

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

**QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS SUPERPRECOSES,
MISTIÇOS NELORE-MONTANA DE DIFERENTES
CLASSES SEXUAIS: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Mariane de Freitas Genari Severino

Zootecnista

2021

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

**QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS SUPERPRECOSES,
MESTIÇOS NELORE-MONTANA DE DIFERENTES CLASSES
SEXUAIS: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Mariane de Freitas Genari Severino

Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

Coorientador: Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini

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

2021

S498q	Severino, Mariane de Freitas Genari Qualidade da carne de bovinos superprecoces, mestiços Nelore-Montana de diferentes classes sexuais: uma abordagem proteômica / Mariane de Freitas Genari Severino. – Jaboticabal, 2021 41 p. : Il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Otávio Rodrigues Machado Neto Coorientador: Welder Angelo Baldassini 1. Qualidade da carne. 2. Proteoma. 3. Bovino de corte. 4. Classe sexual. I. Título.
-------	--

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS SUPERPRECOSES, MISTIÇOS NELORE-MONTANA DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

AUTORA: MARIANE DE FREITAS GENARI SEVERINO

ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO

COORDINADOR: WELDER ANGELO BALDASSINI

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

Welder Angelo Baldassini

Pós-doutorando WELDER ANGELO BALDASSINI (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu

Welder Angelo Baldassini

Prof. Dr. ERIC HAYDT CASTELLO BRANCO VAN CLEEF (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia / UFTM / Iturama/MG

Welder Angelo Baldassini

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

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANE DE FREITAS GENARI SEVERINO – Nascida na cidade de Catanduva – SP, no dia 29 de outubro de 1992. Filha de Marcos Genari Severino e Maria Minervina de Freitas Genari Severino (*in memoriam*). Zootecnista, graduada pela Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, em 2017. Realizou intercâmbio acadêmico na modalidade graduação sanduíche no período de 2013 a 2014, nos Estados Unidos em parceria com o A.C.E. Language Institute e University of Rhode Island - URI. Trabalhou como Zootecnista na gestão de controles administrativos e zootécnicos em fazendas do Grupo Rezende e Novapec, no Mato Grosso, de 2017 a 2018. Mestre em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – FCAV, em 2021. Atualmente é doutoranda em Ciência Animal pela mesma Universidade.

“Tenha coragem de seguir seu coração e sua intuição.

De alguma forma, eles já sabem o que você realmente quer se tornar.”

(Steve Jobs)

“Estudar não é um ato de consumir ideias, mas de criá-las e recriá-las.”

(Paulo Freire)

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.”

(Confúcio)

DEDICO...

À minha mãe Maria Minervina de Freitas Genari Severino, que não participou desta etapa em vida, mas que sempre foi minha maior incentivadora e exemplo a seguir. Agradeço imensamente por tudo, por me ensinar a lutar com fé, paciência, perseverança e determinação para vencer as adversidades da vida. Eu estou aqui por ti, e seu exemplo sempre será meu guia! A saudade e meu amor por ti são eternos minha mãe!

OFEREÇO...

Ao meu pai Marcos Genari Severino, a minha irmã Marina de Freitas Genari Severino, a minha avó Celia Genari, ao meu tio José Luiz Magalhães de Freitas, a minha madrinha Marinete Andrade, ao meu companheiro Wendell Queiroz Leite. Minha imensa gratidão a vocês por todo apoio, incentivo, atenção e amor ao longo dessa jornada. O título é meu, mas a conquista é nossa! Amo vocês!

Aos Professores que ensinam, estimulam o pensamento crítico e incentivam a transformação de seus alunos de alguma maneira... Vocês merecem todo respeito e gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meu caminho e me permitir chegar até aqui!

À minha família, em especial a minha mãe Maria Minervina (*in memoriam*), meu pai Marcos, minha irmã Marina, minha avó Célia, meu tio José Luiz, minha madrinha Marinete. Muito obrigada por todo apoio, incentivo e ensinamentos ao longo da jornada. Vocês fazem parte desta conquista!

Ao meu companheiro Wendell, por todo apoio, atenção, amor e respeito, em todos os momentos! Agradeço também pela ajuda nas análises laboratoriais e por ser meu parceiro ao longo dessa jornada. Conte sempre comigo! À Neide Alves Queiroz e ao Senhor Bernardino Queiroz de Souza.

Aos amigos pela parceria e amizade, em especial, à Bruna Bianqui, Bruna Smaniotto, Douglas Henrique Silva, Kilmer Oliveira, Larisse Borges, Deusilane Gomes, Lucas Ruiz e Flora Contin. Levo vocês no meu coração!

Ao meu orientador, Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, pela oportunidade de aprendizado e toda confiança depositada para realização desta pesquisa.

Ao meu coorientador, Dr. Welder Angelo Baldassini por todo suporte nas análises iniciais, análise estatística, direcionamento e disponibilidade.

Aos colegas do grupo Nuppec por toda colaboração direta ou indireta.

À toda equipe do Dr. Pedro de Magalhães Padilha, em especial ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira, agradeço a parceria e suporte nas análises laboratoriais de proteômica.

Aos Professores, Dr. Luis Artur Loyola Chardulo e Dr. Eric Haydt Castello Branco van Cleef por aceitarem participar das bancas de qualificação e defesa e contribuírem imensamente com seus conhecimentos.

À Dra. Josiane Fonseca Lage e a empresa Trouw Nutrition Brasil pela parceria e apoio à esta pesquisa.

Aos Professores que participaram ao longo da minha trajetória acadêmica e profissional, em especial, ao Dr. Antônio Rodrigues da Silva, Dra. Fernanda Macitelli Benez e Dr. Welton Batista Cabral.

À UNESP e UFMT por me proporcionarem oportunidades e capacitação.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E enfim, agradeço a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira ao longo dessa jornada. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Bovinocultura de corte.....</i>	<i>2</i>
2.2 <i>Classe sexual e imunocastração.....</i>	<i>3</i>
2.3 <i>Proteômica e principais técnicas utilizadas</i>	<i>4</i>
2.4 <i>Proteômica aplicada à qualidade de carne</i>	<i>6</i>
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 <i>Animais e coleta de amostras</i>	<i>9</i>
3.2 <i>Análises físico-químicas.....</i>	<i>10</i>
3.2.1 <i>pH e coloração instrumental</i>	<i>10</i>
3.2.2 <i>Perda por cocção e força de cisalhamento.....</i>	<i>10</i>
3.2.3 <i>Composição centesimal.....</i>	<i>11</i>
3.3 <i>Análise Proteômica</i>	<i>11</i>
3.3.1 <i>Extração e precipitação e das proteínas.....</i>	<i>11</i>
3.3.2 <i>Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)</i> <i>.....</i>	<i>12</i>
3.3.3 <i>Tratamento de imagem.....</i>	<i>12</i>
3.3.4 <i>Digestão trípica dos spots proteicos e identificação de proteínas por</i> <i>ESI-MS.....</i>	<i>13</i>
3.4 <i>Análise estatística.....</i>	<i>13</i>
4. RESULTADOS	14
4.1 <i>Características de carcaça, composição centesimal e propriedades físico-</i> <i>químicas</i>	<i>14</i>
4.2 <i>Proteômica</i>	<i>16</i>

5. DISCUSSÃO.....	20
5.1 <i>Proteínas associadas ao teor de gordura intramuscular</i>	20
5.1.1 <i>Proteínas de transporte</i>	20
5.1.2 <i>Proteínas do metabolismo de carboidratos</i>	20
5.2 <i>Proteínas associadas à capacidade de retenção de água</i>	21
5.2.1 <i>Proteínas estruturais e metabólicas</i>	21
5.2.2 <i>Proteína de choque térmico e do metabolismo da creatina</i>	22
6. CONCLUSÕES.....	22
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	23
8. IMPLICAÇÕES	27

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Qualidade de carne e perfil proteômico do músculo L.dorsi de novilhas e novilhos imunocastrados." **Protocolo CEUA 0107/2018**, a ser conduzido por Mariane de Freitas Genari Severino, 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	01/01/2019 a 10/03/2020
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS /
Raça	F1 NELORE-MONTANA
Nº de animais machos	14
Nº de animais fêmeas	14
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	60
Peso médio de animais fêmeas	50
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 1 mes(es) e 10 dia(s).
Procedência	Rebanho da FMVZ-UNESP-Botucatu

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



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

QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS SUPERPRECOSES, MISTIÇOS NELORE-MONTANA DE DIFERENTES CLASSES SEXUAIS: UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

RESUMO - Objetivou-se com esta pesquisa identificar proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LT) e sua associação com características físico-químicas encontradas da carne maturada de novilhas versus novilhos F1 Nelore-Montana, superprecoces e terminados em confinamento. Foram avaliadas características da carcaça (peso de carcaça quente, rendimento e espessura de gordura subcutânea), composição química (teor de umidade, gordura intramuscular, proteína, colágeno total) e características de qualidade da carne como força de cisalhamento (FC), perdas por cocção, coloração instrumental (L^* ; a^* ; b^*) e pH, considerando-se três tempos de maturação (3, 10, 17 dias *postmortem*). Amostras individuais do músculo LT foram coletadas pré rigor mortis para estudo do proteoma utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massa por ionização por eletrospray (ESI-MS). Interações entre a classe sexual e o tempo de maturação foram analisadas sobre as características de qualidade da carne. Adicionalmente, estudos de imagem dos géis 2D-PAGE foram avaliados, sendo selecionados “spots” proteicos diferencialmente expressos ($P < 0,05$) para caracterização de proteínas por ESI-MS. Observou-se que o teor de gordura intramuscular (GIM) da carne foi 63,6% maior ($P < 0,01$) nas novilhas comparados aos novilhos. Já as perdas por evaporação (PPE) foram 10,22% menor para as novilhas. No entanto, nenhuma diferença foi observada ($P > 0,05$) sobre as demais características da carne (FC, L^* , a^* , b^* e pH) entre as classes sexuais. No estudo do proteoma muscular, vinte e três proteínas foram identificadas entre os grupos biológicos ($P < 0,05$). Para as novilhas, houve maior expressão de proteínas de ligação (ALVA, GLNG, TF, MYBPC1), metabolismo de carboidratos (ALDOA, GAPDH, PKM), defesa/proteção celular (HSPA8, CA3), metabolismo da creatina (CKM) e contração muscular/regulação (TNNT1, TNNT2). Esses resultados possivelmente refletem maior capacidade oxidativa em relação aos novilhos. Nestes, houve maior expressão de proteínas relacionadas à contração muscular/regulação (ACTA1, TPM2, TNNT3), ao metabolismo de carboidratos (ENO1, ENO3, PYGM, PGM1, TPI1) e de energia (ATP5F1B, PEBP1, AK1). Os resultados indicam antecipação do *rigor mortis* no músculo dos novilhos. A identificação de diferenças de expressão proteica por abordagem proteômica (2D-PAGE + ESI-MS) foram associadas ao metabolismo energético e melhor resposta ao estresse oxidativo dos animais, auxiliando na compreensão das diferenças fenotípicas observadas na qualidade da carne. Os resultados do proteoma foram associados ao maior teor de GIM e, possivelmente, a capacidade de retenção de água do tecido muscular das novilhas em comparação a machos castrados.

Palavras-chave: Carcaça, classe sexual, espectrometria de massas, maturação, 2D-PAGE

MEAT QUALITY OF YOUNG NELORE-MONTANA CROSSBREED CATTLE FROM DIFFERENT SEXUAL CLASSES: A PROTEOMIC APPROACH

ABSTRACT - The objective of this research was to identify differentially expressed proteins in the *Longissimus thoracis et lumborum* (LT) muscle and its association with physico-chemical characteristics of aged meat for young F1 Nelore-Montana heifers and steers finished in feedlot. Carcass characteristics (hot carcass weight, yield, and backfat thickness), chemical composition (moisture content, intramuscular fat, protein, total collagen) and meat quality characteristics such as shear force (SF), cooking loss (CL), instrumental color (L^* ; a^* ; b^*) and pH, considering three aging time (3, 10, 17 days *post-mortem*) were evaluated. Individual samples of LT muscle were collected pre rigor mortis to study the proteome using two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Interactions between sexual class and aging time were analyzed on the meat quality characteristics. Additionally, image studies of 2D-PAGE gels were evaluated with differentially expressed protein spots ($P < 0.05$) being selected for protein characterization by ESI-MS. Intramuscular fat content (IMF) was 63.6% higher ($P < 0.01$) in the meat of heifers compared to steers. Evaporative losses (EL) were 10.22% lower for heifers. However, no difference was observed ($P > 0.05$) regarding to other characteristics of the meat (SF, L^* , a^* , b^* and pH) between sexual classes. In the study of muscle proteome, twenty-three proteins were identified between biological groups ($P < 0.05$). In heifers, there was a higher expression of binding proteins (ALVA, GLNG, TF, MYBPC1), carbohydrate metabolism (ALDOA, GAPDH, PKM), defense/protection cellular (HSPA8, CA3), creatine metabolism (CKM) and muscle contraction/regulation (TNNT1, TNNI2). These results possibly reflect a greater oxidative capacity compared to steers. In these, there was a higher expression of proteins related to muscle contraction/regulation (ACTA1, TPM2, TNNT3), carbohydrate metabolism (ENO1, ENO3, PYGM, PGM1, TPI1) and energy (ATP5F1B, PEBP1, AK1). These results indicate anticipation of rigor mortis in steers. The identification of differences in protein expression by a proteomic approach (2D-PAGE + ESI-MS) were associated with energy metabolism and better response to oxidative stress leading to understanding the phenotypic differences observed in meat quality. Proteome results were associated with a higher IMF content and, possibly water holding capacity in the muscle tissue of heifers compared to steers.

Keywords: Aging, carcass, mass spectrometry, sexual class, 2D-PAGE

1. INTRODUÇÃO

A carne é um alimento de grande importância para a saúde humana, pois fornece proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais, entre outros nutrientes (Klurfeld, 2018). A qualidade da carne é afetada pelos mecanismos bioquímicos e metabólicos que ocorrem durante a transformação músculo-carne. Esses incluem principalmente redução do pH, degradação de proteínas miofibrilares, oxidação e modificação pós-traducional de proteínas (Huang et al., 2020).

Embora amplamente pesquisados, alguns desses mecanismos não são completamente compreendidos, e desenvolver estudos sobre o processo bioquímico e molecular é fundamental (Nair e Zhai, 2020). A proteômica tem sido amplamente utilizada para identificação de proteínas relacionadas às características de qualidade da carne, posto que as proteínas são os principais constituintes do tecido muscular e responsáveis pela regulação das rotas metabólicas (D'Alessandro e Zolla, 2013; Lana e Zolla, 2017).

Estudos recentes sobre qualidade de carne com abordagem proteômica avaliaram diferentes características como maciez, marmoreio e capacidade de retenção de água (Di Luca et al., 2011; Baldassini et al., 2015; Rodrigues et al., 2017; Poleti et al., 2018; Picard et al., 2019; Silva et al., 2019). Entretanto, não existe estudo na literatura sobre qualidade da carne de novilhas e novilhos sobre o modelo de produção superprecoce e por uma perspectiva proteômica.

A classe sexual bovina é um fator importante no sistema produtivo, já que o crescimento e deposição dos tecidos exercem efeito sobre as características de carcaça e carne desses animais (D'occhio et al., 2001). Nesse contexto, nossa hipótese foi que as diferenças obtidas na carne maturada de novilhas e novilhos, em teor de gordura intramuscular e capacidade de retenção de água, podem ser explicadas pelas proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LT). Assim, objetivou-se identificar proteínas diferencialmente expressas no músculo LT, e sua associação às diferenças físico-químicas encontradas na carne maturada de novilhas e novilhos F1 Nelore-Montana, superprecoces e terminados em confinamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bovinocultura de corte

As atividades relativas à pecuária bovina de corte no Brasil possuem grande destaque, dado que o país possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo o segundo maior produtor. A principal característica no desenvolvimento dessa atividade no país é a heterogeneidade nos sistemas de produção e nos mecanismos de gestão e de comercialização de bovinos de corte (Carvalho e Zen, 2017).

O rebanho bovino brasileiro é de 214,7 milhões, representando 13% do rebanho mundial. O rebanho está distribuído numa área de 162,53 milhões de hectares, com 43,3 milhões de bovinos abatidos em 2019 e produção de 10,5 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC). Do total de animais abatidos, 14% ou 6,09 milhões é proveniente do sistema de confinamento. Da produção total de TEC, cerca de 76,3% abasteceram o mercado interno e 23,6% restante foram destinadas ao mercado externo. O sistema agroindustrial da carne bovina movimentou R\$618,50 bilhões com aumento de 3,5% em relação a 2018, sendo de grande importância para a economia do país. O PIB da pecuária de corte representou 8,5% do PIB total do Brasil (Abiec, 2020).

Nas condições brasileiras é de interesse o cruzamento de animais zebuínos (*Bos indicus*) com animais taurinos (*Bos taurus*) ou compostos obtidos do cruzamento de ambos com o objetivo de unir principalmente a adaptabilidade, boa habilidade materna e maior resistência a parasitos do zebuíno com a maior precocidade, maior potencial de crescimento e melhor acabamento de carcaça do taurino (Euclides filho, 1997). Entre as raças zebuínas, a Nelore predomina, a qual representa mais de 80% do rebanho de corte brasileiro e possui características importantes como rusticidade, resistência a ecto e endo parasitas, tolerância ao calor (Oliveira et al., 2002).

Já o Composto Montana é formado da combinação de raças provenientes de quatro diferentes tipos biológicos denominado NABC. O “N”, indica o tipo biológico zebuíno, cuja raça predominante no Brasil, é a Nelore. o “A” indica adaptado aos trópicos, cujas raças são Bonsmara, Belmont, Red, Romo, Sinuano e Senepol, proveniente das famílias Sanga – África e das linhas Criolas – América do Sul. O “B” indica origem britânica, cujas raças são Red, Angus, South e Devone e o “C” indica

origem do continente Europeu com as raças Simental e Gelbvieh (Sumário Montana, 2020).

Aliado ao cruzamento, o modelo de produção superprecoce é determinante para explorar ao máximo o fenótipo. Este modelo caracteriza-se por um conjunto de ferramentas que possibilita o abate do animal até os 15 meses de idade (Encarnação e Silva, 2003). No presente estudo, as ferramentas adotadas foram o cruzamento Nelore-Montana, confinamento em dieta de alta energia e imunocastração. Assim, este modelo permitiu o abate de animais jovens e com carne de qualidade para as avaliações da carcaça, composição centesimal do músculo, propriedades físico-químicas e análises proteômicas.

2.2 Classe sexual e imunocastração

Vários fatores com destaque para o grupo genético, idade, nível nutricional e classe sexual influenciam o padrão de deposição dos tecidos e constituintes corporais (Lohman, 1971; Coleman et al., 1993). A curva de crescimento de bovinos pode ser dividida em duas fases: a de aceleração, quando a deposição de tecido muscular é mais intensa, e a fase de desaceleração, que ocorre após a puberdade, quando a deposição muscular atinge um ponto máximo e o animal passa a depositar gordura de forma mais intensa (Owens et al., 1993).

Um fator importante do sistema de produção bovino é a classe sexual dos animais utilizados. Bovinos machos não castrados (inteiros), machos castrados e fêmeas diferem quanto ao desempenho, as características de carcaça e a qualidade da carne, pois a classe sexual exerce um efeito direto sobre o crescimento dos tecidos, bem como sobre a distribuição dos mesmos na carcaça (D'occhio et al., 2001).

Em relação à deposição de gordura na carcaça, as fêmeas apresentam maior potencial para deposição de gordura e iniciam essa fase com pesos menores que os machos castrados e estes com pesos menores que os machos não castrados (Berg e Butterfield, 1976). As fêmeas são mais precoces e geralmente apresentam menor tamanho corporal, enquanto os machos não castrados são maiores e mais tardios, e os machos castrados têm desenvolvimento intermediário (Luchiari Filho, 2000).

Animais castrados apresentam maior deposição de tecido adiposo, maior proporção do quarto traseiro e menor pH nas carcaças em comparação com animais não castrados (Freitas et al., 2008). Apesar dos benefícios nas características de carcaça, a castração cirúrgica, procedimento mais comum, pode resultar em perdas para os sistemas de produção animal, causando dor e estresse no animal, com consequente redução no desempenho pós-castração (Moreira et al., 2018). Assim, a vacina de imunocastração é uma alternativa à castração cirúrgica, facilitando o manejo dos bovinos por controlar o comportamento sexual, promovendo maior bem-estar animal e aumentando o potencial de produção, com melhoria da qualidade da carne (Roça et al., 2011).

2.3 Proteômica e principais técnicas utilizadas

Com o sequenciamento do genoma humano (conjunto de todos os genes) os pesquisadores passaram descrever também o sequenciamento das proteínas que atuam no organismo, já que estas controlam as funções (Escobar e Miranda, 2001). Surgiu então a proteômica, com o intuito de entender a genômica pelo estudo de proteínas. Embora a proteômica tenha ganhado destaque nos últimos anos, o termo proteoma é relativamente novo e se refere ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (Wasinger et al., 1995). Neste contexto, a proteômica é a ciência que estuda sistematicamente um proteoma (Park, 2004), permitindo avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no metabolismo celular (Chen e Harmon, 2006).

Definido como o conjunto de todas as proteínas existentes em um fenótipo molecular específico, o proteoma é dinâmico, pois sofre mudanças influenciadas pelo ambiente. Portanto, é possível se obter mais informação do organismo animal estudando o seu proteoma (Lanças et al., 2003). Com área de atuação ampla, a proteômica abrange identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos, fluidos biológicos, análises de mudança de expressão normal das proteínas em comparação à expressão em células doentes, caracterização de modificações pós-traducionais, estudo de interação entre proteínas, entre outras funções (Beranova-giorgianni, 2003). Consequentemente, a identificação de proteínas expressas diferencialmente permite a associação destas moléculas com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (Kormuták et al., 2006).

Para condução destes estudos, técnicas como a eletroforese e espectrometria de massas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas para quantificação e caracterização de proteínas, respectivamente. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) se destaca por apresentar fragmentação adequada das proteínas, possibilitando análise com segurança e precisão dos “spots” revelados, além de permitir a resolução simultânea de centenas de proteínas. Isso só é possível pelo fato desse processo ser baseado em duas etapas diferentes: primeira e segunda dimensão, levando em consideração características independentes das proteínas – ponto isoelétrico e massa molar – para se obter uma separação eficiente (Beranova-Giorgianni, 2003; Odonnella et al., 2004).

O espectrômetro de massas possui uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. É um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando campos eletromagnéticos para isso. Os tipos de ionização mais empregadas em análise de proteínas são a MALDI (ionização por dessorção a laser assistida por matriz) e a ESI (ionização por electrospray) e os tipos básicos de analisadores de massas são o ion trap (IT), o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (TOF) (Giron et al., 2011).

A ionização por dessorção a laser (MALDI-MS), é comumente usada para a caracterização de misturas relativamente simples de peptídeos ou proteínas; é relativamente resistente à interferência com tampões comumente usados em química de proteínas (por exemplo, fosfato, Tris, ureia etc.) e produz espectros de massa que são simples de interpretar devido a tendência do método de gerar íons predominantemente carregados individualmente. Por outro lado, a ionização por eletrospray (ESI-MS), tem como característica mais importante a geração de íons com carga múltipla. Este recurso permite a detecção de proteínas também usando analisadores com faixa de massa limitada, por exemplo quadrupolo e íon trap (Cunsolo et al., 2014).

Desde seu surgimento, ESI-MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Dentre as vantagens estão: alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma ampla variedade

de substâncias pode ser analisada, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (Loo, 2000; Heck e Van Den Heuvel, 2004).

2.4 Proteômica aplicada à qualidade de carne

Em particular, a combinação bem-sucedida entre proteômica e ciência da carne, gerou um avanço para a compreensão profunda dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de conversão do músculo em carne (Wu et al., 2016). A qualidade final da carne é geralmente afetada por mudanças fisiológicas, bioquímicas e metabólicas que ocorrem durante a transformação do músculo em carne. Essas mudanças incluem principalmente a diminuição no pH, degradação de proteínas miofibrilares, oxidação de proteínas e modificação pós-traducional de proteínas (Warner, 2016; Ouali et al., 2006).

Métodos convencionais para avaliação da maciez, cor, capacidade de retenção de água e pH da carne são determinados por diferentes equipamentos. No entanto, os resultados servem apenas para avaliar a qualidade de carne no momento da análise, ou seja, essas ferramentas não são capazes de determinar os mecanismos que influenciam as mudanças na qualidade da carne ou tampouco prever a qualidade da carne no futuro (Huang et al., 2020). Por outro lado, os biomarcadores de características de qualidade da carne refletem as diferentes vias biológicas, e ajudam a descrever o processo de conversão do músculo em carne. Biomarcadores são componentes moleculares de processos biológicos que mostram expressão diferencial associada ao fenótipo de uma característica específica (Pas et al., 2017).

Neste contexto, estudos do proteoma muscular de fenótipos de interesse para qualidade de carne como a maciez, cor e suculência em diferentes espécies são conduzidos para compreender a regulação dessas características pela perspectiva molecular.

Kim et al. (2008) compararam o tecido muscular de bovinos Hanwoo com carne de alta e baixa qualidade baseada em escala de qualidade de carne Coreana. Os parâmetros da escala foram baseados no escore de gordura intramuscular, cor e gordura da carne, maturidade e textura e seis machos castrados classificados como alta qualidade versus seis touros classificados como baixa qualidade de carne foram

selecionados para as análises. Utilizou-se das técnicas de 2D-PAGE e ESI-MS e quatro proteínas diferencialmente expressas foram identificadas nos diferentes grupos. A expressão de alfa actina foi maior em carne de alta qualidade, que apresentou maciez objetiva significativa ($P < 0,01$) e os níveis de expressão da proteína 1 do complexo T (TCP-1), proteína de choque térmico beta-1 (HSP27), e receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1 (IP3R1) foram maiores na carne bovina de baixa qualidade. Os dados sugerem que os padrões de expressão da HSP27 e IP3R1 foram correlacionados com maciez, gordura intramuscular e cálcio livre e são potenciais biomarcadores de qualidade da carne.

Shen et al. (2012) investigaram proteínas associadas ao escore de marmoreio do músculo LT de bovinos Hanwoo, com 24 meses de idade ao abate, para selecionar potenciais biomarcadores para qualidade da carne por meio de análises proteômicas comparativas. As proteínas foram separadas por 2D-PAGE e sete “spots” proteicos para o grupo de alto score de marmoreio foram identificadas correspondendo a mudanças significativas na expressão em comparação com o grupo de baixo escore de marmoreio. Quatro proteínas com aumento da intensidade no grupo de alto escore de marmoreio foram identificadas como Fosfoglicerato quinase 1, Triosefosfato isomerase, Fosfoproteína PO ribossomal ácida e proteína de cobertura (filamento de actina) Z-line alfa 2. Três proteínas com intensidades diminuídas no grupo com alto score de marmoreio foram identificados como 14-3-3 epsilon, anidrase carbônica II e miosina de cadeia leve 1.

No Brasil, em estudo metaloproteômico realizado por Baldassini et al. (2015), comparou-se o tecido muscular de bovinos Nelore com diferentes graus de maciez (carne dura e carne macia) utilizando técnicas como eletroforese bidimensional (separação das proteínas e spots proteicos - 2D-PAGE), fluorescência de raios X (identificação de íons cálcio nos spots proteicos diferencialmente expressos – XRF) e espectrometria de massas (caracterização das proteínas - ESI-MS). Entre as proteínas identificadas no estudo como diferencialmente expressas, duas delas, piruvato quinase e albumina foram relacionadas às diferenças fenotípicas de maciez dos grupos experimentais.

Em outro estudo proteômico realizado por Carvalho et al. (2014) comparou-se o tecido muscular de machos da raça Nelore criados em sistema de pastejo e terminados em confinamento, com diferentes graus de maciez objetiva (valores de força de cisalhamento altos e baixos). Utilizou-se das técnicas 2D-PAGE e ESI-MS para identificação das proteínas diferencialmente expressas. Dezesete “spots” diferencialmente expressos ($P < 0,05$) foram observados entre os dois grupos e 13 proteínas identificadas, as quais incluíram proteínas estruturais (alfa actina-1, MLC1, MLC3, MLC2F e tropomiosina); relacionadas à organização celular (HSPB1 e HSP70); ao metabolismo (beta-LG, ACBD6, complexo III subunidade I) e algumas proteínas não caracterizadas.

Silva et al. (2019) avaliaram o proteoma e fosfoproteoma do músculo esquelético de machos não castrados e machos castrados da raça Nelore, em diferentes tempos de maturação (0, 1 e 14 dias postmortem). As proteínas identificadas foram principalmente relacionadas a contração muscular (ACTA1, ACTN3, MYL1, MYLPF, TNNT2 e TNNT1); rota da glicólise (ALDOA, GAPDH, PGK1, TPI1); metabolismo do glicogênio (PGM1); fosforilação oxidativa (ATP5B); defesa celular (HSPC70); metabolismo da creatina (CKM) e citoproteção (CA3). A castração influenciou no aumento da expressão de enzimas glicolíticas, enquanto a proteína de fosforilação oxidativa (ATP5B) teve menor expressão. Além disso, a castração influenciou no aumento da isoforma rápida da troponina T (TNNT3), enquanto a isoforma lenta (TNNT1) tendeu a diminuir. No geral, os resultados demonstraram que a abundância e fosforilação de enzimas glicolíticas estão associadas com mudanças na maciez da carne e na gordura intramuscular.

A identificação precisa de biomarcadores para os atributos de qualidade da carne podem construir uma melhor compreensão das vias biológicas e ajudar a elucidar os mecanismos moleculares complexos envolvidos no desenvolvimento da qualidade da carne (Huang et al., 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos adotados neste experimento foram aprovados pela comissão de ética no uso dos animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, sob o protocolo 0107/2018.

3.1 Animais e coleta de amostras

Dezesseis bovinos Nelore × Montana (8 novilhas e 8 novilhos), imunocastrados, filhos do mesmo touro foram terminados em confinamento experimental da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus Botucatu, no período de dezembro de 2018 a abril de 2019. Todos os animais receberam a mesma dieta, alojamento em baias coletivas e três doses da vacina de imunocastração (Bopriva®) ao longo do período de terminação. A dieta ofertada (% MS) foi composta de 15% de volumoso (bagaço de cana) e 85% de concentrados (64% de milho, 17% de farelo de soja e 4% de núcleo). A primeira dose da vacina foi aplicada 30 dias após a desmama (aos 8 meses de idade); a segunda dose, 30 dias após a primeira dose e a terceira dose aplicada 90 dias após a segunda. Os animais foram pesados (peso corporal - PC) ao final do período experimental e abatidos aos 15 meses de idade em frigorífico comercial no município de Boituva – SP, localizado a 120 km do local em que o experimento foi conduzido, seguindo os procedimentos de inspeção federal, sendo precedido de jejum hídrico e alimentar por 16 horas.

Após o abate, as carcaças foram pesadas individualmente para registro do peso da carcaça quente (PCQ) e do rendimento de carcaça (RC), que foi calculado através do PC e PCQ ($RC = PCQ / PC \times 100$). Amostras individuais (aproximadamente 2 g) do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* (LT) foram coletadas da meia carcaça direita entre a 12^a e 13^a vertebra torácica, 20 minutos após o abate (pré *rigor mortis*) e congeladas em nitrogênio líquido. Essas amostras do músculo LT foram armazenadas posteriormente em ultrafreezer (-80° C) até a utilização para análises proteômicas. As carcaças foram resfriadas por aproximadamente 48 horas, à temperatura de 1°C. Em seguida, na desossa (48h de resfriamento), a espessura de gordura subcutânea (EGS) foi mensurada com paquímetro, entre a 12^a e 13^a vertebra torácica no músculo LT e as peças foram coletadas e posteriormente porcionadas em bifes de 2,54 cm para análises físico-químicas, sendo o primeiro bife entre a 12^a e 13^a costela e os outros no sentido crânio-caudal da peça.

3.2 Análises físico-químicas

O pH, coloração instrumental, perda por cocção e força de cisalhamento foram mensurados conforme os períodos de maturação (3, 10 e 17 dias *postmortem*). A maturação foi conduzida em incubadora refrigerada BOD, modelo TE – 371 da TECNAL conduzida à temperatura de 0 a 2°C, em sacos plásticos especiais para alto vácuo e baixa permeabilidade ao oxigênio.

3.2.1 pH e coloração instrumental

O pH foi determinado com o medidor de pH digital Hanna (Modelo HI 99163, Hanna Instruments, Woonsocket, RI) dotado de eletrodo de penetração. O medidor de pH foi calibrado com tampões padrão de pH 4,0 e 7,0. No mesmo bife, a coloração da carne (L^* = luminosidade; a^* = intensidade de vermelho; b^* = intensidade de amarelo) foi obtida do valor médio de três leituras para cada variável (L^* , a^* e b^*), após 30 minutos de oxigenação, pelo sistema CIELab do colorímetro CR-400 (fonte de luz A, ângulo de absorbância 10°, display Y: 0,01 a 160% de refletância, Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão). A calibração do colorímetro foi realizada com placa padrão preta e branca e os procedimentos descritos conforme Cañeque et al (2004) e Baldassini et al. (2017).

3.2.2 Perda por cocção e força de cisalhamento

Para avaliação da perda por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC) adotou-se o procedimento proposto por Wheeler et al. (1994) e seguindo as recomendações da American Meat Science Association (AMSA, 2015). As amostras foram colocadas numa grelha acoplada à um refratário de vidro e um termopar acoplado a um termômetro digital modelo DT-612 (ATP Instrumentation, Ashby-de-la-Zouch, Inglaterra) no centro de cada amostra, para monitoramento da temperatura interna. As amostras foram assadas em forno industrial elétrico modelo Feri90 Venâncio (Venâncio Aires, Rio Grande do Sul, Brasil), pré-aquecido à 170°C e equipado com termostato para minimizar variações na temperatura. Quando a temperatura interna dos bifos atingiu 40°C, eram virados e permaneciam no forno até atingirem 71°C. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos, pesadas e refrigeradas a 4°C por 24 horas. A perda por cocção (PPC) foi dividida em perda por evaporação (PPE) e perda por gotejamento (PPG), determinadas em percentagem. A PPG foi obtida pesando-se somente o refratário

antes e após a cocção da amostra. A PPE foi obtida pesando-se a amostra antes (PI) e após (PF) a cocção, pelo cálculo ($PPE = PF - PI / PF \times 100$).

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

3.2.3 Composição centesimal

Para avaliação da composição centesimal, as amostras foram descongeladas em geladeira, a 4 °C por 24 horas e com o auxílio de bisturi retirou-se a gordura subcutânea. Em seguida, o bife foi moído em um multiprocessador por 5 minutos, sendo utilizados aproximadamente 180 g de amostra (Anderson, 2007). As análises foram conduzidas por espectroscopia de infravermelho, em equipamento FoodScan™ (Foss NIRSystems, Inc., USA), no qual determinou-se os teores médios de umidade, proteína, gordura e colágeno total.

3.3 Análise Proteômica

Os procedimentos metodológicos da análise proteômica foram conduzidos conforme Vieira (2014) e Baldassini (2015), com mínimas adaptações.

3.3.1 Extração e precipitação e das proteínas

As amostras individuais do músculo LT, coletadas durante o abate (período pré rigor mortis) foram processadas individualmente para obtenção dos géis 2D-PAGE. Para cada tratamento (classe sexual), 8 amostras individuais e/ou replicatas biológicas foram utilizadas (8 géis de novilhos e 8 géis de novilhas) com 3 replicatas técnicas (3 géis para cada amostra), totalizando 48 géis. Para cada amostra, aproximadamente 0.2 g do músculo foi macerada com auxílio de almofariz e pistilo em 1 ml de água deionizada. Os extratos proteicos foram separados da parte sólida por 15 minutos de centrifugação a 10000 rpm, a 4°C. O conteúdo proteico desses extratos foi colocado em solução de acetona 80% (v/v) em geladeira, por 2 horas, para precipitação das proteínas. Em seguida, o processo de centrifugação foi repetido por 25 minutos, a 10000 rpm, para obtenção dos pellets de proteína para quantificação e eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

3.3.2 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A concentração de proteínas totais das amostras de tecido muscular bovino foi quantificada pelo método do Biureto (Gornall et al., 1949). Os valores das concentrações proteicas (CP) obtidos foram utilizados para calcular o volume de amostra e solução necessárias para eletroforese, considerando a massa proteica de 375 mg de proteína e volume de 250ul a ser aplicado na fita. O volume da amostra (VA) foi calculado pela seguinte fórmula ($VA = 375 / CP$ obtida). As amostras foram solubilizadas em solução contendo ureia; tiourea; (3-[(3-colaminopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato); anfólitos, azul de bromofenol e ditiotreitól, de modo que a solução final (amostra + solução) foi de 250 uL. A diluição final do pelete de cada amostra foi realizada de modo que a concentração de proteínas totais resultante fosse 1,5 µg/µL. A partir desta solubilização, para cada amostra, uma alíquota de 250 µL foi adicionada a fita de focalização isoeletrica de 13 cm com um imobilizado anfólito e com gradiente de pH de 3 a 10, para hidratação por 12 h. Após o período, as fitas foram submetidas à primeira etapa (1D) da eletroforese bidimensional, de focalização isoeletrica no aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), em que as proteínas foram fracionadas pelo ponto isoeletrico, valor do pH quando a carga líquida total da proteína é nula. As fitas foram colocadas em soluções de equilíbrio para redução, alquilação e submetidas à segunda etapa (2D) da eletroforese, para fracionamento dos “spots” proteicos de acordo com o peso molecular em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v). Finalizada a corrida 2D, aproximadamente 500 ml de corante Coomassie coloidal foi usado para marcar os spots proteicos dos géis e, após 72 h, estes foram descoloridos com água ultrapura.

3.3.3 Tratamento de imagem

Os géis foram digitalizados e as imagens importadas no programa ImageMaster Platinum, versão 7.0 para comparações (contrastos) de imagens entre os tratamentos e obtenção de informações como número de “spots” por gel, % de “*matching*” (correspondência entre os “spots” proteicos nos géis), ponto isoeletrico (pI), massa molar (MM) e volume dos “spots”. A correspondência (“*matching*”) dos géis dentro de cada amostra (três repetições técnicas) foi superior a 95%, demonstrando que 95% dos “spots” estavam presentes nas replicatas técnicas e houve boa reprodutibilidade.

Para as comparações de imagens, elencou-se um gel referência por tratamento (Paredi et al., 2019), que continha o maior número e melhor definição dos “spots”, e contrastou-se o gel referência de um tratamento com cada gel do outro tratamento, totalizando 15 comparações.

3.3.4 Digestão tríptica dos spots proteicos e identificação de proteínas por ESI-MS

Cinquenta “spots” proteicos diferencialmente expressos foram cortados dos géis com lâmina de bisturi, tratados em soluções de redução, alquilação, e submetidos à digestão com tripsina (Promega), de acordo com os procedimentos descritos por Vieira (2014). Os peptídeos obtidos na digestão foram purificados com ponteiras ZipTip Millipore® C18 e analisados em espectrômetro de massa com fonte ionização por eletrospray (ESI/MS), sistema nanoACQUITY UPLC-Xevo QTOF-MS (Waters, Manchester, UK). O banco de dados UniProt foi utilizado para identificar proteínas (<https://www.uniprot.org/>).

Para cada “spot” encontrou-se mais de uma proteína no banco de dados, sendo a maior parte destas consideradas isorformas e/ou fragmentos de uma proteína de maior massa molar, o que pode ocorrer no processo de caracterização por espectrometria de massas (Rison et al., 2000). Desta forma, assumiu-se um critério de seleção para fechamento da classe de proteína por “spot”, em que se considerou o maior score, cobertura e se comparou os dados de massa molar obtidos experimentalmente por 2D-PAGE, em relação à massa molar teórica obtida no banco de dados UniProt.

3.4 Análise estatística

Os dados das análises físico-químicas da carne e composição centesimal foram analisados quanto a homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos e expressos por médias e seus respectivos erros. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo Teste F, pelo procedimento GLM do SAS (versão 9.1, SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA), com teste de interação entre classe sexual e tempo de maturação. As comparações entre médias foram feitas pelo Teste Tukey e o valor $P < 0,05$ foi adotado como nível crítico de probabilidade. O delineamento foi inteiramente casualizado, segundo o modelo:

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

em que, Y_{ij} é o valor observado para a unidade experimental referente ao tratamento i na repetição j ; m é o efeito geral da média; t é o efeito do tratamento e ε é o erro experimental.

Para análise proteômica, após o tratamento de imagem, comparou-se as imagens entre tratamentos através do “*matching*” dos “spots” quanto à sua distribuição, volume, intensidade relativa, pls e MM, pelo programa Image Master 2-DE Platinum 7.0. O programa gerou uma ANOVA dentro das comparações entre tratamentos e os spots ($P < 0,05$) foram selecionados.

4. RESULTADOS

4.1 Características de carcaça, composição centesimal e propriedades físico-químicas

Para avaliar a qualidade da carne conforme a categoria sexual (novilhos e novilhas imunocastrados), foram mensuradas características de carcaça, composição centesimal e propriedades físico-químicas do músculo LT em diferentes períodos de maturação.

A espessura de gordura subcutânea (EGS) da carcaça de novilhas foi 46,8% superior em comparação à dos novilhos (Tabela 1). Peso corporal (PC), peso de carcaça quente (PCQ) e rendimento de carcaça (RC) não foram alterados entre as classes sexuais.

Tabela 1. Valores médios, erro-padrão da média (EPM) e probabilidade (p-valor) das variáveis de carcaça de acordo com a classe sexual

Variáveis	Novilho	Novilha	EPM	<i>p</i> -valor
PC (kg)	391.13	373.75	10.41	0.5722
PCQ (kg)	218.45	204.48	5.97	0.3411
RC (%)	55.82	54.81	0.00	0.5298
EGS (mm)	10.15	14.90	1.10	0.0453

PC: Peso corporal; PCQ: Peso de carcaça quente; RC: Rendimento de carcaça; EGS: Espessura de gordura subcutânea

Os teores de umidade e gordura foram diferentes entre as classes sexuais (Tabela 2). O teor de gordura intramuscular das novilhas foi 63,6% maior e o teor de umidade foi 2,22% menor em relação aos novilhos.

Tabela 2. Valores médios, erro-padrão da média (EPM) e probabilidade (p-valor) das variáveis de composição centesimal do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de acordo com a classe sexual

Variáveis	Novilho	Novilha	EPM	p-valor
Umidade (%)	74.07	72.46	0.26	0.0007
Proteína (%)	22.52	22.30	0.10	0.3209
Gordura (%)	2.64	4.32	0.29	0.0019
Colágeno (%)	1.20	1.22	0.02	0.7751

Não houve interação de classe sexual e tempo de maturação (Tabela 3). A perda por evaporação (PPE) foi 10,22% maior nos novilhos. Em contrapartida, a perda por gotejamento (PPG) foi 22,3% maior nas novilhas. Perdas por cocção (PPC), força de cisalhamento (FC), pH e luminosidade (L*) foram influenciadas pelo período de maturação (Tabela 3). Os valores de PPC e FC diminuíram ao longo do período de maturação.

Tabela 3. Valores médios, erro-padrão da média (EPM) e probabilidade (p-valor) das variáveis físico-químicas da carne, de acordo com a classe sexual (novilho e novilha) e período de maturação (três, dez e dezessete dias *postmortem*)

Variáveis	Novilho			Novilha			EPM	p-valor		
	3d	10d	17d	3d	10d	17d		CS	TM	CSxTM
PPE (%)	24.27	20.43	17.10	21.46	17.47	17.14	0.01	0.0094	<.0001	0.1574
PPG (%)	6.69	4.49	4.28	7.13	6.54	5.22	0.00	0.0223	0.0029	0.3810
PPC (%)	30.96	24.92	21.38	28.59	24.01	22.36	0.01	0.2449	<.0001	0.7591
L*	33.76	34.78	36.54	32.94	34.50	34.84	0.49	0.2378	0.0604	0.7528
a*	16.26	16.55	16.73	15.94	16.73	15.99	0.14	0.4478	0.5275	0.6294
b*	6.08	6.18	6.53	5.93	6.21	6.05	0.08	0.4150	0.6268	0.6852
FC (N)	55.70	40.40	31.28	54.42	40.79	37.26	3.62	0.4246	<.0001	0.3488
pH	5.60	5.71	5.73	5.60	5.68	5.75	0.02	0.6488	<.0001	0.6802

PPE: Perda por evaporação, PPG: Perda por gotejamento, PPC: Perda por cocção, L*: Luminosidade, a*: Intensidade de vermelho, b*: Intensidade de amarelo, FC: Força de cisalhamento, pH: potencial hidrogeniônico; CS: Classe sexual; TM: tempo de maturação (em dias *post-mortem*)

4.2 Proteômica

Nós utilizamos uma abordagem proteômica para quantificar e caracterizar as proteínas do músculo LT bovino através da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas (ESI/MS), respectivamente.

Com base no estudo de imagem, o número médio de “spots” proteicos por tratamento foi de 119 ± 25 para novilhos e 115 ± 32 para novilhas. O número de “spots” dos géis referência foram de 160 para novilhas e 150 para novilhos. Cinquenta “spots” foram caracterizados e após o critério de seleção adotado a partir do banco de dados ESI-MS, vinte e três proteínas diferencialmente expressas foram caracterizadas e encontram-se destacadas em azul nos géis referência para a classe de novilha (Figura 1) e novilho (Figura 2).

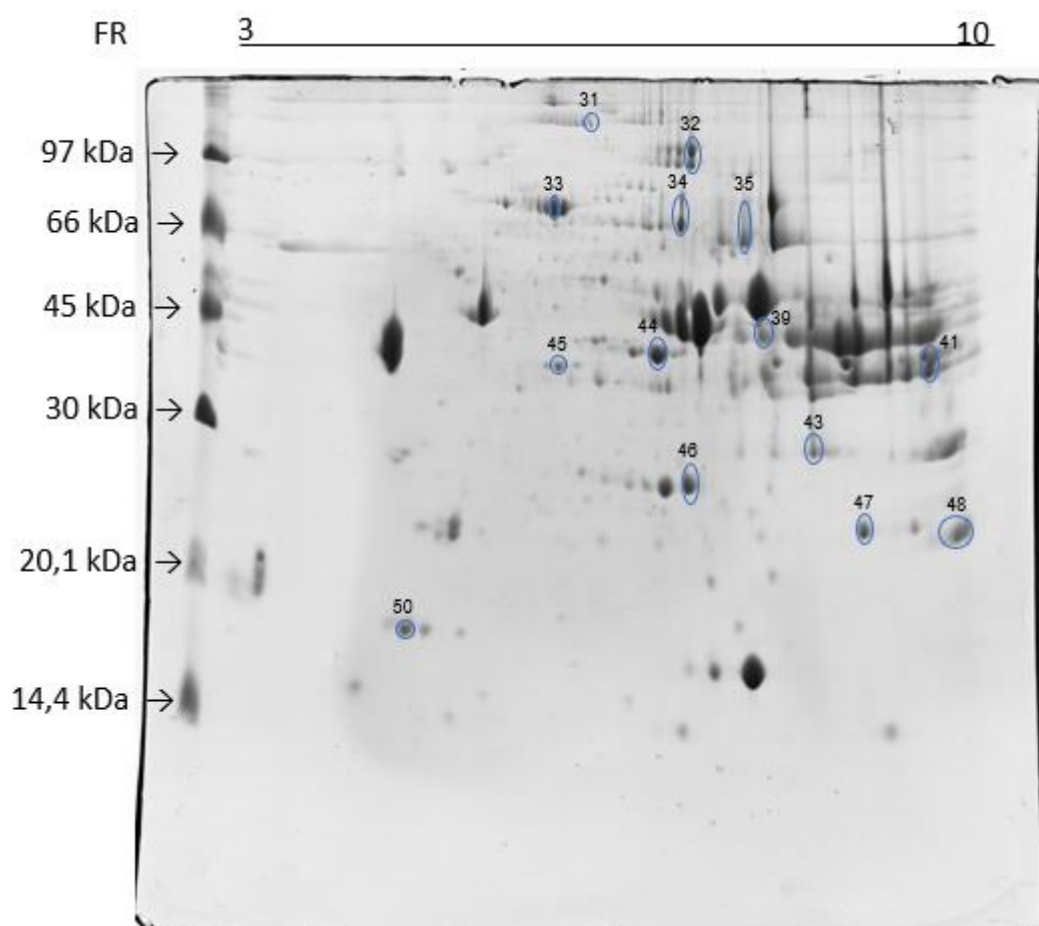


Figura 1. “Spots” proteicos caracterizados por ESI-MS em gel obtido por 2D-PAGE (12,5% (m/v), faixa de pH 3-10) para amostras do tecido muscular *Longissimus thoracis et lumborum* de novilha Nelore-Montana, superprecoce e imunocastrada.

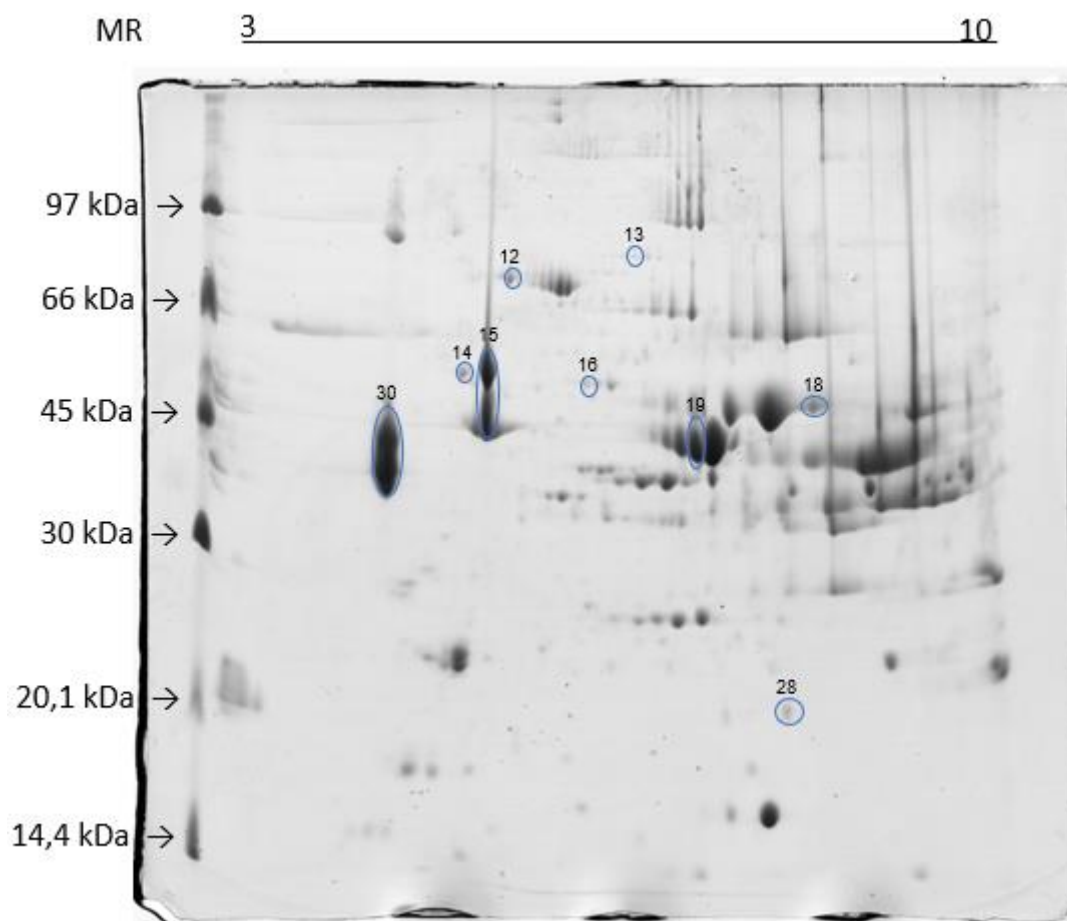


Figura 2. “Spots” proteicos caracterizados por ESI-MS em gel obtido por 2D-PAGE (12,5% (m/v), faixa de pH 3-10) para amostras do tecido muscular *Longissimus thoracis et lumborum* de novilho Nelore-Montana, superprecoce e imunocastrado.

Dentre as vinte e três proteínas identificadas (Tabela 4), onze foram abundantemente expressas no músculo de novilhos e doze no de novilhas. As proteínas identificadas são relacionadas às funções de contração muscular/ regulação (ACTA1, TPM2, TNNT1, TNNT2, TNNT3), metabolismo de carboidratos (ALDOA, GAPDH, TPI1, PYGM, PGM1, PKM, ENO1, ENO3), atividade de ATP (ATP5F1B, PEBP1, AK1), citoproteção (CA3), defesa celular (HSPA8), metabolismo da creatina (CKM) e ligação (TF, GLNG, ALVA, MYBPC1).

No proteoma do músculo LT dos novilhos houve abundância na expressão de proteínas relacionadas à contração muscular/regulação (ACTA1, TPM2, TNNT3), ao

metabolismo de carboidratos (ENO1, ENO3, PYGM, PGM1, TPI1) e atividade ATP (ATP5F1B, PEBP1, AK1).

Por outro lado, no proteoma do LT das novilhas houve abundância na expressão de proteínas relacionadas a regulação da contração muscular (TNNT1, TNNI2), ao metabolismo de carboidratos (PKM, ALDOA, GAPDH), ao metabolismo da creatina (CKM), citoproteção (CA3), defesa celular (HSPA8) e ligação (TF, MYBPC1, ALVA, GLNG).

Tabela 4. Proteínas caracterizadas por ESI-MS das amostras do músculo *Longissimus thoracis et lumborum* de novilhos e novilhas Nelore-Montana, superprecoces e imunocastrados

Spot	Nome proteína	Nº acesso	Score	Cobertura (%)	ple	MMe (Da)	MMt (Da)	MMu (Da)	Variação Expressão
14	Subunidade beta mitocondrial de ATP sintase (ATP5F1B)	P00829	12307,51	56,44	5,05	51780	56283	56.284	+2,069 (+M)
15	Actina alfa-1 (ACTA1)	P68138	29409,83	81,96	5,28	42998	42393	42.051	+2,504 (+M)
16	Alfa-enolase (ENO1)	A0A3Q1MXQ0	5261,196	47	6,17	49703	54808	54.295	+1,949 (+M)
18	Beta-enolase (ENO3)	Q3ZC09	10199,91	57,6	8,19	44261	47438	47.096	+5,510 (+M)
28	Proteína de ligação 1 à fosfatidiletanolamina (PEBP1)	P13696	6676,657	64,17	7,94	21444	21099	20.986	+2,081 (+M)
30	Tropomiosina de cadeia beta (TPM2)	Q5KR48	5317,557	44,01	4,33	40213	32950	32.837	+1,437 (+M)
32	Fosforilase alfa 1-4 glucano (PYGM)	F1MJ28	7318,068	63,42	7,09	97750	97735	97.279	+1,134 (+M)
34	Fosfoglicomutase-1 (PGM1)	Q08DP0	9944,941	78,11	6,99	65655	61874	61.589	+1,890 (+M)
44	Troponina T, tipo rápido (TNNT3)	Q8MKI4	1410,723	36,9	6,84	39524	32124	32.124	+1,367 (+M)
46	Triosefosfato isomerase (TPI1)	Q5E956	21146,33	88,35	7,29	25236	26917	26.690	+1,283 (+M)
47	Isoenzima adenilato-quinase 1 (AK1)	P00570	12755,28	58,76	8,71	22375	21778	21.664	+1,725 (+M)
12	Proteína de choque térmico cognato 71 (HSPA8)	P19120	19088,86	44,92	5,46	73533	71468	71.241	+2,593 (+F)
13	Serotransferrina (TF)	Q29443	270,5198	17,19	6,58	82905	79920	77.753	+1,738 (+F)
19	Creatina quinase tipo M (CKM)	Q9XSC6	16598,07	70,6	7,02	43080	43217	42.989	+1,8955 (+F)
31	Proteína C de ligação à miosina, tipo lento (MYBPC1)	A6QP89	1502,969	33,97	6,23	113152	135007	133.981	+4,071 (+F)
33	Albumina (ALVA)	P02769	13261,69	64,91	5,97	69477	71289	69.293	+1,191 (+F)
35	Piruvato quinase (PKM)	A5D984	12176,24	63,09	7,7	60091	58519	57.949	+1,369 (+F)
39	Frutose bifosfato aldolase (ALDOA)	A6QLL8	7590,983	70,33	7,73	42863	39949	39.436	+2,204 (+F)
41	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	P10096	30163,61	47,75	9,19	34988	36096	35.868	+4,008 (+F)
43	Anidrase carbônica 3 (CA3)	Q3SZX4	10936,17	60	8,37	27806	29655	29.370	+5,237 (+F)
45	Troponina T, tipo lento (TNNT1)	Q8MKH6	3035,667	19,39	5,88	37343	31284	31.284	+2,492 (+F)
48	Troponina I2, tipo rápido (TNNT2)	F6QIC1	3650,82	54,49	9,44	21323	21141	20.970	+2,662 (+F)
50	Mioglobina (GLNG)	A0A1K0FUF3	11507,29	56,49	4,49	17121	17077	17.078	+3,644 (+F)

*ple: Ponto isoelétrico experimental (2D-PAGE); MMe: Massa molecular experimental (2D-PAGE); MMt: Massa molecular teórica (ESI/MS); MMu: Massa molecular UniProt; Da: Dalton

5. DISCUSSÃO

5.1 Proteínas associadas ao teor de gordura intramuscular

A glicose em ruminantes é o principal precursor para lipogênese e acúmulo de gordura nos adipócitos intramusculares (Smith e Crouse, 1984). As fêmeas são mais precoces na deposição de gordura que os machos (Purchas, 1991). As proteínas no músculo LT das novilhas (Tabela 4) indicam atividade pela via oxidativa (ALVA, GLNG, CA3) que juntamente com enzimas glicolíticas (ALDOA, GAPDH, PKM) evidenciam maior eficiência energética e ajudam a explicar o maior teor de gordura intramuscular na carne das novilhas.

5.1.1 Proteínas de transporte

As proteínas ALVA e GLNG indicam atividade oxidativa no músculo das novilhas. A albumina (ALVA), regula a pressão osmótica coloidal do sangue, se liga e transporta ácidos graxos, colesterol e alguns íons (cobre, zinco e cálcio) via circulação sanguínea (Evans, 2002). Baldassini et al (2015) identificaram em estudo proteômico maior expressão da ALVA para novilhos do grupo de carne macia proveniente de bovinos Piemontês. A captação de ácidos graxos pela ALVA indica o uso de lipídeos como substrato oxidativo muscular, que é utilizado em fibras de contração lenta (tipo I), indicando atividade oxidativa no músculo das novilhas. Além disso, a mioglobina (GLNG), transporta o oxigênio necessário para o metabolismo oxidativo, característico das fibras de contração lenta (tipo I) sendo mais um indicativo de metabolismo oxidativo (Olivo, 2006) no músculo das novilhas.

5.1.2 Proteínas do metabolismo de carboidratos

As proteínas ALDOA, GAPDH e PKM, são enzimas das vias da glicólise e gliconeogênese. A ALDOA, converte de modo reversível a frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. Picard et al (2019), reportaram resultados semelhantes para bovinos europeus, em que a ALDOA foi mais expressa em fêmeas comparado a machos castrados. Por outro lado, a GAPDH, converte de modo reversível o gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. Silva et al (2019), encontraram que as enzimas GAPDH e ALDOA foram mais expressas no proteoma de novilhos castrados com maior teor de gordura intramuscular em comparação a novilhos não castrados da raça Nelore. Já a PKM, catalisa a transferência irreversível

de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para uma molécula de ADP com produção de piruvato e ATP. Baldassini et al (2015) reportaram que a PKM foi mais expressa em grupo de carne macia comparado a carne dura para novilhos da raça Nelore. No presente estudo, a maior expressão destas enzimas glicolíticas no proteoma das novilhas indicam síntese e degradação de glicose pela via oxidativa sugerindo maior eficiência energética para deposição de gordura intramuscular.

Além disso, a anidrase carbônica (CA3), tem como função a hidratação reversível do dióxido de carbono (CO₂). Em estudos proteômicos conduzidos com novilhos castrados de raça asiática, a CA3 foi menos expressa em animais com alto marmoreio (Zhang et al., 2010; Shen et al., 2012) com resultados contrários ao do presente estudo. A CA2 está presente em alta concentração no citoplasma de células do músculo esquelético tipo I e estimula na taxa de síntese de ATP, facilitando a conversão rápida de intermediários glicolíticos em oxaloacetato e citrato (Shen et al., 2012). A CA3 foi mais expressa no músculo das novilhas sendo um indicativo de estímulo energético oxidativo.

5.2 *Proteínas associadas à capacidade de retenção de água*

A capacidade de retenção de água é um fator que determina a suculência da carne. É definido como a capacidade da carne reter água durante a aplicação de forças externas, como corte, aquecimento, trituração ou prensagem (Lawrie e Ledward, 2006). No presente estudo, a maior perda por evaporação em novilhos decorrente da cocção da carne indica menor capacidade de retenção de água da carne.

5.2.1 *Proteínas estruturais e metabólicas*

As proteínas PYGM e PGM1 estão envolvidas na glicogenólise e indicam a utilização do glicogênio com produção e acúmulo de lactato no *post-mortem*. Silva et al. (2019) reportaram resultados semelhantes com maior expressão da PGM1 em novilhos castrados comparado a novilhos não castrados. A maior expressão dessas proteínas no músculo dos novilhos indica antecipação do *rigor mortis* em relação as novilhas. Além disso, os novilhos possuem maior teor de glicogênio muscular por serem mais pesados. Cada grama de glicogênio retem quatro de água que se

desprende no processo de cocção e ajuda a explicar a menor capacidade de retenção da carne de novilhos.

5.2.2 Proteína de choque térmico e do metabolismo da creatina

A proteína de choque térmico cognato (HSPA8), possui função de proteção celular do estresse através da restauração de proteínas danificadas e prevenção de agregação e desnaturação de proteínas (Kültz, 2003; Di Luca et al., 2013). Di Luca et al. (2013) relatou aumento da abundância de proteínas de choque térmico em amostras com baixo exsudato muscular post-mortem em suínos. A maior expressão da HSPA8 no músculo das novilhas do presente estudo é um indicativo de atraso do estabelecimento do rigor mortis e sugere uma maior eficiência em condição de estresse (hipóxia).

Além disso a HSP70 é uma proteína dependente de energia em forma de ATP (Pereira, 2018). A creatina quinase tipo M (CKM) converte ADP em ATP a partir da fosfocreatina, fornecendo energia para o músculo (Kaneko et al., 2008). A maior expressão de CKM no músculo das novilhas pode ser um indicativo de maior demanda energética de ATP para manter as funções musculares logo após o abate e como resposta energética a maior expressão da HSPA8.

6. CONCLUSÕES

O padrão de expressão das proteínas de transporte (ALVA e GLNG), metabolismo de carboidratos (ALDOA, GAPDH, PKM, CA3), defesa celular (HSPA8) e glicogenólise (PYGM e PGM1) sugerem maior capacidade oxidativa e menor atividade glicolítica no músculo das novilhas. Isto indica maior eficiência energética e melhor resposta ao estresse que corroboram os resultados obtidos em maior teor de gordura intramuscular e, possivelmente, sobre a capacidade de retenção de água da carne das novilhas.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil**. Relatório anual. São Paulo, 2020.

American Meat Science Association (AMSA). **Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat**, 2015.

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

BALDASSINI, W. A. **Abordagem bioanalítica e físico-química da qualidade de carne em bovinos Nelore (*Bos indicus*) selecionados para produção**. 2013. 58 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013.

BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A.; VASCONCELOS SILVA, J. A.; MALHEIROS, J. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T.; PADILHA, P. M. 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**, v. 169, p. 65-72, 2015.

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. Meat quality traits of Nellore bulls according to different degrees of backfat thickness: A multivariate approach, **Animal Production Science**, v. 57, p. 363–370, 2017.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

BERG, R. T.; BUTTERFIELD, R. M. **New concepts of cattle growth**. Sydney: Sydney University Press, 1976. 240 p.

CAÑEQUE, V.; PÉREZ, C.; VELASCO, S.; DÍAZ, M. T.; LAUZURICA, S.; ÁLVAREZ, I.; RUIZ DE HUIDOBRO, F.; ONEGA, E.; DE LA FUENTE, J. Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. **Meat Science**, v. 67, p. 595–605, 2004.

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. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, v. 96, n. 3, p. 1318–1324, 2014.

CARVALHO, T. B.; ZEN, S. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista IPecege**, 3 (1), p. 85-99, 2017.

- CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.
- COLEMAN, S. W.; EVANS, B. C.; GUENTHER, J. J. Body and carcass composition of Angus and Charolais steers as affected by age and nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 86-95, 1993.
- CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SALETTI, R.; FOTI, S. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 768-784, 2014.
- D'OCCHIO, M. J.; ASPDEN, W. J.; TRIGG, T. E. Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcase characteristics. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 1-2, p. 47-58, 2001.
- D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. **Journal of Proteomics**, 2012.
- DI LUCA, A.; MULLEN, A. M.; ELIA, G.; DAVEY, G.; HAMILL, R. M. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity. **Meat Science**, v. 88, p. 261-270, 2011.
- ENCARNAÇÃO, R. O.; SILVA, J. M. Produção de novilho superprecoce. **Embrapa Gado de Corte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1997.
- ESCOBAR, H.; MIRANDA, L. Depois do genoma, a corrida pelo proteoma. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 2001.
- EUCLIDES FILHO, K. **O melhoramento genético e os cruzamentos em bovino de corte**. 1.reimp. Campo Grande: EMBRAPA: CNPGC, 1997. 35p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 63).
- EVANS, T. W. Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 6-11, 2002.
- FREITAS, A.K.; RESTLE, J.; PACHECO, P. S.; PÁDUA, J. T.; LAGE, M. E.; MIYAGI, E. S.; SILVA, G. F. R. Características de carcaças de bovinos Nelore inteiros vs castrados , em duas idades, terminados em confinamento. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 37, p. 1055-1062, 2008.
- GIRON, P.; DAYON, L.; SANCHEZ, J. Cysteine tagging for MS-based proteomics. **Mass Spectrometry Rev.**, v. 30, p. 366-395, 2011.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.
- GUERRERO, A.; SAÑUDO, C.; ALBERTI, P.; RIPOLLI, G.; CAMPO, M. M.; OLLETA, J. L.; PANEA, B.; KHLIJI, S.; SANTOLARIA, P. Effect of production system before the finishing period on carcass, meat and fat qualities of beef. **Animal**, v. 7, p. 2063-2072, 2013a.
- HECK, A. J. R.; VAN DEN HEUVEL, R. H. H. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 368-389, 2004.

HUANG, C.; HOU, C.; IJAZ, M.; YAN, T.; LI, X.; LI, Y.; ZHANG, D. 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**, 2020.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. 2008. **Clínica bioquímica de animais domésticos**. 6^a ed. Academic Press, San Diego.

KIM, N. K.; CHO, S.; LEE, S. H.; PARK, H. R.; LEE, C. S.; CHO, Y. M.; CHOY, Y. H.; YOON, D.; IM, S. K.; PARK, E. W. Proteins in *longissimus* muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, v. 80, p.1068–1073, 2008

KLURFELD, D. M. What is the role of meat in a healthy diet? **Animal Frontiers**, v. 8, n. 3, p. 5–10, 2018.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia Bratislava**, v. 61, p. 479-485, 2006.

KÜLTZ, D. Review Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic LANA, A.; ZOLLA, L. Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: a proteomic perspective. **Journal of Proteomics**, 2016.

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v. 6, p. 60-66, 2003.

LAWRIE, R.; LEDWARD, D. **Lawrie's meat science (7th ed.)**, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, England, 2006.

LOHMAN, T. G. Biological variation in body composition. **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 4, p. 647-653, 1971.

LOO, J. A. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, p. 175-186, 2000.

LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000. 134 p.

MOREIRA, A. D.; SIQUEIRA, G. R.; LAGE, J. F.; BENATTI, J. M. B.; MORETTI, M. H.; MIGUEL, G. Z.; OLIVEIRA, I. M.; RESENDE, F. D. Castration methods in crossbred cattle raised on tropical pasture. **Animal Production Science**, v. 58, n. 7, p. 1307, 2018.

NAIR, M. N.; ZHAI, C. Aplicação de ferramentas proteômicas na avaliação da qualidade da carne. **Meat Quality Analysis**, p. 353–368, 2020.

ODONNELLA, R. Milk proteomics. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1013-1023, 2004.

OLIVEIRA, H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. **Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2002. 54p.

OLIVO, R. **O mundo das carnes: ciência, tecnologia & mercado**. 3.ed. Criciúma: Ed. do autor, 2006. 214p.

OWENS, F. N.; DUBESKI, P.; HANSON, C. F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3138-3150, 1993.

PAREDI, G.; MORI, F.; DE MARINO, M. G.; RABONI, S.; MARCHI, L.; GALATI, S.; BUSCHINI, A.; FIEGO, D. P. L.; MOZZARELLI, A. Is the protein profile of pig *Longissimus dorsi* affected by gender and diet? **Journal of Proteomics**, 2019.

PARK, O. K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 133-138, 2004.

PAS, M.; LEBRET, B.; OKSBJERG, N. Measurable biomarkers linked to meat quality from different pig production systems. **Archives Animal Breeding**, v. 60, p. 271-283, 2017.

PICARD, B.; GAGAOUA, M.; AL JAMMAS, M.; BONNET, M. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: Effect of gender and rearing practices. **Journal of Proteomics**, v. 200, p. 1-10, 2019.

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. *Longissimus dorsi* muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. **Journal of Proteomics**, v. 179, p. 30-41, 2018.

PURCHAS, R. W. Effect of sex and castration on growth and composition. In: PEARSON, A.J.; DUTSON, T. R. **Growth regulation in farm animals**: advances in meat research. 7. ed. London: Elsevier Applied Science, 1991. p. 203-254.

RISON, S. C. G.; HODGMAN, T. C.; THORNTON, J. M. Comparison of functional annotation schemes for genomes. **Functional & Integrative Genomics**, v. 1, p. 56-69, 2000.

ROÇA, R. O.; HOE, F.; ARAÚJO, A. P.; BORGES, Q. P.; COSTA, D.; ANDRADE, E. N.; ATHAYDE, N. B.; DELBEM, N. L. C.; GIRAO, L. V. C.; SIGARINI, C.; NETO, A. P. Imunocastração de bovinos criados em pasto: composição centesimal e propriedades sensoriais da carne. In: Congresso Brasileiro de medicina veterinária, 1, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COMBRAVET, 2011.

RODRIGUES, R. T. S.; CHIZZOTTI, M. L.; VITAL, C. E.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; BARROS, E.; BUSATO, K. C.; GOMES, R. A.; LADEIRA, M. M.; MARTINS, T. S. Differences in Beef Quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.

SHEN, Y. N.; KIM, S. H.; YOON, D. H.; LEE, H. G.; KANG, H. S.; SEO, K. S. Proteome Analysis of Bovine *Longissimus dorsi* Muscle Associated with the Marbling Score. **Asian-Australas Journal of Animal Science**, v. 25, n. 8, p. 1083-8, 2012.

SILVA, L. H. P.; RODRIGUES, R. T. S.; ASSIS, D. E. F.; BENEDETI, P. D. B.; DUARTE, M. S.; CHIZZOTTI, M. L. Explaining meat quality of bulls and steers by differential proteome and phosphoproteome analysis of skeletal muscle. **Journal of Proteomics**, v. 199, p. 51-66, 2019.

SMITH, S. B.; CROUSE, J. D. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. **Journal of Nutrition**, v. 114, p. 792-800, 1984.

SUMÁRIO de touros Montana 2020. São José do Rio Preto: Programa Montana Pecuária, 2020. 44p.

VIEIRA, J. C. S. **Estudo metaloproteômico do mercúrio em amostras de tecido hepático de peixes coletados na área de influência do AHE JIRAU - Bacia do rio Madeira.** 2014. 92 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. W.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L. V.; DIKEMAN, M. E. Effects of cooking and shearing methodology on variation in Warner-Bratzler shear force values in beef. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2325–2330, 1994.

WU, W.; YU, Q. Q.; FU, Y.; TIAN, X. J.; JIA, F.; LI, X. M.; DAI, R. T. Towards muscle-specific meat color stability of Chinese Luxi yellow cattle: A proteomic insight into post-mortem storage. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 108-118, 2016.

ZHANG, Y. Y.; ZAN, L. S.; WANG, H. B.; XIN, Y. P.; ADOLIGBE, C. M.; UJAN, J. A. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4504-4509, 2010.

8. IMPLICAÇÕES

Este estudo é pioneiro em qualidade de carne e caracterização do proteoma muscular de novilhas e novilhos Nelore-Montana, superprecoces e terminados em confinamento.

Os resultados obtidos servem como base para pesquisa, desenvolvimento e validação de biomarcadores preditivos com enfoque em teor de gordura intramuscular e capacidade de retenção de água contribuindo para o meio científico, indústria da carne e melhoramento genético animal.

Em sistema intensivo de produção com animais jovens sobre as mesmas condições, a produção de novilhas resulta em maior deposição de gordura intramuscular e capacidade de retenção de água que influenciam na suculência e sabor da carne. Os criadores podem escolher a classe sexual conforme o objetivo de produção e recursos disponíveis.