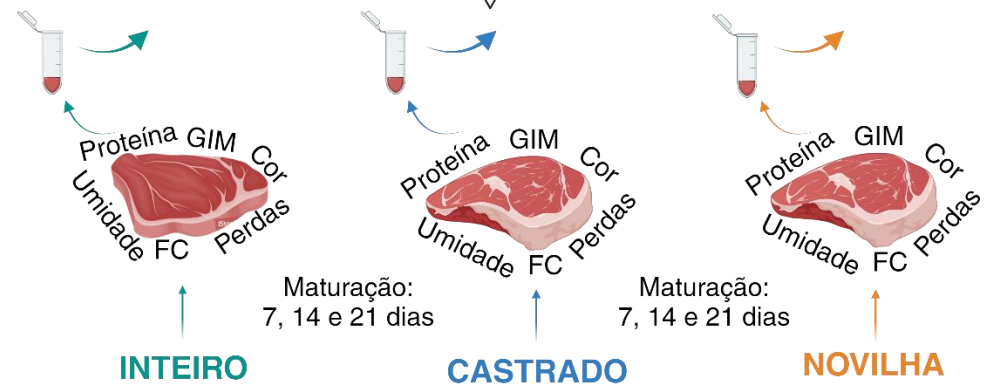
TERMINAÇÃO INTENSIVA



Proteínas separadas por eletroforese bidimensional



Comparação e identificação das proteínas



11 INTRODUÇÃO

A classe sexual afeta o ganho de peso, composição corporal, características de carcaça e a qualidade da carne (Bures and Barton 2012; Cafferky et al. 2019; Blanco et al. 2020). A busca por melhores características de qualidade de carne tem colocado em discussão a castração como tema em diversos estudos (Santiago et al., 2023; Severino et al., 2022; Silva et al., 2019). Além disso, a população na última década tem mudado os hábitos de alimentação e, por isso, a demanda por produtos cárneos com alto valor nutricional e características de qualidade são fatores que influenciam o poder de compra do consumidor (Mwangi et al., 2019) e desenvolvimento da indústria da carne bovina (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021).

Alguns estudos da castração em bovinos cruzados (*Bos Taurus x Bos indicus*) terminados em confinamento mostraram que esta prática é capaz de melhorar a gordura da carcaça e algumas características de qualidade da carne, como cor, maciez e gordura de marmoreio (Santiago et al., 2023; Santiago et al., 2023a). Contudo, são escassos os estudos que investigaram os mecanismos bioquímicos e moleculares responsáveis pela regulação dessas características, principalmente com a utilização de novilhas submetidas a castração. Além disso, poucos estudos abordaram essas características em animais superprecoces (<24 meses) e submetidos a terminação intensiva por período próximo a 230 dias, o que reforça a necessidade de mais avaliações com esse modelo biológico.

Dessa forma, a investigação através de análise molecular tem sido utilizada na ciência da carne para explorar modelos biológicos que controlam uma característica de interesse e possibilitar o entendimento da ocorrência do fenótipo (Picard et al., 2019), como por exemplo a proteômica, que consiste na caracterização das proteínas constituintes do tecido muscular que são responsáveis pela regulação dos mecanismos bioquímicos e moleculares (Lana & Zolla, 2016).

Nossa hipótese é de que machos inteiros, quando confinados por período de 230 dias, apresentem carne com características de qualidade semelhantes à de bovinos castrados e novilhas. E, que essas respostas podem ser explicadas

através da análise no proteoma do tecido muscular. Diante disso, nosso objetivo foi investigar o efeito da classe sexual sobre as características de carcaça, composição química, características físicas e proteoma do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros, castrados e novilhas F1 Angus-nelore, superprecoces e terminados em confinamento por 230 dias.

12 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos seguiram os padrões éticos de pesquisa, estabelecidos pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP (protocolo nº 0208/2019).

12.1 Animais e tratamentos

O estudo foi conduzido no Confinamento Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, no período de outubro de 2019 a junho de 2020. Foram utilizados dezoito animais cruzados, F1 Angus-Nelore, meios-irmãos, com 8 meses de idade média. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (classes sexuais): seis machos não castrados (inteiro), seis machos (castrado) e seis fêmeas (novilhas) submetidos a imunocastração. Para a imunocastração dos machos, foram selecionados seis bezerros aleatoriamente. O protocolo de imunocastração consistiu em três doses da vacina anti-GnRH (Bopriva®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinária LTDA, São Paulo, SP, Brasil) aplicadas por via subcutânea do lado esquerdo dos animais aos 250, 280 e 370 dias de idade (D0, D0+30 e D0+120 de acordo com a recomendação do fabricante).

No período pré-experimental (130 dias), os bezerros foram desmamados precocemente aos 120 dias de idade, identificados e vacinados de acordo com o manejo sanitário de entrada dos animais no confinamento. Foram alojados em baia coletiva (20 m x 30 m) com bebedouro tipo cincho onde permaneceram juntos até o início do experimento. Durante o período pré-experimental, os bezerros receberam uma dieta de crescimento (Crescimento-1, Tabela 1) até o início do experimento.

No período experimental (230 dias), os animais foram separados em baias (20 m x 10 m) de acordo com os tratamentos (6 animais/baia). O peso corporal inicial foi de 292 ± 27 , 289 ± 26 e 241 ± 34 kg para machos não castrados, castrados e novilhas, respectivamente. Durante o período experimental, os animais receberam duas dietas, sendo uma de crescimento e outra de terminação (Crescimento-2 e Terminação, Tabela 1) por 110 e 120 dias, respectivamente. A dieta foi fornecida às 10:00h e às 16:00h, e as quantidades ajustadas diariamente de acordo com as sobras.

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas fornecidas durante os períodos de pré-experimento e experimento.

Item	Pré-experimento	Experimento	
	Crescimento-1	Crescimento-2	Terminação
Ingredientes (%MS)			
Feno <i>Coast-Cross</i> Moído	15.0	10.0	4.0
Bagaço de Cana <i>in natura</i>	15.0	10.0	11.0
Milho Moído	30.9	60.9	67.9
Farelo de Soja	12.7	16.0	13.8
Caroço de Algodão	17.5	-	-
Núcleo Mineral e Vitamínico	8.9	3.1	3.3
Composição Nutricional (%MS)			
Proteína Bruta	16.2	14.4	13.4
Extrato Etéreo	2.1	3.0	3.2
Nutrientes Digestíveis Totais	64.8	75.1	76.5
Núcleo Mineral e Vitamínico (g/kg)			
Cálcio	30.5	7.0	7.0
Fósforo	6.0	3.4	3.4
Sódio	4.0	2.0	2.1
Potássio	7.5	8.7	8.7
Magnésio	4.0	3.7	3.6
Enxofre	3.6	6.0	6.0
Núcleo Mineral e Vitamínico (mg/kg)			
Manganês	100	38.3	38.3
Zinco	128	59.4	59.4
Cobre	35	14.5	14.5
Cobalto	2.6	0.9	0.9
Iodo	2.6	0.6	0.6
Selênio	0.5	0.2	0.2
Núcleo Mineral e Vitamínico (UI/kg)			
Vitamina A	10000	1206	1231
Vitamina D	1400	576	576
Vitamina E	100	46.5	46.5

12.2 Abate, amostragem e características de carcaça

Após 230 dias de experimento, os animais foram submetidos a duas pesagens diárias consecutivas sem jejum hídrico e alimentar para obtenção do peso corporal final. O peso corporal em jejum foi estimado pela média das duas pesagens x 0,96 de acordo com o NRC (2000). Em seguida, os animais foram transportados para um abatedouro comercial (Frigorífico Cowpig, Boituva, São Paulo, Brasil), localizado a 120 km do confinamento experimental, e tiveram livre acesso a água. No dia seguinte, os animais foram abatidos de acordo o Regulamento de Inspeção Sanitária e Industrial de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1997).

As carcaças foram divididas longitudinalmente e amostras do músculo *Longissimus thoracis* (aproximadamente 20 g) foram coletadas da meia carcaça direita entre a 12° e 13° costela e armazenadas em N líquido seguido de ultra freezer a -80°C até o início das análises. As carcaças foram pesadas para obtenção do peso de carcaça quente (PCQ) e do rendimento de carcaça (RC) de acordo com a seguinte equação: $RC = PCQ / PCF \times 100$. Posteriormente, as carcaças foram lavadas e resfriadas em câmara fria por 48 h a 4°C.

Após 48 h de resfriamento as meias carcaças direitas foram seccionadas entre a 12ª e 13ª vertebrae torácicas (antes da desossa) para a mensuração da área de olho de lombo (AOL) e a espessura de gordura subcutânea (EGS) do músculo LT. A AOL foi registrada em plástico transparente, digitalizadas e analisadas com auxílio do software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA). A EGS foi determinada com paquímetro digital e apresentada em milímetros (mm).

Após a desossa uma porção do LT com aproximadamente 11 cm de comprimento, a partir do ponto de secção citado anteriormente e no sentido cranial, foi retirada, identificada, embalada individualmente a vácuo e transportada para o laboratório de qualidade de carne (MeatLab, Unesp – Botucatu). As amostras foram seccionadas em 4 bifos de 2,54 cm de espessura para as análises químicas e físicas.

12.3 Composição química

A composição química do músculo LT foi realizada por espectroscopia de infravermelho para determinar os valores médios de proteína, gordura e colágeno total. Os bifes foram descongelados em modelo BOD (MA 415, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 24 horas. Posteriormente, foram removidos os tecidos conjuntivos visíveis e gordura subcutânea dos bifes. Em seguida, os bifes foram moídos e homogeneizados por 5 minutos em misturador. Logo, aproximadamente 180 g da amostra foram distribuídos uniformemente na placa de leitura FoodScan Lab™ (Foss NIRSystems, Inc., EUA) (Anderson et al., 2007) realizadas três leituras por amostra, onde a cada leitura as amostras foram homogeneizadas novamente. O método de AOAC (2005) foi utilizado para determinar as cinzas.

12.4 Análises físicas e maturação

Três bifes foram embalados a vácuo em sacos individuais de polietileno e maturados por 7, 14 e 21 dias em incubadora BOD modelo MA 415 (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) conduzida à temperatura de 0 a 2°C. Após atingir o período de maturação as amostras foram retiradas da geladeira e expostas ao oxigênio por 30 min a 4°C para floração da carne.

pH e coloração instrumental

O pH foi medido usando um peagâmetro digital Hanna (Modelo HI 99163, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA) com sonda de penetração. O peagâmetro foi calibrado usando tampões padrão de pH 4,0 e 7,0.

Em seguida, a coloração da carne (L^* = luminosidade, a^* = intensidade vermelha, b^* = intensidade amarela) foi medida usando o sistema CIELab do colorímetro CR-400 (luminante A, ângulo de absorção 10, Y, 0,01 em 160% de refletância, Konica Minolta Sensing, Tóquio, Japão). O colorímetro foi calibrado com placa padrão em preto e branco e três leituras de cores foram tomadas na superfície da amostra e calculou-se as médias para cada variável (L^* , a^* e b^*), conforme Cañeque et al. (2004) e Baldassini et al. (2017).

Com base nos resultados mensurados, calculou-se os índices colorimétricos de croma (quantidade de cor ou saturação) e matiz (cor real), seguindo equações descritas por Cañeque et al. (2004).

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

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

Perda por cocção e força de cisalhamento

Para a mensuração da perda por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC) adotou-se o procedimento proposto por Wheeler et al. (1994) e recomendações da American Meat Science Association (AMSA, 2015). Os bifes foram colocados sob uma grade metálica e um refratário de vidro de peso conhecido e pesadas. Em seguida, foram assados em forno industrial elétrico modelo Feri90 Venâncio (Venâncio Aires, Rio Grande do Sul, Brasil), pré-aquecido a 170 °C e equipado com termostato para minimizar variações na temperatura. Um termômetro digital modelo DT-612 (ATP Instrumentation, Ashby-de-la-Zouch, UK) foi utilizado para monitorar a temperatura interna das amostras. Quando a temperatura interna do bife atingia 40°C a amostra era virada e retirada do forno ao atingir a temperatura interna de 71°C, conforme metodologia descrita por Wheeler et al. (1996). Posteriormente, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, pesadas e refrigeradas a 4°C por 24 horas. As PPC foram obtidas pela diferença de peso pré e pós cozimento.

Para a mensuração da FC, 8 cilindros com 1,27 cm de diâmetro foram retirados no sentido paralelo à fibra muscular por meio de um vazador acoplado a uma broca industrial. Os cilindros foram seccionados em equipamento Brookfield CT-3 Texture Analyzer (AMETEK Brookfield, Middleborough, MA, USA). Os resultados foram apresentados em quilograma-força (kgf) e a média de oito valores por amostra foi utilizada.

12.5 Proteoma do tecido muscular

Para a análise do proteoma, utilizou-se amostras do músculo *Longissimus thoracis* de todos os animais referente as classes sexuais (6 inteiros, 6 castrados e 6 novilhas).

Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada seguindo procedimentos previamente descritos por Poleti et al. (2018). Aproximadamente 0,5 g de músculo congelado foram homogeneizados em 5 mL de tampão de lise contendo 8 M de uréia, 2 M de Tiourea, 1% de Ditionitrito (DTT), 2% de CHAPS e 1% de coquetéis inibidores de protease (Sigma-Aldrich) em homogeneizador Ultra-Turrax (Marconi – MA102/E, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Os extratos foram agitados vigorosamente por 30 min em gelo e centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração total de proteína determinada em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) utilizando o kit PlusOne 2-D Quant (GE Healthcare Product, código 80-6483-56) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80°C até serem necessárias para análises adicionais.

Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)

Tiras lineares isoeletricas (gradiente pH 3-10, 13cm) foram hidratadas por 14 horas com uma alíquota de 400 µg de proteína extraída do músculo e solubilizada no volume final de 250 µl de uma solução de reidratação ("DeStreak": 7M Uréia, 2 M Tiourea, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol – Amersham Bioscience) acrescida de 0,5% de tampão de IPG pH 3-10 e 1% inibidores de protease (Amersham Bioscience). A reidratação das tiras foi passiva e a temperatura ambiente dentro do IPG Box (GE Healthcare).

Posteriormente, as tiras foram submetidas à focalização isoeletrica no aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) a temperatura de 20°C por aproximadamente 5:30 h. O programa constituiu de corrente de 50 µA/tira e diferentes voltagens. O perfil utilizado de voltagem foi: 500 V por 500 Vh, gradiente 1000 V por 800 Vh, gradiente 8000 V por 11300 Vh e a fase final de 8000 V por 7000 Vh. O produto total de tempo x voltagem foi de 19.603 Vh.

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

Depois do equilíbrio, as tiras e o marcador de peso molecular (10-250 kDa), aplicado em pequenos retângulos de papel de filtro para blotting, foram sobrepostos ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) para segunda dimensão conforme descrito por Baldassini et al. (2015). Ambos foram fixados sobre o gel com uma solução selante de agarose (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol). O tampão de corrida utilizado foi de Laemmli (1970) 1x concentrado para o anodo (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS) e 3 x concentrado para o catodo.

Ao término, os géis foram corados por meio do procedimento de coloração Coomassie G-250 *colloidal*, que consiste numa etapa de fixação das proteínas no gel em 40% etanol e 10% ácido acético por 30 min e, posteriormente, na coloração com solução corante (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% de azul de coomassie G-250, 20% Metanol) overnight. Para visualização dos *spots* o excesso do corante foi retirado por meio de lavagens com água destilada.

Análise de imagens

Os géis foram escaneados no Image Scanner III (GE Healthcare) e as imagens foram analisadas no software Image Master 2D Platinum v. 7.0 (Healthcare Illinois, Estados Unidos). 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.

A quantidade de proteína de cada *spot* foi expressa como volume, isto é, a soma da intensidade de pixels dentro da área do *spot*. Para avaliar as diferenças na quantidade de cada *spot* foi utilizado o volume relativo (% volume), o qual é um valor normalizado que permanece relativamente independente de variações.

Após a detecção dos *spots* foram realizadas automaticamente análises de comparação “*Match*”, isto é, avaliar se o *spot* presente em um gel é correspondente em outro gel. Primeiramente, foram sobrepostas e comparadas imagens pertencentes à mesma amostra, e posteriormente, as imagens de

amostras diferentes. Logo em seguida, toda a análise de comparação foi conferida manualmente.

Espectrometria de massas (ESI-MS/MS)

Após a análise das imagens, os *spots* proteicos diferencialmente abundantes (entre as classes sexuais) foram cortados do gel em segmentos de 1 mm e transferidos em microtubos contendo 1 mL de ácido acético 5% (v/v). Os *spots* foram submetidos as etapas de remoção do corante, redução e alquilação de proteínas e digestão trípica com solução de tripsina. A digestão trípica dos *spots* foi realizada utilizando kit comercial específico (In-Gel DigestZP). As sequências dos peptídeos foram obtidas por digestão trípica e caracterizadas por ESI-MS/MS (Shevchenko et al., 2007). 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 taurus*.

Bioinformática

Análises bioinformáticas foram realizadas para classificar as proteínas diferencialmente abundantes no *Longissimus thoracis* em termos de processos biológicos (PB), função molecular (FM) e componentes celulares (CC). Para isso, o número de acesso das proteínas identificadas por ESI/MS/MS foi inserido no banco de dados UniProt (www.uniprot.org) e suas sequências FASTA foram extraídas. Após essa etapa, as proteínas foram analisadas por meio do OMICSBOX v.2.0 (<https://www.biobam.com/omicsbox/>) e das ferramentas Blast2GO (Götz et al., 2008).

Em seguida, a ferramenta de código aberto Metascape® (<https://metascape.org/>) foi usada para identificar os principais termos de ontologia genética enriquecida (GO) entre as listas de proteínas seguindo os procedimentos descritos (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021). Como a taxonomia de *Bos taurus* não está disponível no Metascape®, os ortólogos do *Homo sapiens* foram recuperados usando o HCOP (<http://www.genenames.org/tools/hcop/>). O agrupamento de mapa de calor hierárquico comparando os termos GO significativamente enriquecidos foi realizado. A sobreposição dos três proteomas

também foi investigada com um gráfico circos, que ilustra o grau de sobreposição entre listas de proteínas das classes sexuais.

Uma análise bioinformática adicional entre as proteínas identificadas foi realizada usando o banco de dados STRING (Search Tool for Retrieval of Interacting Genes, v. 11.0 – <https://string-db.org/>). Uma rede de interação proteína-proteína relacionando as proteínas diferenciais de acordo com as vias a que pertencem foi gerada.

12.6 Análises estatísticas

Os dados de características de carcaça, composição química e física da carne foram submetidos a análise de normalidade dos resíduos por meio do teste Shapiro-Wilk, PROC UNIVARIATE do software estatístico SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram alinhados usando o procedimento PROC RANKS (SAS 9.4). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados utilizando o procedimento PROC MIXED (SAS 9.4) para as variáveis de características de carcaça e composição química da carne, sendo o animal a unidade experimental. Para as variáveis físicas da carne o efeito do tempo de maturação foi considerado, e os dados analisados como medida repetida no tempo. Quando encontrado os efeitos entre as classes sexuais o teste Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre as médias ($P \leq 0,05$).

$$Y_{ij} = \mu + \text{csi} + \varepsilon_{ij},$$

Onde: μ = média geral, csi = efeito da classe sexual, ε_{ij} = é o erro experimental.

Os dados de representação de proteínas foram analisados utilizando Image Master Platinum 2D v. 7.0 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Os dados do volume *spot* foram testados quanto à homogeneidade das variâncias e normalidade usando os testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Posteriormente, as diferenças nas médias entre os tratamentos foram analisadas através do teste tukey. Além disso, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado quando os critérios de normalidade foram violados em algum dos tratamentos. Para ambos os testes foi considerada significância quando $p \leq 0,05$.

13 RESULTADOS

13.1 Características de carcaça

A classe sexual influenciou as características de carcaça em animais F1 Angus-Nelore ($p < 0,05$; Tabela 2). A imunocastração em machos reduziu o peso de carcaça quente (PCQ) em 12% e área de olho de lombo (AOL) em 14% comparado aos machos inteiros. As novilhas imunocastradas obtiveram menor peso de carcaça quente (PCQ) comparado aos machos inteiros e castrados, em 23% e 13%, respectivamente. Por outro lado, a espessura de gordura subcutânea (EGS) em novilhas foi 5,8 mm maior em comparação com os machos inteiros e castrados ($p < .0001$; Tabela 2).

Tabela 2. Características de carcaça de machos inteiros, castrados e novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p < 0,05$).

Variável ¹	Classe sexual			EPM ²	p-valor
	Inteiro	Castrado	Novilha		
PCQ, kg	353a	310b	271c	9.308	<.0001
RCQ, %	58.9	58.4	57.6	0.397	0.3815
AOL, cm ²	88.5a	76.4b	70.9b	2.168	0.0004
AOL cm ² /100 kg PCQ	25.1	24.7	26.2	0.526	0.6602
EGS, mm	9.4b	12.1b	16.6a	0.855	<.0001

As médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹PCQ: peso em carcaça quente, RC: rendimento de carcaça quente, AOL: área de olho de lombo, AOL/100 kg PCQ: área de olho de lombo cm² / 100 kg de PCQ; EGS: espessura de gordura subcutânea. ²EPM: Erro padrão da média.

13.2 Composição química da carne

Houve efeito da classe sexual sobre a composição química da carne nos animais ($p < 0,05$; Tabela 3). Machos e fêmeas imunocastrados apresentaram maior teor de gordura intramuscular ($p < .0001$; Figura 1) comparado aos machos inteiros, em aproximadamente 121%. No entanto, o teor de umidade na carne teve resposta oposta ($p < .0001$; Tabela 3). Os teores de proteína, cinzas e colágeno não foram afetados pelas classes sexuais ($p > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Composição química do *Longissimus thoracis* de machos inteiros, castrados e novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p<0,05$).

Variáveis (%)	Classe sexual			EPM ¹	p-valor
	Inteiro	Castrado	Novilha		
Umidade	72.5a	69.3b	69.0b	0.426	<.0001
Proteína	22.2	21.8	22.3	0.116	0.4634
Gordura	2.9b	6.5a	6.3a	0.480	<.0001
Cinzas	1.1	1.1	1.1	0.012	0.8026
Colágeno	1.3	1.3	1.3	0.038	0.7558

As médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p<0,05$). ¹EPM: Erro padrão da média.

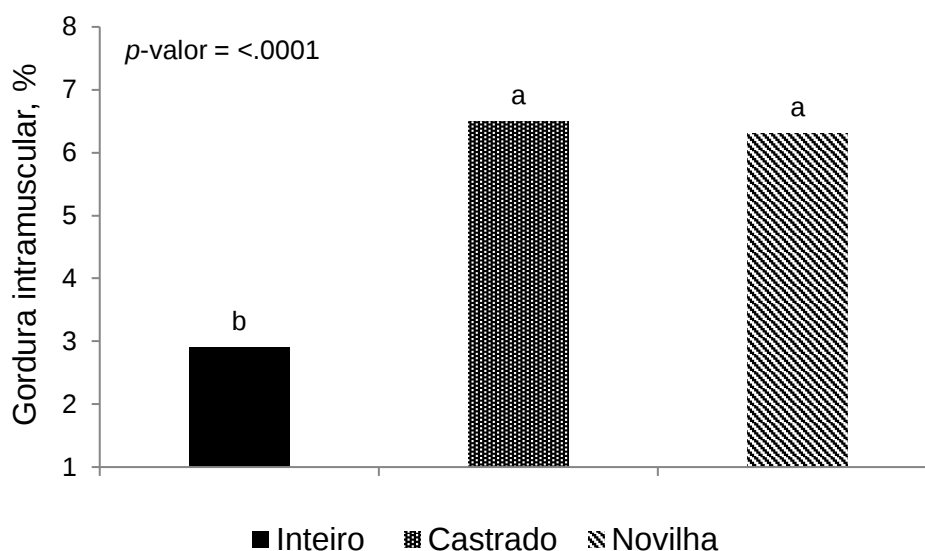


Figura 1. Teor de gordura intramuscular do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros, castrados e novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p<0,05$).

13.3 Características físicas da carne

Não houve interação entre a classe sexual e os tempos de maturação sobre as variáveis físicas da carne ($p>0,05$). Houve efeito da classe sexual ($p=0,0002$) e dos tempos de maturação ($p<.0001$) sobre a força de cisalhamento

(FC) na carne dos animais (Figura 3). Menores valores de força de cisalhamento foram obtidos nos bifes de novilhas em comparação aos machos, independente dos tempos de maturação (Figura 2). Não houve efeito da imunocastração em machos sobre a força de cisalhamento. A força de cisalhamento sofreu efeito de dias de maturação, no qual, os bifes maturados aos 21 dias apresentaram menores valores comparados aos 14 e 7 dias, respectivamente, independente das classes sexuais (Figura 2).

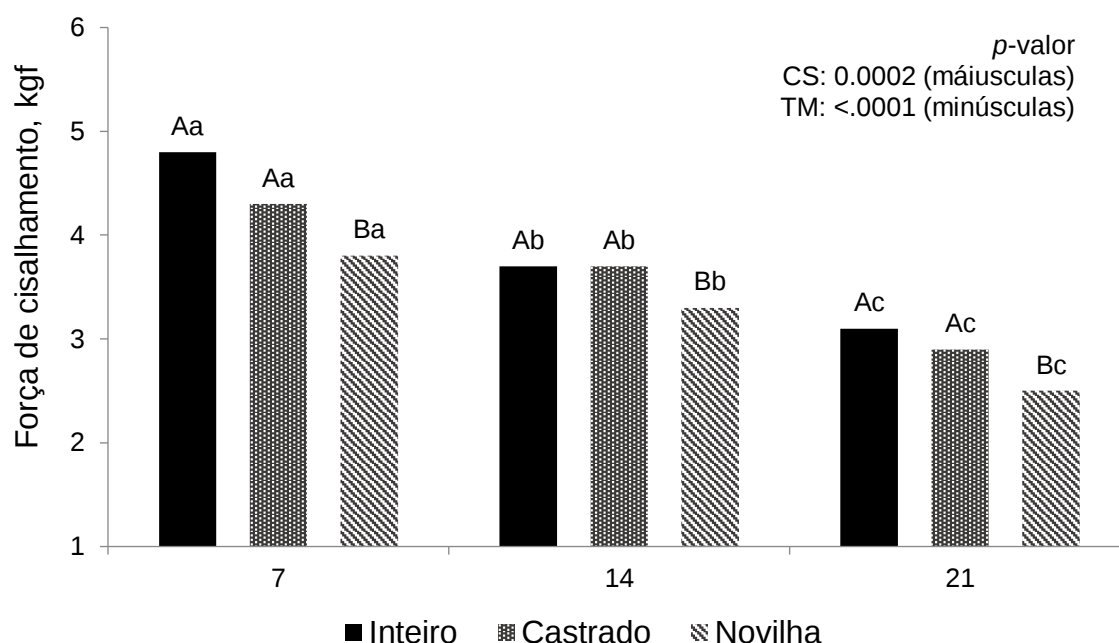


Figura 2. Força de cisalhamento em três tempos de maturação (7, 14 e 21 dias *post mortem*) de machos inteiros e castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p < 0,05$). CS: classe sexual TM: tempo de maturação

Houve efeito dos tempos de maturação sobre a perda por cocção (PPC) ($p < 0,0006$; Tabela 4). Bifes maturados aos 7 e 14 dias apresentaram menores PPC comparados aos bifes maturados aos 21 dias. Bifes assados aos 21 dias de maturação apresentaram 3,2% a mais de perdas por cocção comparada aos bifes assados aos 7 e 14 dias de maturação. O pH da carne também foi alterado de acordo com os tempos de maturação ($p < 0,0143$; Tabela 4), sendo as maiores mensurações observadas aos 21 dias e as menores aos 7 dias de maturação.

Em relação as variáveis de cor da carne, os valores de a^* ($p < 0,0001$) e matiz ($p < 0,0018$) foram afetados pelos tempos de maturação (Tabela 4). E, os valores

de croma foram influenciados tanto pelos tempos de maturação ($p < 0,0004$ quanto pelas classes sexuais ($p < 0,0084$) (Tabela 4). Os valores de a^* foram maiores aos 7 e 21 dias de maturação (média de 16,5) e os menores valores observados aos 14 dias (média de 14,8). A mesma resposta contrária foi observada para a variável matiz, sendo os menores valores observados aos 7 e 21 dias (média de 21,9) e os maiores aos 14 dias de maturação (média de 24,5) (Tabela 4). A imunocastração em machos propiciou maiores valores de croma comparado as novilhas, sendo os maiores valores observados aos 7 e 21 dias e os menores aos 14 dias de maturação (independente das classes sexuais) (Tabela 4).

Tabela 4. Características de cor, pH, Perda por cocção e força de cisalhamento do músculo *Longissimus thoracis* em três tempos de maturação (7, 14 e 21 dias *pós mortem*) de machos inteiros, castrados e novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces ($p < 0,05$).

Item ¹	Inteiro			Castrado			Novilha			EPM ²	<i>p</i> -valor		
	7d	14d	21d	7d	14d	21d	7d	14d	21d		CS ³	TM ⁴	CSxTM ⁵
pH	5.4b	5.5ab	5.6a	5.4b	5.3ab	5.5a	5.4b	5.5ab	5.6a	0.134	0.2048	0.0143	0.9120
L*	35.3	36.3	35.8	36.6	37.5	38.7	35.9	37.2	38.4	0.403	0.1944	0.2381	0.9111
a*	15.6a	15.2b	17.0a	17.1a	14.9b	17.4a	16.1a	14.3b	15.6a	0.235	0.0857	<.0001	0.4718
b*	6.1	6.5	6.8	6.9	6.8	6.7	6.5	6.7	6.6	0.089	0.0831	0.2846	0.6979
Croma	18ABa	16ABb	18ABa	18Aa	17Ab	18Aa	17Ba	16Bb	17Ba	0.198	0.0084	0.0004	0.9748
Matiz	21.1b	24.3a	21.6b	21.8b	23.7a	22.2b	22.1b	25.3a	22.3b	0.315	0.5983	0.0018	0.9368
PPC, %	24.9b	24.4b	29.7a	25.3b	27.1b	27.4a	26.1b	25.5b	28.9a	0.394	0.8445	0.0006	0.1739
FC, kgf	4.8Aa	3.7Ab	3.1Ac	4.3Aa	3.7Ab	2.9Ac	3.8Ba	3.3Bb	2.5Bc	0.107	0.0002	<.0001	0.4918

As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre as classes sexuais e minúsculas entre os tempos de maturação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹pH: potencial hidrogeniônico; L*: Luminosidade; a*: Intensidade de vermelho; b*: Intensidade de amarelo; PPC: Perda por cocção; FC: Força de cisalhamento.

²EPM: Erro padrão da média; ³CS: Classe sexual; ⁴TM: tempo de maturação; ⁵CSxTM: classe sexual x tempos de maturação (7, 14 e 21 dias *post mortem*).

13.4 Proteoma do tecido muscular

O número médio de *spots* proteicos detectados nas classes sexuais foi de 212 ± 23 , 193 ± 28 e 227 ± 38 para os machos inteiros, castrados e novilhas, respectivamente. O número de *spots* dos géis referência foi de 241 para machos inteiros, 233 para machos castrados e 277 para as novilhas. Desse total, em 20 *spots* foram detectadas 59 proteínas diferencialmente abundantes por meio da análise de comparação (análise de “Match”) ($p < 0,05$). Os *spots* diferencialmente abundantes estão representados nas figuras 3, 4 e 5 para os machos inteiros, castrados e novilhas, respectivamente.

Diferentes isoformas da mesma proteína foram identificadas em mais de um *spot* e com isso estavam presentes em mais de uma classe sexual. Ou seja, a mesma proteína pode ter sido diferencialmente abundante em uma, ou, mais de uma classe sexual.

Nesse sentido, dentre as 58 proteínas diferencialmente abundantes identificadas, 22 proteínas foram abundantes tanto em machos castrados quanto novilhas em comparação aos machos inteiros. Outras 10 proteínas foram abundantes tanto em machos inteiros quanto castrados em comparação as novilhas. E, 3 proteínas foram abundantes em machos inteiros e novilhas comparados aos machos castrados. Novilhas apresentaram 11 proteínas abundantes comparadas aos machos inteiros e castrados. Machos castrados apresentaram 9 proteínas abundantes comparados aos machos inteiros e novilhas. E, machos inteiros apresentaram 3 proteínas abundantes comparados aos machos castrados e novilhas. Totalizando as 58 proteínas abundantes identificadas no presente estudo (Tabelas 5, 6 e 7).

Algumas proteínas diferencialmente abundantes detectadas estão relacionadas ao metabolismo energético (*ENO3*, *GAPDH*, *LDHA*, *PGM1*, *PGAM2*, *MDH2*, *TPI1*, *PMM2*, *MPC1*, *CKM*), transporte de nutrientes (*ALB*), estrutura muscular (*TUFM*, *EEF1G*, *SGCB*, *CCT6A*, *TNNT3*, *MYLPP*, *ACTA1*, *ACTB*) e organização/proteção/defesa celular (*HSPA8*, *HSPA9*, *STIP1*, *HSPB1*, *HSPB6*, *HSPA1A*) e estresse oxidativo (*PRDX6*) (Tabelas 3, 4 e 5).

Em relação as proteínas de transporte de nutrientes, machos castrados e novilhas obtiverem maior abundância da proteína *ALB* em comparação aos machos inteiros (Tabelas 4 e 5).

Em relação ao metabolismo energético, as novilhas apresentaram maior número de proteínas diferencialmente abundantes comparadas aos machos castrados e inteiros, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7). As novilhas apresentaram 11 proteínas abundantes, como a *ENO3*, 2x. *LDHA*, 2x. *GAPDH*, 4x. *PGM1*, *PGAM2*, *PKIG*, *PMM2*, *MDH2*, *TPI1*, 2x. *CKM* e *PRDX6* (Tabela 7). Em machos castrados, detectou-se 8 proteínas abundantes, sendo a *ENO3*, 2x. *LDHA*, 3x. *GAPDH*, 4x. *PGM1*, 2x. *PGAM2*, *PKIG*, *PMM2* e *MPC1* (Tabela 6). E, em machos inteiros que detectou apenas 5 proteínas abundantes, que foram a 2x. *GAPDH*, *LDHA*, *PGAM2*, *RSPH3*, *MPC1* e *CKM* (Tabela 5).

Em relação as proteínas ligadas a estrutura muscular, observou-se maior número de proteínas diferencialmente abundantes em novilhas comparadas aos machos castrados e inteiros, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7). Em novilhas, detectou-se 7 proteínas abundantes, que foram a *TUFM*, *EEF1G*, *ANXA2*, 2x. *TNNT3*, *ACTA1*, *ACTB* e *CCT6A* (Tabela 7). Em machos castrados, observou-se 6 proteínas abundantes, que foram a *TUFM*, *EEF1G*, *MYLPP*, *TNNT3*, *CCT6A* e *SGCB* (Tabela 6). E, machos inteiros apresentaram apenas 3 proteínas abundantes, como a *ACTB*, *ACTA1* e *SGCB* (Tabela 5).

As proteínas de choque térmico (organização/proteção e defesa celular) detectou-se maior número de proteínas diferencialmente abundantes nos machos castrados comparado aos machos inteiros e novilhas, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7). Foram detectadas 4 proteínas abundantes em machos castrados, que foram a *HSPA8*, *HSPA9*, *HSPA1A* e *STIP1*. Já, machos inteiros apresentaram apenas 2 proteínas de choque térmico, sendo a *HSPB1* e *HSPB6*. E, novilhas que também apresentou maior abundância de *HSPB6* (Tabela 5 e 7).

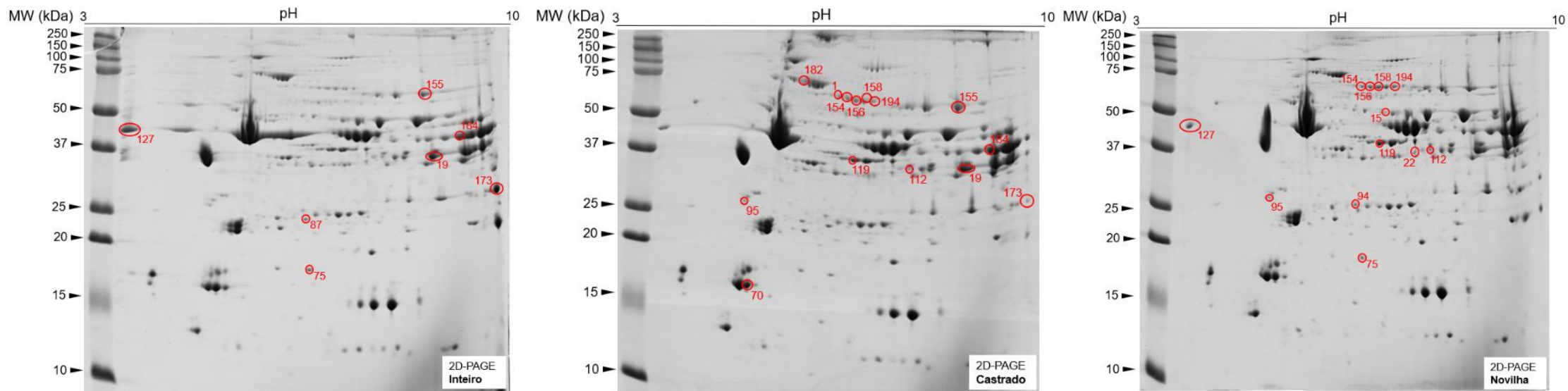


Figura 3,4 e 5. Spots de proteínas diferencialmente abundantes ($p < 0,05$) identificadas por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise de comparação (“Match”). Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Amostras do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros, castrados e novilhas, F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Tabela 5. Proteínas diferencialmente abundantes ($p < 0,05$) do músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros F1 Angus-Nelore identificadas por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise de comparação (“Match”).

Spot ID ¹	Nome da Proteína	Uniprot ID ²	Gene Symbol ³	Score ⁴	Coverage (%) ⁵	pI/Mw teórico ⁶	pI/Mw experimental ⁷
<i>Metabolismo energético</i>							
19	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	73,8739	10201,68	8,515/35845	9,013/40
127	Creatine kinase M-type	Q9XSC6	CKM	1868,229	52,4934	6,678/42961	3,235/42
173	Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	PGAM2	2616,554	79,4466	9,244/ 28666	10,260/32
184	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	1598,053	33,033	8,515/35845	9,65/48
184	Mitochondrial pyruvate carrier 1	Q3ZCG2	MPC1	520,3279	48,6239	10,111/12380	9,65/48
184	L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	LDHA	480,5396	20,1807	8,003/36574	9,65/48
<i>Estrutura muscular</i>							
127	Actin_ alpha skeletal muscle	P68138	ACTA1	7078,759	74,5358	5,071/42023	3,235/42
127	Actin_ cytoplasmic 1	P60712	ACTB	374,0672	40	5,143/41709	3,235/42
173	Beta-sarcoglycan	A6QP70	SGCB	241,991	31,2303	9,184/34711	10,269/32
<i>Proteínas de choque térmico</i>							
75	Heat shock protein beta-6	Q148F8	HSPB6	3394,327	57,3171	5,945/17458	6,818/19
87	Heat shock protein beta-1	Q3T149	HSPB1	6761,609	85,5721	5,960/22379	6,690/25
<i>Demais proteínas</i>							
87	NTF2-related export protein 1	Q2KIW0	NXT1	232,6174	22,1429	4,895/15821	6,690/25
155	Radial spoke head protein 3 homolog	A8E4N3	RSPH3	219,4855	17,1617	6,253/68657	8,771/70
155	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S	Q1RML1	UBE2S	275,7306	12,5561	9,064/23881	8,771/70

184	Keratin_ type II cytoskeletal 7	Q29S21	KRT7	295,6312	25,7511	5,657/51546	9,65/48
184	Putative peptidyl-tRNA hydrolase	Q3SZ85	PTRHD1	333,8683	21,4286	9,673/15962	9,65/48
	PTRHD1						

¹ ID spot corresponde aos números mostrados na figura 4; ² Proteína ID Proteomic databases UniProt; ³ Abreviatura das proteínas de acordo com a abreviatura dos genes UniProt; ⁴ Score significativo; ⁵ Coverage das proteínas calculadas por Scaffold; ⁶ Ponto isoeletrico/massa molecular teórico; ⁷ Ponto isoeletrico/massa molecular experimental.

Tabela 6. Proteínas diferencialmente abundantes ($p < 0,05$) do músculo *Longissimus thoracis* de machos castrados F1 Angus-Nelore identificadas por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise de comparação (“Match”).

Spot ID ¹	Nome da Proteína	Uniprot ID ²	Gene Symbol ³	Score ⁴	Coverage (%)	pI/Mw teórico ⁶	pI/Mw experimental ⁷
<i>Metabolismo energético</i>							
15	Beta-enolase	Q3ZC09	ENO3	6480,191	58,7558	7,667/47066	6,843/46
19	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	10201,68	73,8739	8,515/35845	8,872/34
112	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	6810,084	48,9489	8,515/35845	7,7898/34
112	L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	LDHA	708,8029	31,6265	8,003/36574	7,789/34
154	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2642,755	52,847	6,364/61550	6,376/63
154	Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	PGAM2	846,9792	30,4348	9,244/28666	6,376/63
156	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	3675,51	56,5836	6,364/61550	6,545/62
158	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2332,523	62,2776	6,364/61550	6,700/61
158	Phosphomannomutase 2	Q3SZJ9	PMM2	403,9773	13,0081	5,966/27979	6,700/61
173	Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	PGAM2	2616,554	79,4466	9,244/28666	10,110/29
184	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	1598,053	33,033	8,515/35845	9,351/40
184	Mitochondrial pyruvate carrier 1	Q3ZCG2	MPC1	520,3279	48,6239	10,111/12380	9,351/40
184	L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	LDHA	480,5396	20,1807	8,003/36574	9,351/40
194	cAMP-dependent protein kinase inhibitor gamma	Q7YQJ3	PKIG	181,3384	52,6316	3,851/7899	7,031/61
194	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2317,923	70,9964	6,364/61550	7,031/61

Proteínas de transporte

154	Albumin	P02769	ALB	243,114	28,3361	5,758/69248	6,376/63
182	Albumin	P02769	ALB	3280,824	63,5914	5,758/69248	5,689/72
194	Albumin	P02769	ALB	584,1882	23,3937	5,758/69248	7,031/61

Estrutura muscular

15	Elongation factor Tu_ mitochondrial	P49410	TUFM	333,5244	32,0796	6,769/49367	6,843/46
15	Elongation factor 1-gamma	Q3SZV3	EEF1G	157,3094	27,5	6,126/50346	6,843/46
70	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform	Q0P571	MYLPF	13312,87	95,2941	4,680/19000	4,769/16
119	Troponin T_ fast skeletal muscle	Q8MKI3	TNNT3	1232,228	46,8635	5,928/32106	6,707/35
158	T-complex protein 1 subunit zeta	Q3MHL7	CCT6A	298,3475	33,145	6,310/57919	6,700/61
173	Beta-sarcoglycan	A6QP70	SGCB	241,991	31,2303	9,184/34711	10,110/29

Proteínas de choque térmico

1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Q3ZBZ8	STIP1	462,2531	46,4088	6,024/62442	6,221/64
182	Heat shock 70 kDa protein 1A	Q27975	HSPA1A	2409,167	43,3697	5,554/70215	5,689/72
182	Stress-70 protein_ mitochondrial	Q3ZCH0	HSPA9	612,4346	37,8498	5,896/73695	5,689/72
182	Heat shock cognate 71 kDa protein	P19120	HSPA8	330,1142	34	5,200/71196	5,682/72

Demais proteínas

15	Transcription factor 23	Q2T9Q7	TCF23	350,5888	10,2804	11,869/2342 4	6,843/46
95	14-3-3 protein epsilon	P62261	YWHAE	4375,931	67,451	4,435/29155	4,639/26
95	Proteasome subunit alpha type-5	Q5E987	PSMA5	876,1074	29,4606	4,543/26394	4,639/26
154	Protein FAM229B	Q0D252	FAM229B	189,1026	31,25	9,968/8711	6,376/63
154	GRB2-related adapter protein	A6QLK6	GRAP	310,3715	23,5023	7,439/25350	6,376/63
155	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S	Q1RML1	UBE2S	275,7306	12,5561	9,064/23881	8,671/59

155	Radial spoke head protein 3 homolog	A8E4N3	RSPH3	219,4855	17,1617	6,253/68657	8,67/59
184	Keratin_ type II cytoskeletal 7	Q29S21	KRT7	295,6312	25,7511	5,657/51546	9,351/40
182	Keratin_ type II cytoskeletal 7	Q29S21	KRT7	144,0966	19,0987	5,657/51546	5,689/72
184	Putative peptidyl-tRNA hydrolase	Q3SZ85	PTRHD1	333,8683	21,4286	9,673/15962	9,351/40
	PTRHD1						
182	Annexin A6	P79134	ANXA6	318,4004	41,9019	5,523/75859	5,689/72
182	ADP-ribosylation factor-like protein 11	Q58DI9	ARL11	135,7367	10,989	4,793/19711	5,689/72
194	Tubulin polymerization-promoting protein	Q3ZCC8	TPPP3	181,7748	38,0682	9,517/18930	7,031/61
	family member 3						

¹ ID spot corresponde aos números mostrados na figura 5; ² Proteína ID Proteomic databases UniProt; ³ Abreviatura das proteínas de acordo com a abreviatura dos genes UniProt; ⁴ Score significativo; ⁵ Coverage das proteínas calculadas por Scaffold; ⁶ Ponto isoelétrico/massa molecular teórico; ⁷ Ponto isoelétrico/massa molecular experimental.

Tabela 7. Proteínas diferencialmente abundantes ($p < 0,05$) do músculo *Longissimus thoracis* novilhas F1 Angus-Nelore identificadas por espectrometria de massa (ESI-MS) após análise de comparação (“Match”).

Spot ID ¹	Nome da Proteína	Uniprot ID ²	Gene Symbol ³	Score ⁴	Coverage (%) ⁵	pI/Mw teórico ⁶	pI/Mw experimental ⁷
<i>Metabolismo energético</i>							
15	Beta-enolase	Q3ZC09	ENO3	6480,191	58,7558	7,667/47066	7,041/49
22	L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	LDHA	2472,222	34,6386	8,003/36574	7,629/36
22	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	1771,797	35,7357	8,515/35845	7,629/36
22	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	Q32LG3	MDH2	391,9301	40,2367	8,642/35645	7,629/36
22	Creatine kinase M-type	Q9XSC6	CKM	265,2397	30,4462	6,678/42961	7,629/36
94	Triosephosphate isomerase	Q5E956	TPI1	4747,516	70,2811	6,511/26672	6,453/25
94	Peroxiredoxin-6	Q77834	PRDX6	6221,227	77,6786	5,959/25051	6,453/25
112	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	GAPDH	6810,084	48,9489	8,515/35845	7,929/36
112	L-lactate dehydrogenase A chain	P19858	LDHA	708,8029	31,6265	8,003/36574	7,929/36
127	Creatine kinase M-type	Q9XSC6	CKM	1868,229	52,4934	6,678/42961	3,181/44
154	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2642,755	52,847	6,364/61550	6,590/63
154	Phosphoglycerate mutase 2	Q32KV0	PGAM2	846,9792	30,4348	9,244/28666	6,590/63
156	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	3675,51	56,5836	6,364/61550	6,747/63
158	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2332,523	62,2776	6,364/61550	6,909/63
158	Phosphomannomutase 2	Q3SZJ9	PMM2	403,9773	13,0081	5,966/27979	6,909/63
194	cAMP-dependent protein kinase inhibitor gamma	Q7YQJ3	PKIG	181,3384	52,6316	3,851/7899	7,216/63
194	Phosphoglucomutase-1	Q08DP0	PGM1	2317,923	70,9964	6,367/61550	7,216/63

Proteínas de transporte

154	Albumin	P02769	ALB	243.114	28,3361	5,758/69248	6,590/63
194	Albumin	P02769	ALB	584.1882	23,3937	5,758/69248	7,216/63

Estrutura muscular

15	Elongation factor Tu_ mitochondrial	P49410	TUFM	333.5244	32,0796	6,769/49367	7,041/49
15	Elongation factor 1-gamma	Q3SZV3	EEF1G	157.3094	27,5	6,126/50346	7,041/49
22	Annexin A2	P04272	ANXA2	3495.821	61,9469	7,119/38587	7,629/36
22	Troponin T_ fast skeletal muscle	Q8MKI3	TNNT3	741.3735	38,3764	5,922/32106	7,629/36
119	Troponin T_ fast skeletal muscle	Q8MKI3	TNNT3	1232.228	46,8635	5,928/32106	6,925/38
127	Actin_ alpha skeletal muscle	P68138	ACTA1	7078.759	74,5358	5,071/42023	3,141/44
127	Actin_ cytoplasmic 1	P60712	ACTB	374.0672	40	5,143/41709	3,181/44
158	T-complex protein 1 subunit zeta	Q3MHL7	CCT6A	298.3475	33,145	6,310/57919	6,909/63

Proteínas de choque térmico

75	Heat shock protein beta-6	Q148F8	HSPB6	3394.327	57,3171	5,945/17458	6,584/18
-----------	---------------------------	------------------------	-------	----------	---------	-------------	----------

Demais proteínas

15	Transcription factor 23	Q2T9Q7	TCF23	350.5888	10,2804	11,869/2342 4	7,041/49
94	Snurportin-1	Q2TBK8	SNUPN	123,7241	12,7072	5,704/41465	6,453/25
94	T-box transcription factor TBX6	E1BEA8	TBX6	96,1097	9,628	9,804/49654	6,453/25
94	Keratin_ type II cytoskeletal 7	Q29S21	KRT7	152,1087	12,2318	5,657/51546	6,453/25
95	14-3-3 protein epsilon	P62261	YWHAE	4375,931	67,451	4,435/29155	4,757/26
95	Proteasome subunit alpha type-5	Q5E987	PSMA5	876,1074	29,4606	4,543/26394	4,757/26
154	GRB2-related adapter protein	A6QLK6	GRAP	310,3715	23,5023	7,439/25350	6,590/63
154	Protein FAM229B	Q0D252	FAM229B	189,1026	31,25	9,963/8711	6,590/63
194	Tubulin polymerization-promoting	Q3ZCC8	TPPP3	181,7748	38,0682	9,517/18930	7,216/63

protein family member 3

¹ ID spot corresponde aos números mostrados na figura 6; ² Proteína ID Proteomic databases UniProt; ³ Abreviatura das proteínas de acordo com a abreviatura dos genes UniProt; ⁴ Score significativo; ⁵ Coverage das proteínas calculadas por Scaffold; ⁶ Ponto isoelétrico/massa molecular teórico; ⁷ Ponto isoelétrico/massa molecular experimental.

Análises de bioinformática e enriquecimento funcional permitiram classificar as proteínas de acordo com os processos biológicos (BPs), funções moleculares (FMs) e componentes celular (CCs) entre as classes sexuais: machos inteiros (Figura 6), machos castrados (Figura 7) e novilhas (Figura 8).

Em relação aos PBs, alguns foram observados em todas as classes sexuais, sendo: metabolismo de carboidratos (GO:0005975) e processo glicolítico (GO:0006090). Os processos metabólicos de piruvato (GO:0006090) foram observados em machos inteiros e castrados (Figuras 6 e 7) e metabolismo de glicose (GO:0006006) em machos inteiros e novilhas (Figuras 6 e 8). Em machos castrados e novilhas foram identificadas proteínas ligadas aos processos catabólico de substâncias orgânicas (GO:1901575), catabólico proteico independente da ubiquitina proteasomal (GO:0010499) e metabólico da hexose (GO:0019318) (Figuras 7 e 8).

Em machos inteiros, houve predominância das proteínas que participam do processo metabólico do ácido carboxílico (n=7, GO:0019752), processo metabólico de organofosforados (n=7, GO:0019637), fosforilação (n=7, GO:0016310) e o processo metabólico do ribonucleotídeo de purina (n=6, GO:0009150) (Figura 6).

Em machos castrados, observou-se predominância de proteínas relacionadas ao processo catabólico proteico dependente de ubiquitina (n=6, GO:0043161), redobramento de proteínas (n=3, GO:0042026) e redobramento de proteínas dependente de cofator acompanhante (n=3, GO:0051085) (Figura 7).

Em novilhas, proteínas relacionadas a geração de metabólitos precursores e energia (n=6, GO:0006091) e processo metabólico de pequenas moléculas contendo nucleobases (n=6, GO:0055086) foram predominantes (Figura 8).

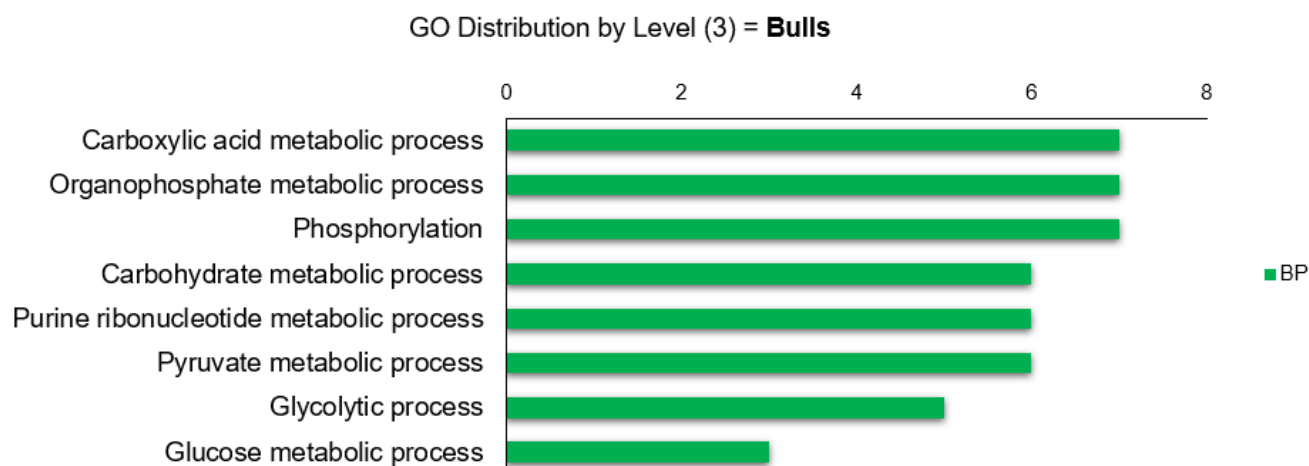


Figura 6: Classificação das proteínas identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros F1 Angus-Nelore, superprecoces. O software OMICSBOX foi utilizado para classificar as proteínas de acordo com o processo biológico (BP), função molecular (FM) e componente celular (CC).

Observou-se proteínas que desempenham FMs apenas em machos castrados e novilhas (Figuras 7 e 8). Em machos castrados, as FMs que predominaram foram: ligação a proteínas de choque térmico (n=4, GO:0031072), ligação proteica desdobrada (n=4, GO:0051082) ligação proteica mal dobrada (n=3, GO:0051787) e acompanhante de dobramento de proteínas (n=3, GO:0044183) (Figura 7). Em novilhas, foram identificadas FMs também encontradas em machos castrados, que foram: atividade da endopeptidase do tipo treonina (GO:0004298) e atividade intramolecular da transferase, fosfotransferases (GO:0016868) (Figuras 7 e 8).

Foram identificadas proteínas dos CCs apenas em machos castrados e novilhas (Figuras 7 e 8). Nos dois grupos, foram observadas proteínas ligadas aos complexos de proteassoma (GO:0000502), central do proteassoma (GO:0005839) e central de proteassoma subunidade alfa (GO:0019773). Em novilhas, houve predomínio das proteínas do citoplasma (n=30, GO:0005737) (Figura 8).

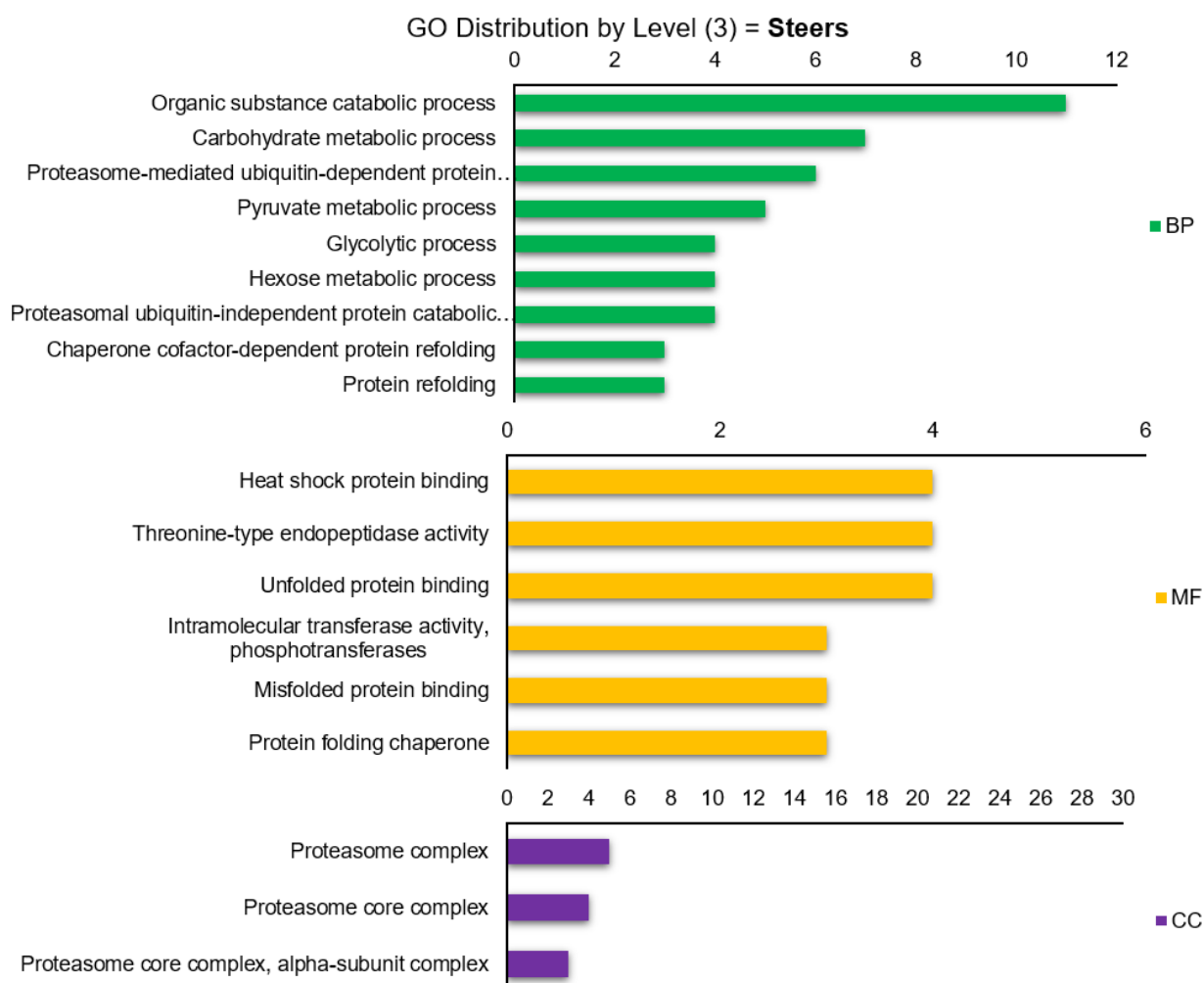


Figura 7: Classificação das proteínas identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de machos castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces. O software OMICSBOX foi utilizado para classificar as proteínas de acordo com o processo biológico (BP), função molecular (MF) e componente celular (CC).

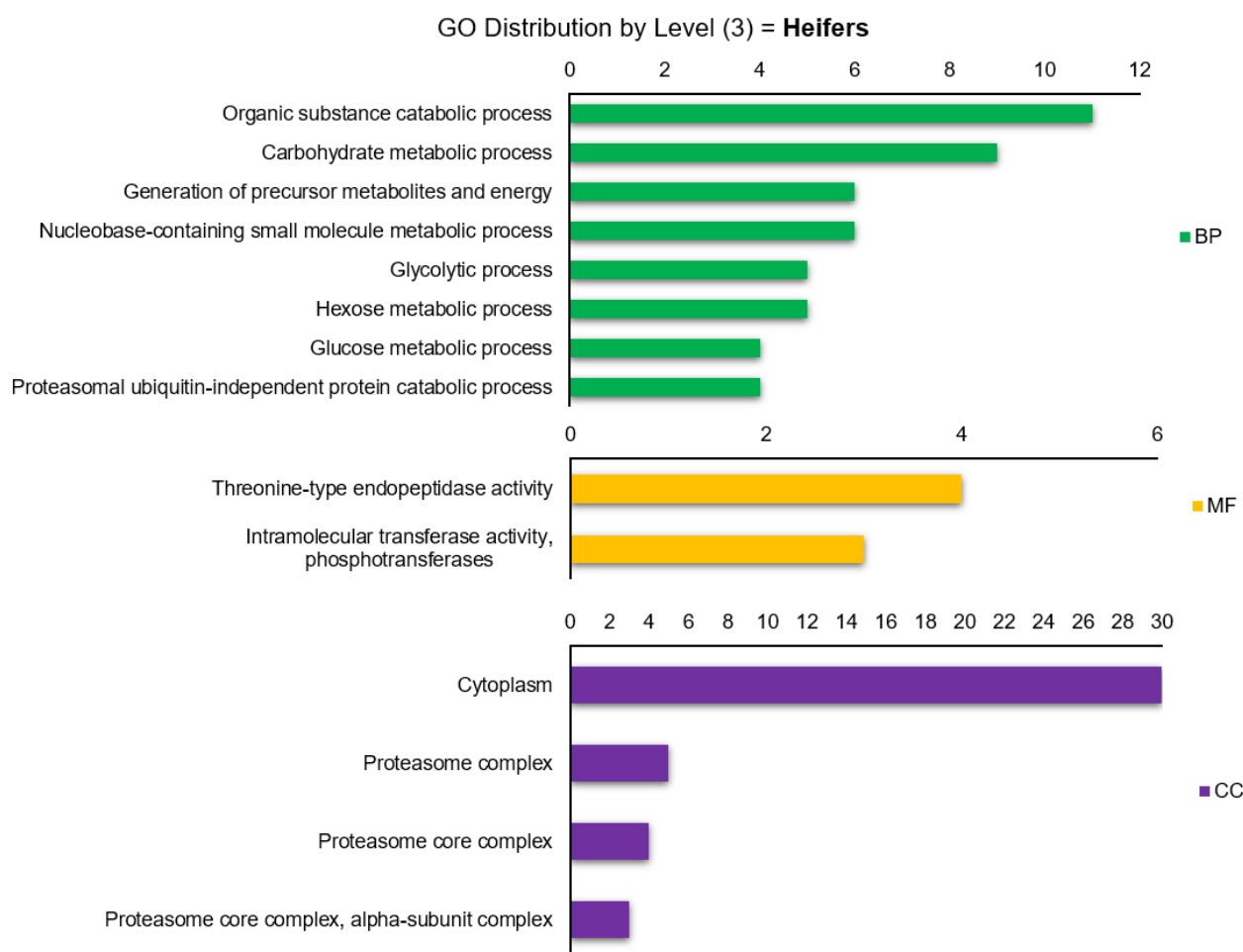


Figura 8: Classificação das proteínas identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces. O software OMICSBOX foi utilizado para classificar as proteínas de acordo com o processo biológico (BP), função molecular (MF) e componente celular (CC).

Os principais termos e vias enriquecidas identificados neste estudo utilizando as proteínas diferencialmente abundantes para machos inteiros, castrados e novilhas estão representados nas figuras 9 e 10. Ao comparar os termos GO enriquecidos para machos inteiros, castrados e novilhas, a via de metabolismo de carboidratos foi enriquecida em ambos os grupos (Figuras 9 e 10).

De forma geral, as novilhas expressaram proteínas que enriqueceram todas as vias representadas, sendo algumas delas: a regulação positiva do processo metabólico de lipídios (GO: 0045834), atividade da proteína tirosina

quinase (GO: 0004713), atividade quinase (GO: 0016301), atividade da tirosina quinase serina/treonina (GO:0004712), via de sinalização MAPK (hsa04010), regulação da cascata MAPK (GO: 0043408), via de sinalização PI3K-Akt (GO: hsa04151), resposta ao estresse oxidativo (GO:0006979), regulação negativa da atividade catalítica (GO:0043086) e regulação do transporte intracelular (GO:0032386). Tais vias de geração de energia em novilhas podem estar relacionadas a maior deposição de gordura subcutânea e intramuscular (Figuras 9 e 10).

No entanto, machos castrados também enriqueceram algumas vias juntamente com as novilhas, como: processos do sistema muscular (GO: 0003012), regulação negativa do processo de modificação de proteínas (GO: 0031400), ligação à proteína ligase semelhante à ubiquitina (GO: 0044389) e atividade intramolecular de transferase, fosfotransferases (GO: 0016868) (Figuras 9 e 10).

Uma análise de bioinformática adicional foi realizada para comparar a sobreposição de proteínas entre as classes sexuais usando o gráfico Circos (Figura 11). Essa análise mostra a sobreposição e as conexões funcionais entre as proteínas e possibilita comparar os termos de ontologia enriquecidos entre os tratamentos, além de identificar aqueles que foram compartilhados ou específicos. Observou-se 29 termos GO, sendo quatro comuns entre todos os grupos, quatro comuns para machos inteiros e castrados, cinco comuns entre machos castrados e novilhas e dezesseis comuns para machos castrados e novilhas (Figura 11). Proteínas agrupadas em termos comuns entre as classes sexuais estão relacionadas ao metabolismo energético e estrutura muscular (Figura 11).

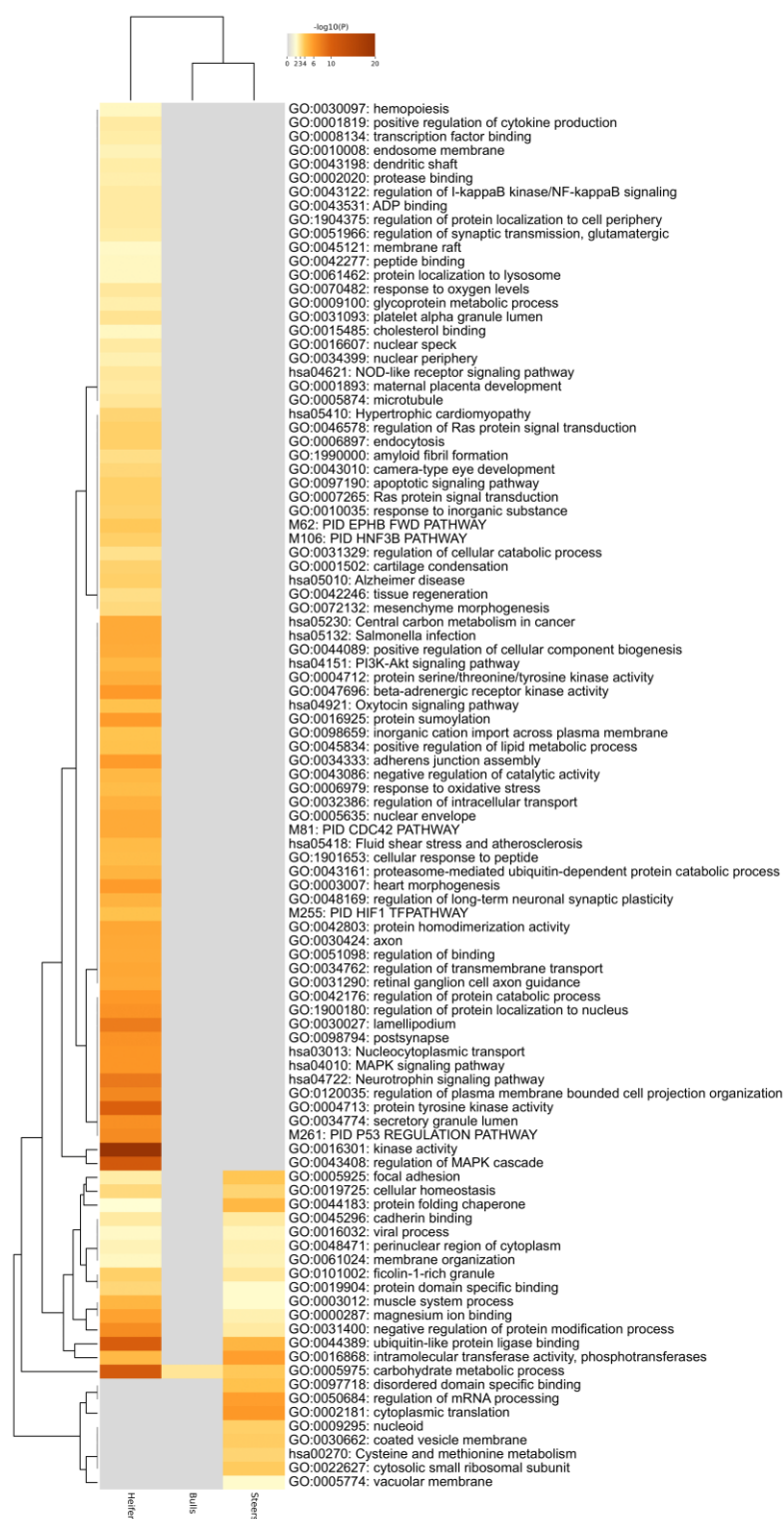


Figura 9-A: Agrupamento hierárquico de mapa de calor dos Top 100 processos celulares significativamente enriquecidos por meio da análise de ontologia gênica (GO) baseadas nas proteínas diferencialmente abundantes identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros (bulls), castrados (steers) e novilhas (heifers) F1 Angus-Nelore, superprecoces.

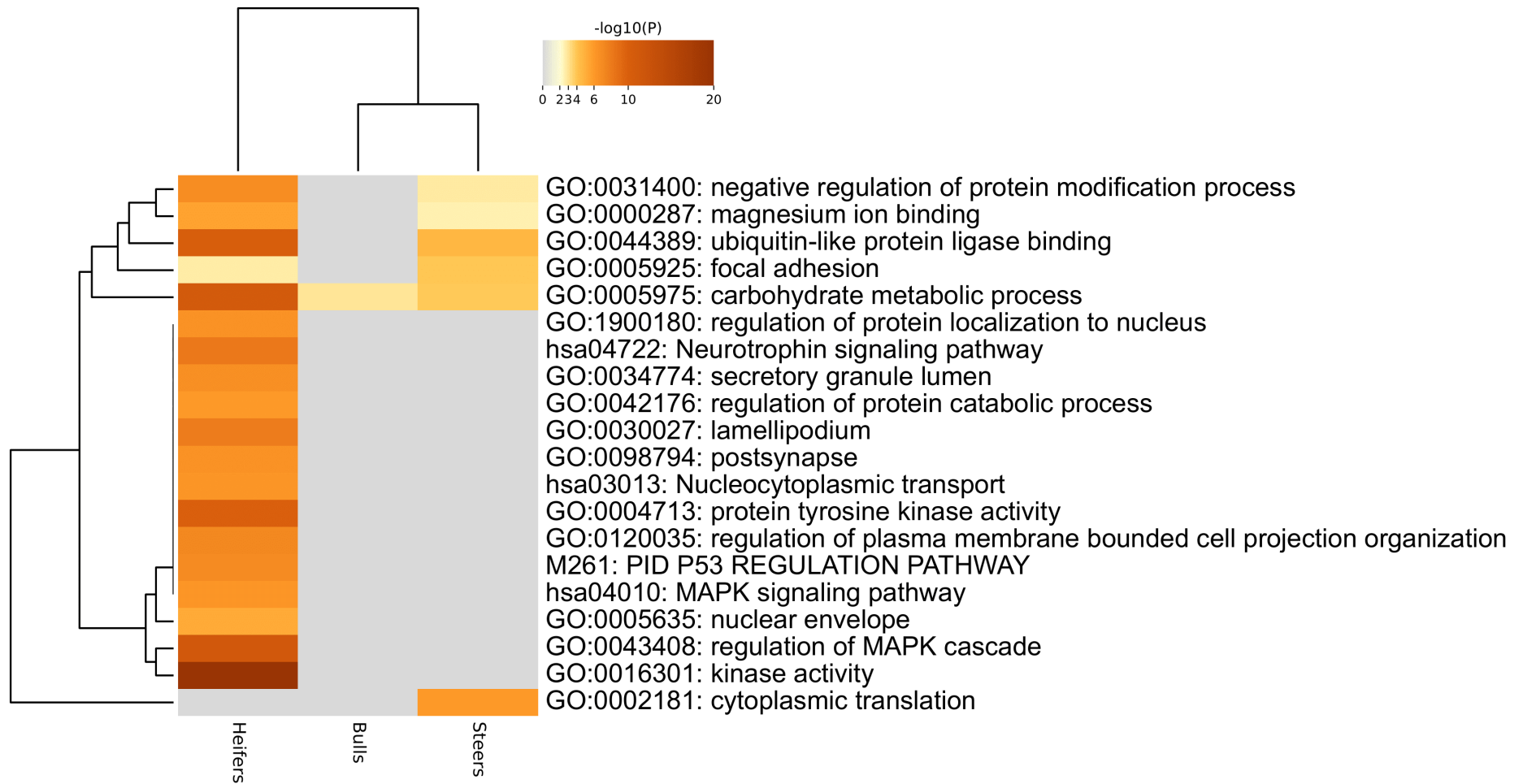


Figura 9-B: Agrupamento hierárquico de mapa de calor comparando os 20 primeiros processos celulares significativamente enriquecidos por meio da análise de ontologia gênica (GO) baseadas nas proteínas diferencialmente abundantes identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de machos inteiros (bulls), castrados (steers) e novilhas (heifers) F1 Angus-Nelore, superprecoces. Valores p são indicados por cor, onde as células cinzas indicam a falta de enriquecimento, o castanho mais claro indica um valor p baixo e o castanho mais escuro indica um valor p alto.

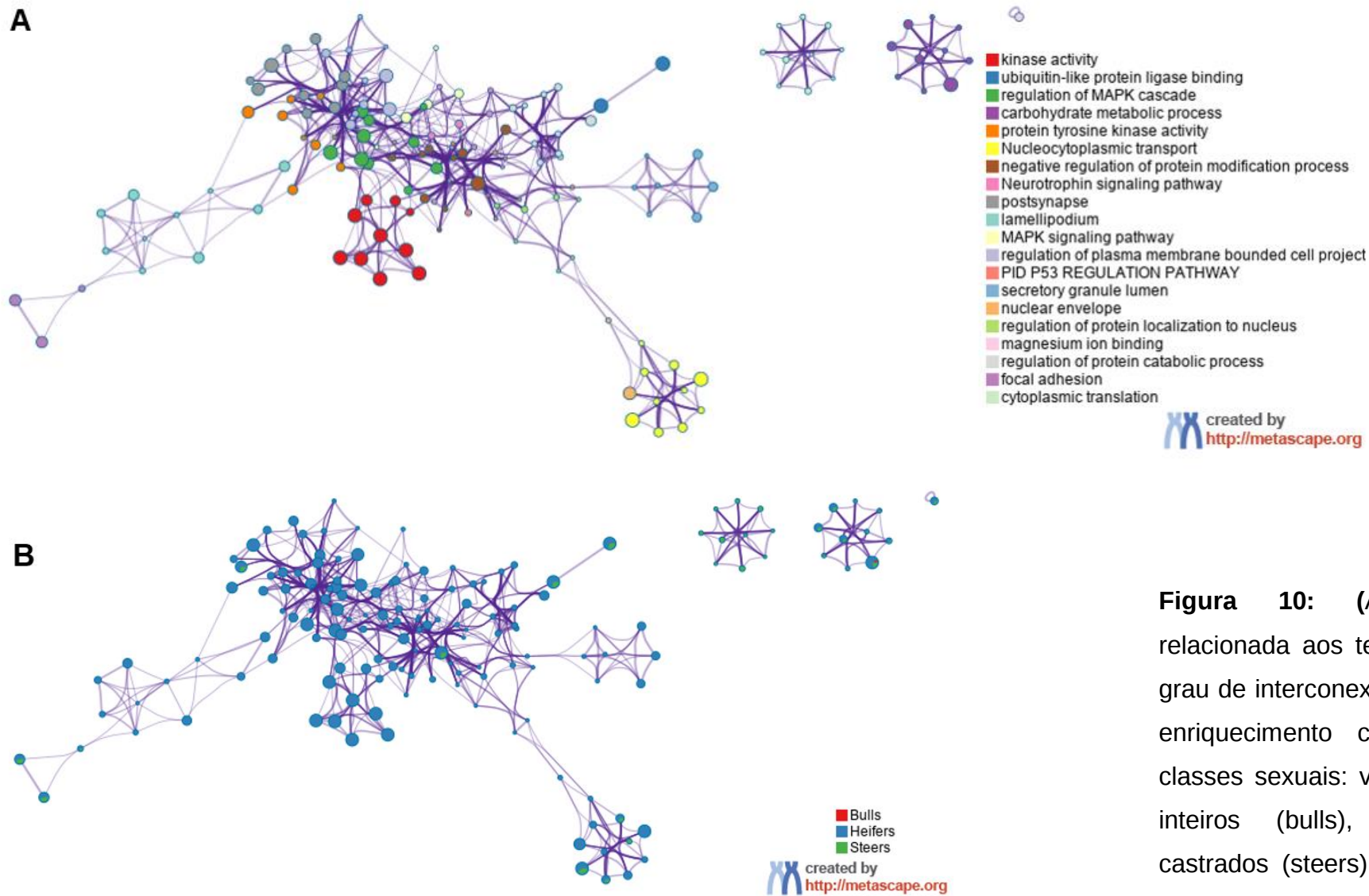


Figura 10: (A) Rede enriquecida relacionada aos termos da Figura 9 e seu grau de interconexão. (B) A mesma rede de enriquecimento com destaque para as classes sexuais: vermelho para os machos inteiros (bulls), verde para machos castrados (steers) e azul para as novilhas (heifers).

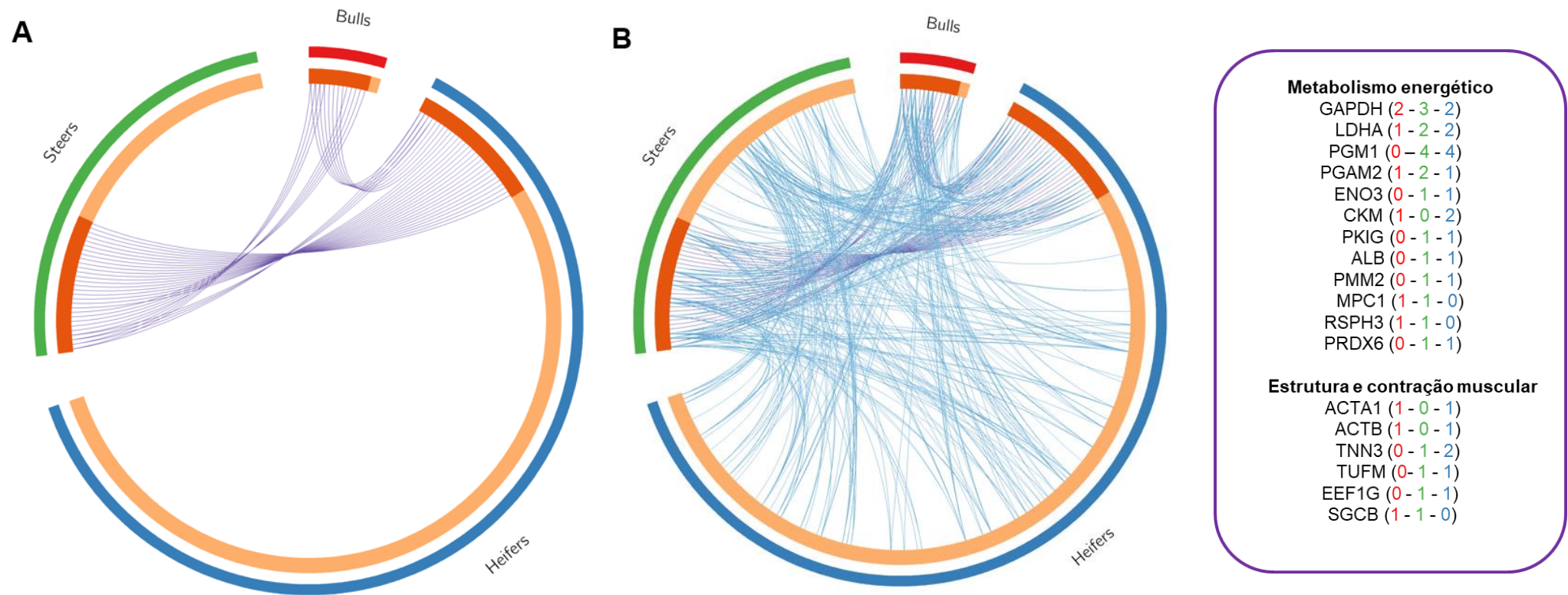


Figura 11: Análise de sobreposição de proteínas entre as classes sexuais com base nas 59 proteínas diferencialmente abundantes identificadas no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore, superprecoces. O arco externo representa as classes sexuais: vermelho para machos inteiros (bulls), verde para machos castrados (steers) e azul para as novilhas (heifers). O arco interno representa as proteínas expressas nas três classes sexuais (laranja escuro) e as proteínas expressas exclusivamente em uma das classes sexuais (laranja claro). As linhas roxas ligam as proteínas presentes nas três classes sexuais (A), e as linhas azuis ligam as proteínas, embora diferentes, que se enquadram mesmo termo ontológico (figura a direita)

As interações proteína-proteína foram analisadas nas classes sexuais: machos inteiros (Figura 12), machos castrados (Figura 13) e novilhas (Figura 15).

Em machos inteiros, apenas um grupo (*clusters*) que acentuou proteínas ligadas ao metabolismo energético (*GAPDH*, *LDHA*, *CKM*, *PGAM2*, *ALDOA*, *PGK1*, *TPI1*) e estrutura muscular (*ACTA1*, *ACTB*), e uma discreta rede de proteínas de choque térmico (*HSPB1*, *HSPB6*, *MAPKAPK2*) (Figura 12).

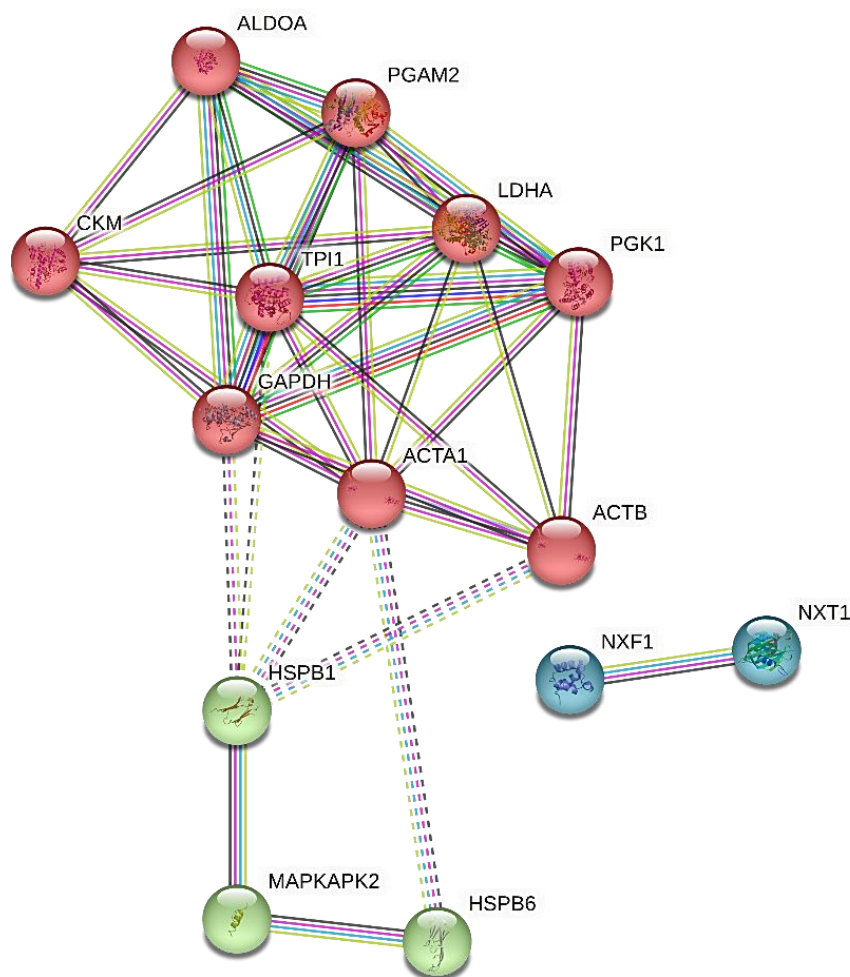


Figura 12: Análise das interações proteína-proteína utilizando as proteínas diferencialmente expressas no músculo Longissimus thoracis de machos inteiros F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Em machos castrados, três grupos (*clusters*) bem definidos foram identificados: proteínas relacionadas ao metabolismo energético (*GAPDH*, *LDHA*, *PGAM2*, *ENO3*, *PGM1*, *PGK1*), proteínas de choque térmico (*HSPA1A*, *HSPA8*, *HSPA9* e *STIP1*) e degradação de proteínas (*PSMA5*, *PSMA2*, *PSMA3*, *PSMD12*, *PSMB1*), além de duas redes discretas ligadas a estrutura e contração muscular (*MYLPF*, *TNNT3*) e proteínas de transporte (*ALB*, *KRT7* e *ANXA6*) (Figura 13).

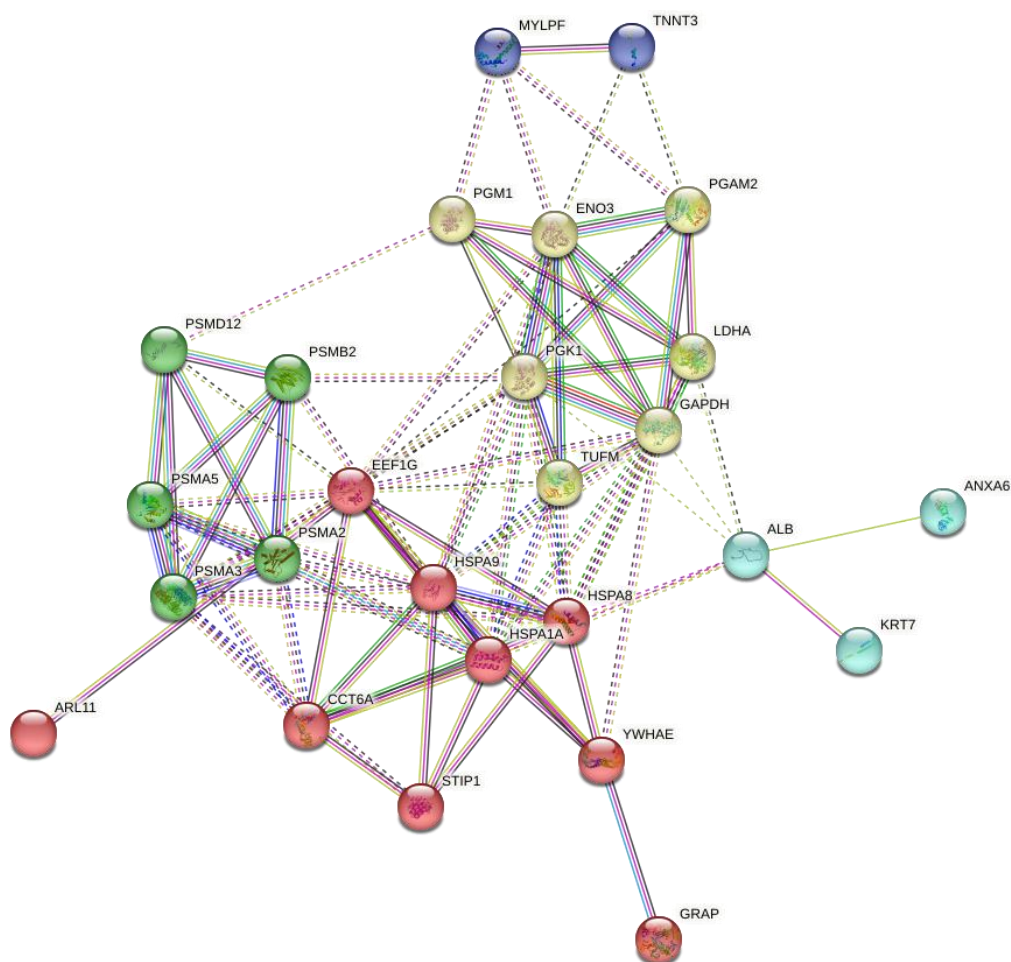


Figura 13: Análise das interações proteína-proteína utilizando as proteínas diferencialmente expressas no músculo Longissimus thoracis de machos castrados F1 Angus-Nelore, superprecoces.

Em novilhas, dois grupos (*clusters*) bem definidos acentuaram proteínas ligadas ao metabolismo energético (*GAPDH*, *LDHA*, *PGAM2*, *ENO3*, *PGM1*, *CKM*, *PMM2*, *PGK1*), estrutura e contração muscular (*TNNT3*, *ACTA1*, *ACTB*, *EEF1G*, *TUFM*, *ANXA2*) e degradação de proteínas (*PSMA5*, *PSMA2*, *PSMA3*, *PSMB2*, *PSMD12*, *CCT6A*) (Figura 14).

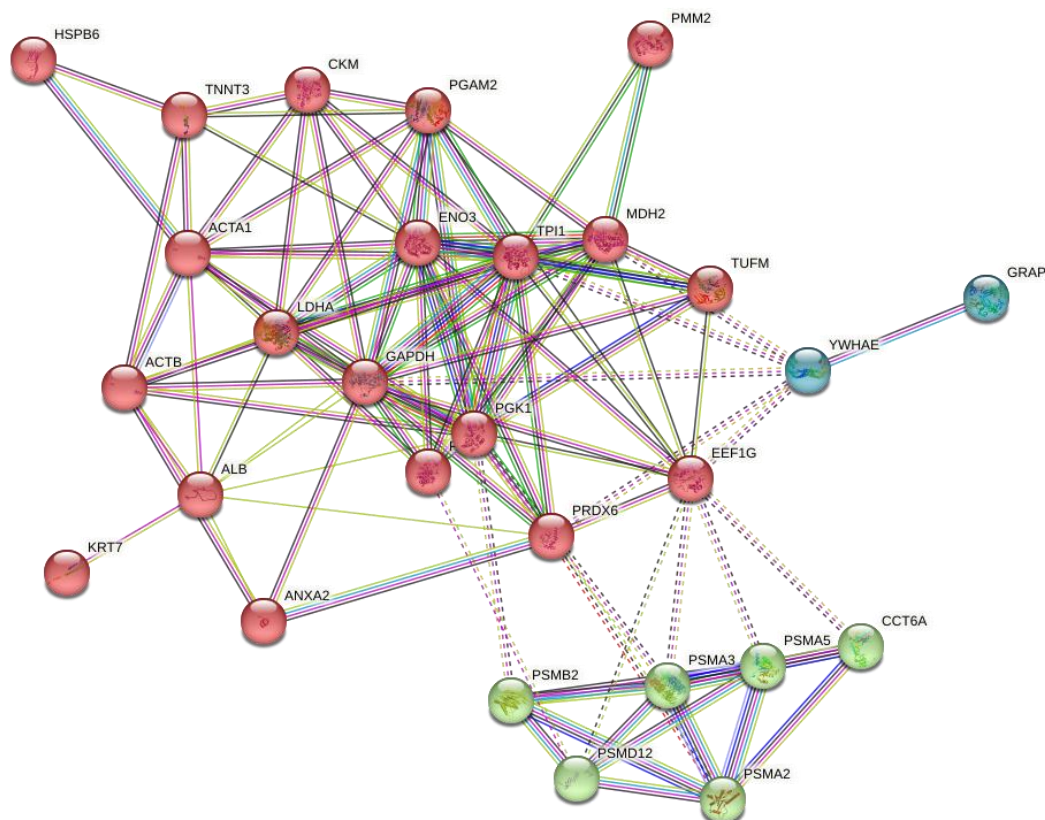


Figura 14: Análise das interações proteína-proteína utilizando as proteínas diferencialmente expressas no músculo Longissimus thoracis de novilhas F1 Angus-Nelore, superprecoces.

14 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que machos inteiros, mesmo confinados por 230 dias, não atingem níveis de gordura intramuscular semelhantes a novilhas e machos castrados. Contudo, força de cisalhamento e espessura de gordura subcutânea foram semelhantes aos machos castrados, o que torna nossa hipótese parcialmente refutada.

No proteoma do músculo LT de machos castrados e novilhas, foi observada a maior abundância das proteínas relacionadas ao metabolismo energético que foram a *ALB*, *PKIG*, *PGM1*, *GAPDH*, *LDHA*, *ENO3*, *PGAM2*, *PMM2*, que ajudam a justificar a maior deposição de gordura intramuscular em comparação aos machos inteiros (Figura 15).

O proteoma do músculo LT de novilhas também mostrou maior abundância das proteínas *PRDX6*, *CKM*, *TPI1* e *MDH2*, relacionadas ao metabolismo energético e das proteínas *TNN3*, *ACTA1*, *ACTB* e *CCT6A*, relacionadas a estrutura e contração muscular, que podem ter colaborado com a maior deposição de gordura subcutânea e maciez na carne em comparação aos machos inteiros e castrados (Figura 15). Algumas dessas proteínas foram candidatas a biomarcadores de deposição de gordura intramuscular e maciez da carne em outros estudos (Bazile et al., 2019; Poleti et al., 2018; B. Santiago et al., 2023; Scapol et al., 2023; Severino et al., 2022; Silva et al., 2019b).

14.1 Características de carcaça

O maior ganho de peso em carcaça quente de macho inteiro está bem consolidados na literatura. Mueller et al. (2019) e Santiago et al. (2023) investigando o desempenho em animais F1 Angus-Nelore observaram que o peso de carcaça foi maior em machos inteiros comparados a machos castrados ou imunocastrados. Mueller et al. (2019) ainda observaram que novilhas apresentaram menor peso de carcaça que machos inteiros e castrados (imunocastrados).

O método de castração utilizada no presente estudo foi a imunológica, que consiste em promover através da vacina a imunização ativa do animal contra o hormônio liberador de gonadotrofina (anti-GnRH) e inibe a liberação de hormônios sexuais, como a testosterona (Janett et al., 2012). Esse hormônio

promove maior efeito anabólico nesses animais (Needham et al., 2017), e consequentemente, maior deposição de massa muscular. Esse efeito também justifica a área de olho de lombo em machos inteiros ter sido 15 cm² maior em comparação aos machos castrados e novilhas. Outros estudos também relataram maior área de olho de lombo em machos inteiros em comparação machos castrados (imunologicamente) (Adams et al., 1993; Amatayakul-Chantler et al., 2012) e novilhas (Venkata Reddy et al., 2015a).

No presente estudo, a gordura subcutânea das novilhas foi 5,85 mm (55%) mais espessa comparada aos machos do estudo. Essa resposta está relacionada ao maior potencial de deposição de gordura em novilhas em razão das diferenças na curva de crescimento (Owens, Dubeski, & Hansont, 1993) e nas diferenças de deposição de tecidos entre as classes sexuais (Amatayakul-Chantler et al., 2013). Nossos resultados corroboram com alguns estudos que também observaram maior potencial de deposição de gordura subcutânea em novilhas do que novinhos (Choat et al., 2006; King et al., 2006; Mueller et al., 2019b).

As características de peso da carcaça e a gordura subcutânea são fatores importantes que podem influenciar a velocidade de resfriamento da carcaça. Quando as carcaças são resfriadas rapidamente, elas podem ser afetadas pelo encurtamento e/ou endurecimento induzido pelo frio (Savell et al., 2005). Carcaças mais leves são resfriadas mais rapidamente devido a maior área superficial específica. Além disso, a gordura de cobertura fornece uma camada de proteção e diminui a velocidade em que a temperatura reduz (Chardulo et al., 2013).

14.2 Proteoma do tecido muscular e características de qualidade de carne

As características de qualidade de carne como cor, maciez e gordura intramuscular tem influenciado o poder de compra dos consumidores. Essas características podem ser afetadas por vários fatores, desde a nutrição, classe sexual (Lee et al., 2009; Park, Kang, et al., 2018b), e principalmente a genética (Cafferky et al., 2019). Compreender os mecanismos bioquímicos e moleculares que controlam essas características é fundamental para planejar estratégias nutricionais, de manejo ou de melhoramento genético para agregar valor na carne.

No presente estudo algumas das principais características de qualidade de carne foram afetadas pela classe sexual, como gordura intramuscular e força de cisalhamento (maciez da carne). Machos castrados e novilhas depositaram mais gordura intramuscular comparados aos machos inteiros, com diferença de 6,4% contra 2,9%, respectivamente. As novilhas obtiveram menores valores de força de cisalhamento comparada aos machos castrados e inteiros, independente dos tempos de maturação (7, 14 e 21 dias *post mortem*), que infere maior grau de maciez da carne desse fenótipo.

A análise do proteoma no tecido muscular de machos castrados e novilhas detectou proteínas diferencialmente abundantes associadas ao transporte de nutrientes (*ALB*) e ao metabolismo energético (*PKIG*, *PGM1*, *GAPDH*, *LDHA*, *ENO3*, *PGAM2*, *PMM2*) em comparação aos machos inteiros. As proteínas *GAPDH*, *PGAM2*, *ENO3* são enzimas que catalisam as reações na glicólise (Figura 15). *PGM1* participa da conversão reversível de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato na gliconeogênese (Figura 15). *LDHA* atua na redução de piruvato a lactato, dependente da coenzima NADH que atua no balanço redox (Hochachka & Somero, 2002) (Figura 15). Outros estudos relataram a abundância de algumas proteínas encontradas no presente estudo e sua relação com o maior teor de gordura intramuscular na carne (Antonelo et al., 2020; Gagaoua, Terlouw, et al., 2021; B. Santiago et al., 2023; Severino et al., 2022; Silva et al., 2019b).

Desse modo, o aumento da via da glicólise sugere uma maior produção de substratos para a síntese lipídios nos adipócitos intramusculares, resultado que encontramos em machos castrados e novilhas comparados aos machos inteiros do presente estudo. Alguns estudos corroboram com os nossos resultados associando a abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético com maior gordura intramuscular em bovinos submetidos a castração (Santiago et al., 2023; Silva et al., 2019).

Em estudo de Severino et al. (2022) investigaram os efeitos da castração imunológica (anti-GnRH) de machos e fêmeas F1 Montana-Nelore em sistema de confinamento e observaram que novilhas apresentaram maior gordura subcutânea e intramuscular na carne comparadas aos machos castrados, devido a maior abundância de proteínas ligadas ao transporte de nutrientes (*TF*, *ALB* e *MB*), metabolismo energético (*ALDOA*, *GAPDH* e *PKM*) e citoproteção e

defesa celular (*HSPA8* e *CA3*), enquanto que machos expressaram proteínas relacionadas a estrutura e contração muscular (*ACTA1*, *TPM2* e *TNNT3*), metabolismo energético (*ENO1*, *ENO3*, *PYGM*, *PGM1* e *TPI1*) e metabolismo de ATP (*ATP5F1B*, *PEBP1* e *AK1*). Algumas dessas proteínas foram expressas no nosso estudo podendo reforçar a associação com a maior deposição de gordura intramuscular em machos castrados e novilhas.

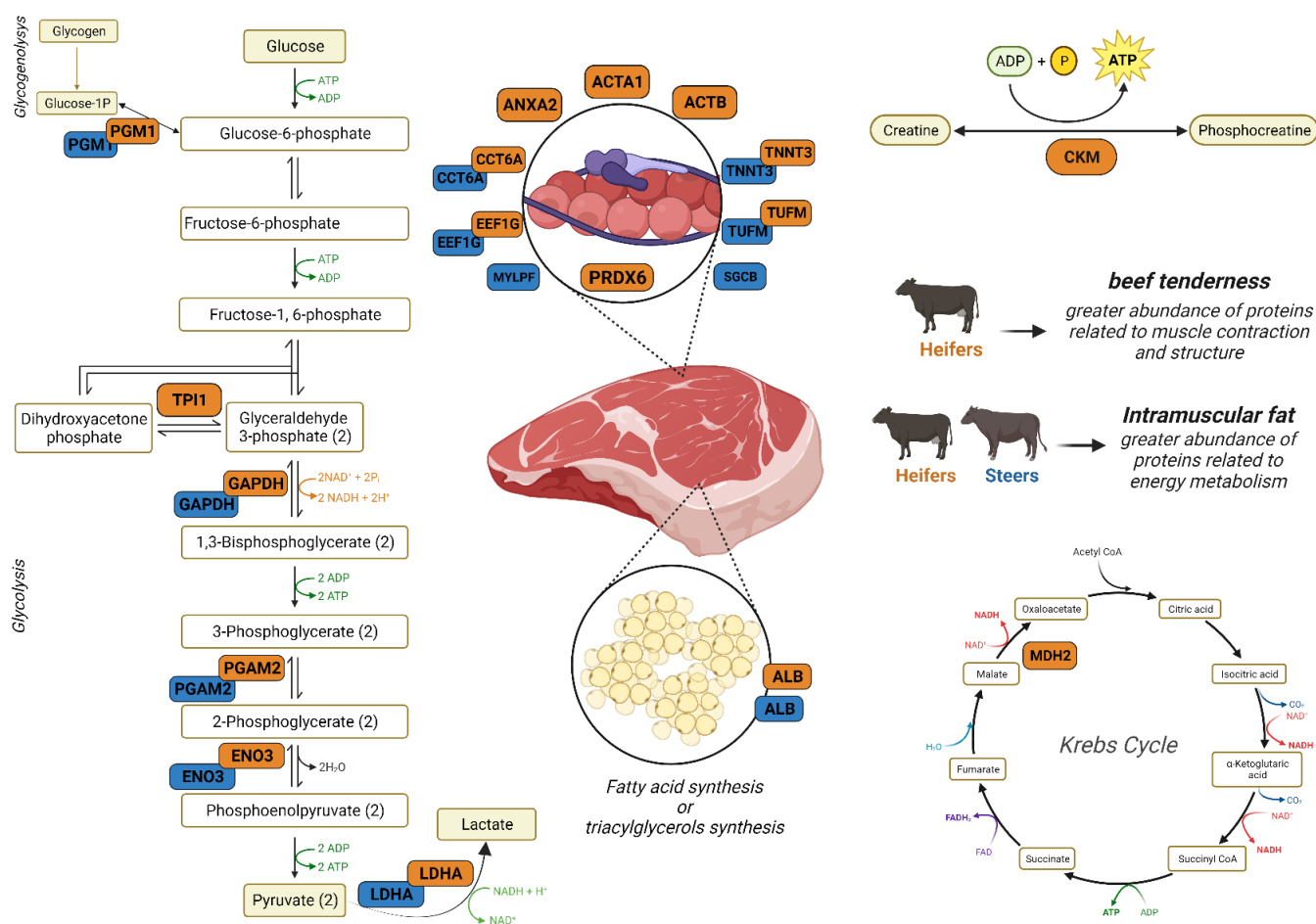


Figura 15: Representação das proteínas diferencialmente abundantes em machos castrados (azul) e novilhas (laranja) e de seus respectivos processos metabólicos.

As novilhas apresentaram carne mais macia comparada aos machos do estudo e independente dos tempos de maturação. Essa resposta provavelmente está relacionada a maior abundância de algumas proteínas detectadas somente nesse grupo, como a, *TPI1*, *CKM*, *MDH2* e *PRDX6* (além das compartilhadas com outros grupos) que participam do metabolismo energético e oxidativo, e *ACTA1*, *ACTB* e *ANXA2* (além das compartilhadas com outros grupos) ligadas a estrutura e contração muscular (Figura 15). Algumas das proteínas de estrutura e contração muscular (*ACTA1*, *ACTB*, *ANXA2*) encontradas em novilhas são conhecidas pela associação com a maciez da carne (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021; Ouali et al., 2013; Rosa et al., 2018).

A enzima triosefosfato isomerase (*TPI1*) catalisa a conversão reversível de dihidroxiacetona fosfato em D-gliceraldeído-3-fosfato na fase preparatória da glicólise (Nelson & Cox, 2004), e garante a regulação imediata dos triosefosfato produzidos pela aldolase (*ALDOA*) que está associada tanto ao metabolismo de lipídios quanto a via das pentoses (Orosz et al., 2009). Além do mais, as variações na abundância de *TPI1* e suas isoformas fosforiladas tem conexão com o declínio do pH (Gagaoua et al., 2018; Huang et al., 2011), sugerindo seu desempenho *post-mortem* e sua importância na maciez da carne bovina (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021), e também na carne suína (Lametsch et al., 2003).

A creatina quinase tipo M (*CKM*) é uma enzima que catalisa a transferência de um fosfato entre o ATP e a creatina, sendo fundamental para a regeneração de ATP no músculo (della Malva et al., 2022; Nelson & Cox, 2004; B. Zou et al., 2020). A regeneração de ATP pela *CKM* mantém constante a concentração de ATP muscular durante um curto período de tempo, e pode ser um indicativo de maior demanda energética de ATP para as reações no músculo no período *post mortem*. Em estudo de Gagaoua et al. (2021) classificaram a proteína *CKM* como um dos principais biomarcadores de maciez da carne (independente do sexo), sugerindo função enzimática adicional devido a sua localização na banda M dentro do sarcômero.

No mesmo estudo de Gagaoua et al. (2021), também relataram a relação da proteína *MDH1* (citossólica) como biomarcador de maciez. Essa enzima catalisa a reação reversível de malato a oxaloacetato através da redução de NAD⁺ a NADH que é necessário para a produção de ATP na cadeia de

transporte de elétrons (Nelson & Cox, 2004). Nesse sentido, a maior abundância de *MDH2* (mitocondrial) pode indicar o aumento da capacidade de fosforilação oxidativa do músculo em resposta ao estresse celular em novilhas no presente estudo.

A enzima peroxiredoxina-6 (*PRDX6*) tem sido relatada por desempenhar papel importante no desenvolvimento da maciez da carne bovina. A *PRDX6* é uma proteína bifuncional, e um dos efeitos está ligado ao potencial antioxidante no músculo *post mortem* por meio da ativação do seu sítio de ligação *PLA2* (fosfolipase A2) (Gong et al., 2006), que por sua vez, realiza a hidrólise da fosfatidilcolina que marca a inversão da polaridade da membrana no início do apoptose (Manevich et al., 2009; Martin et al., 2015; Ouali et al., 2013). Finalmente, esse processo pode modificar a fluidez da membrana celular tornando-a mais permeável aos íons, como o Ca^{2+} , podendo resultar em aumento da atividade de proteases dependentes de cálcio como a μ -calpaína (Gagaoua et al., 2015; Gutiérrez & Ownby, 2003). Além disso, a proteína *PRDX6* também está associada ao marmoreio da carne (Gagaoua, Bonnet, et al., 2020).

Machos castrados e inteiros não apresentaram diferenças quanto a maciez da carne (independente dos tempos de maturação). Essa semelhança pode estar atrelada a maior abundância de proteínas HSP's nesses animais (*HSPA8*, *HSPA9*, *HSPA1A*, *STIP1*, *HSPB1*, *HSPB6*). Tais proteínas possuem diversas funções e propriedades anti-apoptóticas que podem contribuir para retardar as reações iniciais de apoptose *post mortem*, e, portanto, influenciar no desenvolvimento da proteólise durante a conversão do músculo em carne (Gagaoua, Terlouw, et al., 2021; Y. H. B. Kim et al., 2018). Adicionalmente, há indícios que *HSP27* pode interagir direta ou indiretamente com caspase-3 e Calpain-1 para diminuir sua atividade e diminuir a degradação de proteínas miofibrilares (Ding et al., 2018). Esse mecanismo anti-apoptótico pode estar associado a menor maciez da carne nos machos do estudo em comparação as novilhas.

15 CONCLUSÕES

Machos não castrados não produzem carne com teor gordura intramuscular semelhante a machos castrados e novilhas, mesmo que alimentados por 230 dias em confinamento. Porém, apresentam ganho de carcaça superior as demais classes e valores de força de cisalhamento semelhantes à de machos castrados.

Novilhas apresentam carne com melhor maciez e gordura intramuscular devido a maior abundância de proteínas ligadas ao metabolismo energético (*TPI1*, *CKM*, *MDH2*, *PRDX6*, *PKIG*, *ALB*, *PGM1*, *GAPDH*, *LDHA*, *ENO3*, *PGAM2*, *PMM2*) e de estrutura e contração muscular (*ACTA1*, *ACTB*, *TNNT3*, *TUFM*, *EEF1G*, *ANXA2* e *CCT6A*) no proteoma do músculo *Longissimus thoracis*.

16 REFERÊNCIAS

- Adams, T. E., Daley, C. A., Adams, B. M., & Sakurai, H. (1993). Testis Function and Feedlot Performance of Bulls Actively Immunized Against Gonadotropin-Releasing Hormone: Effect of Implants Containing Progesterone and Estradiol Benzoate. *Journal of Animal Science*, 71(4), 811–817. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/71/4/811/4632210>
- Amatayakul-Chantler, S., Hoe, F., Jackson, J. A., Roca, R. O., Stegner, J. E., King, V., Howard, R., Lopez, E., & Walker, J. (2013). Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine bopriva or surgical castration of bos indicus bulls raised on pasture in brazil. *Meat Science*, 95(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.008>
- Amatayakul-Chantler, S., Jackson, J. A., Stegner, J., King, V., Rubio, L. M. S., Howard, R., Lopez, E., & Walker, J. (2012). Immunocastration of Bos indicus × Brown Swiss bulls in feedlot with gonadotropin-releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality. *J. Anim. Sci*, 90, 3718–3728. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4826>
- AMSA. (2015). Research Guidelines for cookery, Sensory Evaluation and Instrumental Measurements of Fresh Meat. <http://www.meatscience.org>
- Anderson, S., Nanke, M. ; K., Perez, ; A, Phelps, ; M, Reitz, ; J, Salazar, ; A, Shinkle, ; T, Strampe, ; M, van Horn, ; K, Williams, ; J, Wipperfurth, ; C, Zelten, ; S, & Zerr, ; S. (2007). Determination of Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan™ Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated. *Journal of AOAC International*, 4(90), 1073–1083. <https://academic.oup.com/jaoac/article/90/4/1073/5657890>
- Antonelo, D. S., Cônsolo, N. R. B., Gómez, J. F. M., Beline, M., Goulart, R. S., Corte, R. R. P. S., Colnago, L. A., Schilling, M. W., Gerrard, D. E., & Silva, S. L. (2020). Metabolite profile and consumer sensory acceptability of meat from lean Nellore and Angus × Nellore crossbreed cattle fed soybean oil. *Food Research International*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109056>
- Baldassini, W. A., Braga, C. P., Chardulo, L. A. L., Silva, J. A. I. V., Malheiros, J. M., De Albuquerque, L. G., Fernandes, T. T., & Padilha, P. D. M. (2015).

- Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). *Food 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>
- Bazile, J., Picard, B., Chambon, C., Valais, A., & Bonnet, M. (2019). Pathways and biomarkers of marbling and carcass fat deposition in bovine revealed by a combination of gel-based and gel-free proteomic analyses. *Meat Science*, 156, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.018>
- 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. <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>
- Bures, D., & Barton, L. (2012). Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech Journal of Animal Science*, 57(1), 34–43.
- 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). <https://doi.org/10.3390/foods8050173>
- 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>
- Chardulo, L. A. L., Silveira, A. C., & Vianello, F. (2013). Analytical Aspects for Tropical Meat Quality Assessment. In *Food Quality, Safety and Technology* (pp. 53–62). Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1640-1_4

- Choat, W. T., Paterson, J. A., Rainey, B. M., King, M. C., Smith, G. C., Belk, K. E., & Lipsey, R. J. (2006). The effects of cattle sex on carcass characteristics and longissimus muscle palatability. *Journal of Animal Science*, 84(7), 1820–1826. <https://doi.org/10.2527/jas.2004-418>
- della Malva, A., Gagaoua, M., Santillo, A., De Palo, P., Sevi, A., & Albenzio, M. (2022). First insights about the underlying mechanisms of Martina Franca donkey meat tenderization during aging: A proteomic approach. *Meat Science*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108925>
- Gagaoua, M., Bonnet, M., De Koning, L., & Picard, B. (2018). Reverse Phase Protein array for the quantification and validation of protein biomarkers of beef qualities: The case of meat color from Charolais breed. *Meat Science*, 145, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.039>
- Gagaoua, M., Bonnet, M., & Picard, B. (2020). Protein array-based approach to evaluate biomarkers of beef tenderness and marbling in cows: Understanding of the underlying mechanisms and prediction. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091180>
- Gagaoua, M., Claudia Terlouw, E. M., Boudjellal, A., & Picard, B. (2015). Coherent correlation networks among protein biomarkers of beef tenderness: What they reveal. *Journal of Proteomics*, 128, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.022>
- Gagaoua, M., Terlouw, E. M. 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*, 172, 108311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108311>
- Gong, M. C., Arbogast, S., Guo, Z., Mathenia, J., Su, W., & Reid, M. B. (2006). Calcium-independent phospholipase A 2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol*, 100, 399–405. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00873.2005.-Phospholipase>
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., & Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10), 3420–3435. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN176>

- Gutiérrez, J. M., & Ownby, C. L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42(8), 915–931. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution (pp. 466–466). Oxford University Press.
- Huang, H., Larsen, M. R., Karlsson, A. H., Pomponio, L., Costa, L. N., & Lametsch, R. (2011). Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences. *Proteomics*, 11(20), 4063–4076. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100173>
- Janett, F., Gerig, T., Tschuor, A. C., Amatayakul-Chantler, S., Walker, J., Howard, R., Bollwein, H., & Thun, R. (2012). Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology*, 78(1), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.035>
- Kim, Y. H. B., Ma, D., Setyabrata, D., Farouk, M. M., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E., & Hunt, M. C. (2018). Understanding postmortem biochemical processes and post-harvest aging factors to develop novel smart-aging strategies. In *Meat Science* (Vol. 144, pp. 74–90). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.031>
- King, D. A., Morgan, W. W., Miller, R. K., Sanders, J. O., Lunt, D. K., Taylor, J. F., Gill, C. A., & Savell, J. W. (2006). Carcass merit between and among family groups of *Bos indicus* crossbred steers and heifers. *Meat Science*, 72(3), 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.08.015>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., & Bendixen, E. (2003). Postmortem Proteome Changes of Porcine Muscle Related to Tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 6992–6997. <https://doi.org/10.1021/jf034083p>
- Lana, A., & Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, 147, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.011>

- Lee, M. R. F., Evans, P. R., Nute, G. R., Richardson, R. I., & Scollan, N. D. (2009). A comparison between red clover silage and grass silage feeding on fatty acid composition, meat stability and sensory quality of the M. Longissimus muscle of dairy cull cows. *Meat Science*, 81(4), 738–744. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.016>
- Manevich, Y., Shuvaeva, T., Dodia, C., Kazi, A., Feinstein, S. I., & Fisher, A. B. (2009). Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase A2 activities. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 485(2), 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.008>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. E. M., Mcgahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C. A. A., Laface, D. M., & Green, D. T. (2015). Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Proteomics*, 128.
- 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>
- Mueller, L. F., Balieiro, J. C. C., Ferrinho, A. M., Martins, T. da S., da Silva Corte, R. R. P., de Amorim, T. R., de Jesus Mangini Furlan, J., Baldi, F., & Pereira, A. S. C. (2019). Gender status effect on carcass and meat quality traits of feedlot Angus × Nellore cattle. *Animal Science Journal*, 90(8), 1078–1089. <https://doi.org/10.1111/asj.13250>
- Mwangi, F. W., Charmley, E., Gardiner, C. P., Malau-Aduli, B. S., Kinobe, R. T., & Malau-Aduli, A. E. O. (2019). Diet and genetics influence beef cattle performance and meat quality characteristics. In *Foods* (Vol. 8, Issue 12). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8120648>
- 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>

- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger-Principles of Biochemistry*.
- Orosz, F., Oláh, J., & Ovádi, J. (2009). Triosephosphate isomerase deficiency: New insights into an enigmatic disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1792, Issue 12, pp. 1168–1174). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.012>
- 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 regards to our current understanding of the mechanisms involved. In *Meat Science* (Vol. 95, Issue 4, pp. 854–870). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.010>
- Owens, F. N., Dubeski, P., & Hansont, C. F. (1993). Factors that Alter the Growth and Development of Ruminants. *Journal of Animal Science*, 71(3), 3138–3150.
- Park, S. J., Kang, H. J., Na, S., Lee, S. H., & Baik, M. (2018). Differential expression of extracellular matrix and integrin genes in the longissimus thoracis between bulls and steers and their association with intramuscular fat contents. *Meat Science*, 136, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.008>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.010>
- Poleti, M. D., Regitano, L. C. A., Souza, G. H. M. F., Cesar, A. S. M., Simas, R. C., Silva-Vignato, B., Oliveira, G. B., Andrade, S. C. S., Cameron, L. C., & Coutinho, L. L. (2018). Longissimus dorsi muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. *Journal of Proteomics*, 179, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.028>
- Rosa, A. F., Moncau, C. T., Poleti, M. D., Fonseca, L. D., Balieiro, J. C. C., Silva, S. L. E., & Eler, J. P. (2018). Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. *Meat Science*, 138, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.12.006>
- Santiago, B., Baldassini, W., Neto, O. M., Chardulo, L. A., Torres, R., Pereira, G., Curi, R., Chiaratti, M. R., Padilha, P., Alessandrini, L., & Gagaoua, M. (2023). Post-mortem muscle proteome of crossbred bulls and steers: Relationships with carcass and meat quality. *Journal of Proteomics*, 278, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.104871>

- Santiago, B. M., Baldassini, W. A., Chiaratti, M. R., Pandey, A. K., Torrecilhas, J. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, R. V., Lanna, D. P. D., Pereira, G. L., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., & Machado Neto, O. R. (2023a). Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nellore young steers and bulls feedlot finished. *Livestock Science*, 268, 105151. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105151>
- Santiago, B. M., Baldassini, W. A., Chiaratti, M. R., Pandey, A. K., Torrecilhas, J. A., Torres, R. N. S., Ribeiro, R. V., Lanna, D. P. D., Pereira, G. L., Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., & Machado Neto, O. R. (2023b). Skeletal muscle gene expression and meat quality of F1 Angus–Nellore young steers and bulls feedlot finished. *Livestock Science*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105151>
- Savell, J. W., Mueller, S. L., & Baird, B. E. (2005). The chilling of carcasses. *Meat Science*, 70(3), 449–459. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2004.06.027>
- Scapol, R. S., Baldassini, W. A., Gagaoua, M., Ramírez-Zamudio, G. D., Ladeira, M. M., Poleti, M. D., Ferraz, J. B. S., Torres, R. de N. S., Torrecilhas, J. A., Pereira, G. L., Machado-Neto, O. R., Curi, R. A., & Chardulo, L. A. L. (2023). Muscle proteome of crossbred cattle that received vitamin A at birth: impacts on meat quality traits. *Livestock Science*, 275, 105316. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105316>
- Severino, M., Gagaoua, M., Baldassini, W., Ribeiro, R., Torrecilhas, J., Pereira, G., Curi, R., Chardulo, L. A., Padilha, P., & Neto, O. M. (2022). Proteomics Unveils Post-Mortem Changes in Beef Muscle Proteins and Provides Insight into Variations in Meat Quality Traits of Crossbred Young Steers and Heifers Raised in Feedlot. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12259. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012259/S1>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Silva, L. H. P., Rodrigues, R. T. S., Assis, D. E. F., Benedeti, P. D. B., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.004>
- Venkata Reddy, B., Sivakumar, A. S., Jeong, D. W., Woo, Y. B., Park, S. J., Lee, S. Y., Byun, J. Y., Kim, C. H., Cho, S. H., & Hwang, I. (2015). Beef quality traits of

heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. In *Animal Science Journal* (Vol. 86, Issue 1, pp. 1–16). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/asj.12266>

Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Cundiff, L. V., & Dikeman, M. E. (1994). Effects of Cooking and Shearing Methodology on Variation in Warner-Bratzler Shear Force Values in Beef ¹/₂. *Journal Animal Science*, 73, 2325–2330. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/72/9/2325/4632721>

Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (1996). Sampling, Cooking, and Coring Effects on Warner-Bratzler Shear Force Values in Beef ¹/₂. *Journal of Animal Science*, 74, 1553–1562. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/74/7/1553/4633776>

Zou, B., Zhao, D., He, G., Nian, Y., Da, D., Yan, J., & Li, C. (2020). Acetylation and Phosphorylation of Proteins Affect Energy Metabolism and Pork Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(27), 7259–7268. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01822>