Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Diferentes taxas de crescimento após período de restrição alimentar alteram
atributos de qualidade da carne e o transcriptoma de vacas

Giancarlo de Moura Souza

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2018

Giancarlo de Moura Souza
Médico Veterinário

Diferentes taxas de crescimento após período de restrição alimentar alteram atributos de
qualidade da carne e o transcriptoma muscular de vacas
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO FRANCISQUINE DELGADO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Giancarlo de Moura

Diferentes taxas de crescimento após período de restrição alimentar alteram atributos de qualidade da carne e o transcriptoma de vacas / Giancarlo de Moura Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

59 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. mRNA 2. Maciez 3. Renovação de colágeno 4. Transcriptoma 5. Crescimento muscular 6. Fibrose I. Título

DEDICATÓRIA

*Ao meu querido pai, **Neal Costa Souza**, a minha amável mãe, **Ana Hercília de Moura**, meus irmãos, **Kelly de Moura Souza** e **Miguel Enzo de Moura Souza***

Com amor,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e pelo cuidado durante todos os momentos em que me vieram as dificuldades e sentimentos de incapacidade.

A minha família, pelo apoio emocional, pelo carinho e suporte durante todo o período de pós-graduação, principalmente ao meu pai, **Neal Costa Souza** e minha mãe, **Ana Hercília de Moura**, ambos pelos valores ensinados, conselhos e apoio incondicional. A minha irmã **Kelly de Moura Souza**, que também pelo apoio e incentivo. Não poderia também deixar de agradecer a minha companheira **Leticia Barbosa Sant'ana** a quem eu amo muito, pela compreensão, carinho atenção, e ajuda durante essa caminhada. Aos amigos de longa data, **Misael Rainer Cardoso** e **Wagner Ferreira Schultz**.

Principalmente ao **Professor Eduardo Francisquine Delgado** pela oportunidade, confiança, paciência, incentivo, ensinamentos e valores transmitidos durante toda essa trajetória. Tudo isso foi fundamental para o meu amadurecimento e compreensão de que há muito o que crescer.

Ao **Dr. Gelson Luis Dias Feijó** e o **Professor André Luiz Julien Ferraz** pela amizade e por terem contribuído de maneira intelectual e também por estarem sempre abertos a parcerias e propostas de projetos.

Ao **Prof. Dr. Cedric Gondro** e a **Universidade de New England**, que me receberam de braços abertos, possibilitando o aprendizado, desenvolvimento do trabalho e além de tudo, viver uma experiência profissional e social única.

Ao **Professor Luiz Lehmann Coutinho** por me receber no laboratório de biotecnologia animal, permitindo o aprendizado e acompanhamento de algumas análises no Laboratório de Biotecnologia Animal. Também agradeço ao **Horácio Montenegro**, **Pilar D. Marini** e ao **Ricardo Augusto Brassaloti** pela paciência durante o acompanhamento da preparação de bibliotecas de cDNA, sequenciamento e análises de bioinformática.

Ao corpo docente da ESALQ/USP que tive o privilégio de ser aluno e conviver durante o doutorado: **Carmen Contreras Castillo, Carla Maris Machado Bittar, Flavio Augusto Portela Santos, Gerson Barreto Mourão, Ivanete Susin, José Eurico Possebon Cyrino, José Fernando Machado Menten, Luiz Gustavo Nussio, Luiz Lehmann Coutinho, Raul Machado Neto, Roberto Sartori Filho, Saulo Luz e Silva, Sila Carneiro da Silva e Valdomiro Shigueru Miyada**

De maneira especial, agradeço aqueles que foram meus companheiros de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia Animal: **Ana Cláudia, Carolina Aroeira, Daiane Aparecida Fausto, Giuliana Micaí de Oliveira, Juliane Hartmann, Marcelo Coutinho, Patrícia Maloso Ramos, Robson Sfaciotti Barducci**, pela amizade, colaboração e pelos momentos únicos vividos em equipe.

Aos amigos que fiz na ESALQ: **Antonio, Caio, Daniele, Helder, Lucas, Rose, José Luiz, Tatiane, Wiolene**.

Agradecimento a **Sara de las Heras-Saldana** pela ajuda com as análises de bioinformática, pelos ensinamentos, pelo incentivo durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade.

Agradeço também aos amigos brasileiros que fiz durante o período sanduíche na Universidade de New England: **Douglas Guimarães, Eliéder Romanzini, Flávio Alvarenga, Rodrigo Costa, Rodrigo Ramos, Paulo Santana, Priscilla Arrigucci, Tharcilla Alvarenga**, e também os amigos estrangeiros que tive a honra de compartilhar experiências: **Antonio, Naomi, Netsanet, Sara e José**.

Deixo também meu agradecimento especial ao meu amigo da pós-graduação e companheiro de apartamento **Marcell Patachi Alonso**, pela convivência, companheirismo, pelas boas conversas, risadas e sobretudo, pela nossa amizade que faço questão de leva-la comigo eternamente.

Por fim, agradeço a Capes pela bolsa concedida durante o doutoramento e também no período sanduíche.

BIOGRAFIA

Giancarlo de Moura Souza, nascido no dia 15 de fevereiro de 1988 na cidade de Teófilo Otoni-MG. No ano de 2005 foi contemplado com uma bolsa de estudos no programa universidade para todos (PROUNI) para iniciar sua graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) no ano de 2006 em Campo Grande - MS. Ao final do curso e durante o estágio final em 2009, engajou-se na pesquisa pela iniciação científica no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) sob a supervisão do pesquisador Dr. Gelson Luis Dias Feijó. Em 2010, iniciou o mestrado pela Universidade Federal da Grande Dourados obtendo o título de mestre em Zootecnia (UFGD) na área de Produção Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes no ano de 2012. O projeto de mestrado teve como proposta a associação de genes candidatos ao processo de proteólise muscular por meio do uso de qPCR. Esse projeto foi conduzido com parceria da EMBRAPA/CNPGC e o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) – Jaboticabal. Após o mestrado, trabalhou na EMBRAPA como Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial até o final do ano de 2013 em pesquisas voltadas a Ciência de Carnes. Em 2014 ingressou no programa de doutoramento em Ciência Animal e Pastagens da ESALQ/USP desenvolvendo pesquisas na área de Ciência de Carnes e Biotecnologia. Participou do programa de doutorado sanduíche no exterior – CAPES na Universidade de New England na Austrália juntamente com o grupo de pesquisa do Prof. Cedric Gondro, possibilitando o aprendizado de análises de bioinformática e estatística de dados de sequenciamento de RNA.

“Nada temos que recear quanto ao futuro, a menos que esqueçamos a maneira em que o Senhor nos tem guiado,
e os ensinamentos que nos ministrou no passado”.

Ellen G. White

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1. JUSTIFICATIVA	13
2. INTRODUÇÃO GERAL	17
2.1. Cenário brasileiro de carne bovina	17
2.2. Qualidade da carne em bovinos adultos	17
2.3. Taxa de crescimento e efeito no remodelamento muscular	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais e tratamentos	23
3.2. Abates.....	25
3.3. Avaliação da qualidade da carne	25
3.3.1. Área de olho de lombo, Espessura de gordura subcutânea e Escore de Marmorização ...	25
3.3.2. pH.....	26
3.3.3. Cor instrumental	26
3.3.4. Força de Cisalhamento	26
3.5. Preparação de biblioteca e sequenciamento	27
3.6. Controle de Qualidade, mapeamento e contagem de reads	28
3.7. Análise de expressão diferencial de genes	28
3.8. Análise de enriquecimento funcional	28
3.9. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Características fenotípicas durante a recuperação de peso	31
4.2. Expressão gênica diferencial	34
4.3. Análise funcional de DE genes entre os contrastes.....	36
5. DISCUSSÃO.....	37
5.1. Caracterização dos grupos para fenótipos de carne	37
5.2. Expressão diferencial a análise funcional.....	39
5.2.1. Base vs Manutenção	40
5.2.2. Base vs Ganho Lento.....	41
5.2.3. Base vs Ganho Rápido.....	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	47

RESUMO

Diferentes taxas de crescimento após período de restrição alimentar alteram atributos de qualidade da carne e transcriptoma de vacas

A velocidade de renovação das proteínas musculares define o crescimento muscular, e afetam a qualidade da carne, destacando-se a renovação de colágeno e taxa proteolítica que tem implicação no fenótipo de maciez. No entanto, existe pouca informação na literatura sobre mudanças no processo de remodelação de proteínas musculares em resposta à taxa de recuperação do ganho de peso, após um período de subnutrição em animais fisiologicamente maduros. Dessa forma, o uso de sequenciamento de RNA pode indicar mudanças no tecido muscular através de um perfil de expressão diferencial que explicam mudanças nos fenótipos associados ao crescimento muscular. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as mudanças no transcriptoma associado a fenótipos de carne de vacas adultas Nelore submetidas a diferentes taxas de recuperação de peso. Neste experimento foram utilizadas 28 vacas adultas de 5 a 16 anos, sendo que 23 animais, por apresentarem baixo escore corporal no início do experimento como resultado de perda de peso durante uma estação seca, foram aleatoriamente distribuídas em 3 grupos baseados em ganho diário de peso vivo: GB – Base (abatidos com baixo escore corporal, n=4); GL – Lento (0,6 kg/dia, n=9); GR – Rápido (1,2 kg/dia, n=10). Um quarto grupo (GM – Manutenção, n=5), foi formado de animais com alto escore corporal do início ao final do experimento. Os animais foram abatidos em quatro pontos definidos por dias (d) de confinamento (A1(0d) = GB; A2(51d) = GL e GR; A3(74d) = GR; A4(104d) = GL e GM), e as amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram coletadas para obtenção do RNA total. Após a obtenção do mRNA e a preparação das bibliotecas de cDNA, o sequenciamento das amostras foi feito em um equipamento HiScanSQ. Vinte e quatro horas após o abate, foram determinados o pH e a cor instrumental (L^* , a^* , b^*) medidos no músculo *Longissimus thoracis*. Dois bifes foram amostrados para a análise de força de cisalhamento às 24h e 21 dias. Na comparação entre fenótipos e genes, os contrastes utilizaram o grupo GB como referência. As análises estatísticas foram realizadas no programa R, usando ANOVA e teste de Tukey. Menores força de cisalhamento aos 21 dias ($P \leq 0,05$) foram encontradas para o grupo GL (A4) e GM (A4) comparadas ao GB. Valores de L^* , a^* , b^* no músculo do GR (A3) também foram maiores em relação ao GB. Somente o valor de b^* na gordura foi diferente ($P \leq 0,05$) em GR (A2 e A3) em relação ao GB. Foram identificados o total de 578 genes diferencialmente expressos (DE; FDR 5%) nos cinco contrastes avaliados. A análise funcional de genes DE entre contrastes identificou uma via KEGG para o grupo GL (“Ribosome”) e cinco para o grupo GR (“ECM receptor interaction”, “Focal Adhesion”, “Protein digestion and absorption”, “PI3K-Akt signaling pathway”). Para o enriquecimento GO, foram obtidas quatro categorias, sendo “Semaphorin receptor activity” para o grupo GL, enquanto “Cellular response to amino acid stimulus”, “Collagen trimer” e “Extracellular matrix structural constituent” foram identificadas para GR. As vias em geral estão associadas a alterações no tecido conjuntivo do músculo. As diferenças encontradas entre fenótipos e genes indicam que as taxas de crescimento afetam de forma diferente os fenótipos associados à qualidade da carne. A realimentação em animais adultos, ao alterar o transcriptoma com possíveis impactos no tecido conjuntivo, parece mostrar um cenário de fibrose muscular no ganho rápido de peso, diferentemente do ganho lento, que mostrou ser uma alternativa para melhorar a qualidade da carne. Todavia, os impactos na estrutura muscular e proteica que possam explicar incremento em aspectos de textura da carne precisam ser determinados.

Palavras-chave: mRNA; Maciez; Renovação de colágeno; Transcriptoma; Crescimento muscular; Fibrose

ABSTRACT

Different growth after a period of feed restriction alter meat quality attributes and cow transcriptome

The speed of renewal of muscle proteins defines muscle growth, and affect meat quality, especially the renewal the of collagen turnover and proteolytic rate that has implication in the tenderness phenotype. There is little information in the literature about changes in the muscle protein remodeling process in response to the rate of recovery of weight gain after malnutrition in physiologically mature animals. In this way, the use of RNA sequencing may indicate changes in muscle tissue through a differential expression profile that explains changes in phenotypes associated with muscle growth. Therefore, the objective of this study was to evaluate changes in the transcriptome associated with meat phenotypes of Nellore adult cows submitted to different rates of weight recovery. In this experiment, 28 adult cows from 5 to 16 years old were used, being that twenty-three animals were distributed randomly in 3 groups based on daily gain of live weight, since they presented low body score at the beginning of the experiment as a result of weight loss during a dry season: GB - Base (slaughtered with low body score, n=4); GL - Slow (0.6kg/day, n=9); GR - High (1.2 kg/day, n=10). A fourth group (GM - Maintenance, n = 5) was formed from animals with high body score from the beginning to the end of the experiment. The animals were slaughtered at four points defined by confinement days(d) (A1(0d) = GB; A2(51d) = GL and GR; A3(74d) = GR; A4(104d) = GL and GM), and *Longissimus thoracis* muscle samples were collected to obtain the total RNA. After obtaining the mRNA and preparation of the libraries, the sequencing of the samples was done in a HiScanSQ equipment. Twenty-four hours after slaughter, the pH and instrumental color (L^* , a^* , b^*) were determined in the *Longissimus thoracis* muscle. Two steaks were collected for shear force analysis at 24h and 21 days. In the comparison of the phenotypes and genes, contrasts were used the GB group as reference. Statistical analysis were performed in R software, using ANOVA and Tukey test. Lower shear forces at 21 days ($P \leq 0.05$) were found for the GL (A4) and GM (A4) groups compared to GB. Values of L^* , a^* , b^* in the GR (A3) muscle were also higher in relation to GB. Only the value of b^* in fat was different ($P \leq 0.05$) in GR (A2 and A3) in relation to GB. A total of 578 differentially expressed genes (DE; false discovery rate 5%) in the five contrasts evaluated. Functional analysis of DE genes between contrasts identified a KEGG pathway for the GL group ("Ribosome") and five for the GR group ("ECM receptor interaction", "Focal Adhesion", "Protein digestion and absorption", "PI3K-Akt signaling pathway"). For GO enrichment, four categories were obtained, being "Semaphorin receptor activity" for GL, while "Cellular response to amino acid stimulus", "Collagen trimer" and "Extracellular matrix structural constituent" were identified for GR. Pathways in general are associated with changes in connective tissue of muscle. Re-feeding in adult animals by altering the transcriptome with possible impacts on connective tissue, seems to show a scenario of muscle fibrosis in the fast gain of weight, unlike the slow gain, which proved to be an alternative to improve meat quality. However, the impacts on muscle and protein structure that may explain the increase in meat texture aspects need to be determined.

Keywords: mRNA; Tenderness; Collagen turnover; Transcriptome; Muscle growth; Fibrosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DESENHO EXPERIMENTAL PARA OS GRUPOS DE VACAS COM BASE NA CONDIÇÃO CORPORAL NO DIA 0 DO CONFINAMENTO (GB – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL ABATIDAS NO INICIO DO EXPERIMENTO, GL – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO LENTA DE PESO, GR – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO RÁPIDA DE PESO, GM – VACAS COM ALTO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A MANUTENÇÃO DO PESO ATÉ O FIM DO EXPERIMENTO) E OS PONTOS DE ABATE (A) INDICADOS EM VERMELHO COM SEUS RESPECTIVOS DIAS (D). 24

FIGURA 2. PESO MÉDIO DE VACAS ADULTAS DA RAÇA NELORE DISTRIBUIDAS EM GRUPOS (GL – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO LENTA DE PESO, GR – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO RÁPIDA DE PESO, GM – VACAS COM ALTO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A MANUTENÇÃO DO PESO ATÉ O FIM DO EXPERIMENTO) E OS PERÍODOS DE PESAGEM (P) INDICADOS COM SEUS RESPECTIVOS DIAS (P1 – DIA 0; P2 – 50 DIAS; P3 – 73 DIAS; P4 – 103 DIAS). 31

FIGURA 3. ESCORE CORPORAL MÉDIO DE VACAS ADULTAS DA RAÇA NELORE DISTRIBUIDAS EM GRUPOS (GL – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO LENTA DE PESO, GR – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO RÁPIDA DE PESO, GM – VACAS COM ALTO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A MANUTENÇÃO DO PESO ATÉ O FIM DO EXPERIMENTO) E OS PERÍODOS (P) DE AVALIAÇÃO DO ESCORE INDICADOS COM SEUS RESPECTIVOS DIAS (P1 – DIA 0; P2 – 50 DIAS; P3 – 73 DIAS; P4 – 103 DIAS). 32

FIGURA 4. PROJEÇÃO DE BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ EM PLANO DEFINIDO PELOS DOIS PRIMEIROS PRINCIPAIS COMPONENTES (PC) DE VACAS ADULTAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES GRUPOS DE RECUPERAÇÃO DE PESO (GB – BASE; GL – LENTO; GR – RÁPIDO; GM – MANUTENÇÃO) E ABATIDAS EM DIFERENTES PERÍODOS (A1 – 0 DIAS; A2 – 51 DIAS; A3 – 74 DIAS; A4 – 104 DIAS). 34

FIGURA 5. DIAGRAMA DE VENN MOSTRANDO A SOBREPOSIÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE OS CONTRASTES DE GRUPOS DE VACAS ADULTAS NELORE (GB – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL ABATIDAS NO INICIO DO EXPERIMENTO, GL – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO LENTA DE PESO, GR – VACAS COM BAIXO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A RECUPERAÇÃO RÁPIDA DE PESO, GM – VACAS COM ALTO ESCORE E PESO CORPORAL SUBMETIDAS A MANUTENÇÃO DO PESO ATÉ O FIM DO EXPERIMENTO) E OS PONTOS DE ABATE (A) INDICADOS EM VERMELHO COM SEUS RESPECTIVOS DIAS EM CONFINAMENTO (A1 – 0 DIAS; A2 – 51 DIAS; A3 – 74 DIAS; A4 – 104 DIAS). 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA DIETA DE VACAS ADULTAS DA RAÇA NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE PESO CORPORAL APÓS UM PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR	23
TABELA 2. COMPARAÇÃO DE FENÓTIPOS DE CARÇA E QUALIDADE DA CARNE NO MÚSCULO <i>LONGISSIMUS THORACIS</i> DE VACAS ADULTAS NELORE SUBMETIDAS A VELOCIDADES DE RECUPERAÇÃO DE PESO E PONTOS DE ABATE.....	33
TABELA 3. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE FENÓTIPOS DE CARÇA E QUALIDADE DE CARNE DO MÚSCULO <i>LONGISSIMUS THORACIS</i> DE VACAS ADULTAS NELORE DIVIDIDAS EM GRUPOS DE CRESCIMENTO (GB – BASE; GL – LENTO; GR – RÁPIDO; GM – MANUTENÇÃO) E ABATIDAS EM DIFERENTES PERÍODOS DURANTE O CONFINAMENTO (A1 – 0 DIAS; A2 – 51 DIAS; A3 – 74 DIAS; A4 – 104 DIAS).....	34
TABELA 4. NÚMERO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS CONTRASTES ENTRE GRUPOS DE VACAS ADULTAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE PESO APÓS UM PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR.	35
TABELA 5. VIAS METABÓLICAS E NÚMERO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS OBTIDOS DE ACORDO COM O ENRIQUECIMENTO KEGG NOS CONTRASTES DE GRUPOS DE VACAS ADULTAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE PESO APÓS UM PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR.	36
TABELA 6. CATEGORIAS GO E NÚMERO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS OBTIDOS NOS CONTRASTES DE GRUPOS DE VACAS ADULTAS NELORE SUBMETIDAS A DIFERENTES TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE PESO APÓS UM PERÍODO DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	36

1. JUSTIFICATIVA

O maior rebanho do mundo em número de bovinos se encontra na Índia, contando com um rebanho de 303,35 milhões de cabeças, mas com 35% sendo búfalos. Em seguida, o Brasil tem como estimativa 226,03 milhões de cabeças (USDA, 2016). Apesar disso, o Brasil ainda se apresenta como o maior produtor mundial de carnes no último quinquênio, já que produziu cerca de 9,56 milhões de toneladas por equivalente de carcaça (IBGE, 2015), valor que representa 14% da produção mundial. Até novembro de 2017, o Brasil já abateu aproximadamente um total de 21,57 milhões de bovinos, sendo que do total de carnes produzidas entre janeiro e outubro desse ano, já foram exportadas 982.872 mil toneladas de carne in natura, gerando um lucro de US\$ 4.943.902,00 bilhões para a economia brasileira (ABIEC, 2017). Quanto ao consumo da carne bovina, em 2016 houve uma redução no comparativo a 2015 em decorrência da crise econômica nacional, mas o consumo per capita de carne bovina no Brasil teve como média 35,8 kg/hab/ano, estando posicionado como quinto maior consumidor do mundo, atrás somente do Uruguai (56,3 kg), Argentina (54,5 kg), Hong Kong (51,9 kg) e Estados Unidos (36,0 kg). Em volume total, no entanto, o Brasil é o segundo maior consumidor do mundo, perdendo somente para o Estados Unidos (USDA, 2016). Dada a importância da pecuária brasileira no cenário econômico, é necessário reunir esforços e investimentos para a melhoria dessa cadeia com ênfase na qualidade do produto cárneo, já que o avanço desse ramo pode trazer impactos significativos à imagem e valor desse produto para ambos os mercados nacional e internacional.

Dentre os atributos de qualidade, a maciez tem sido problema para a indústria da carne (MORGAN et al., 1991; SAVELL; SHACKELFORD, 1992), uma vez que os consumidores a identificam com papel relevante nas decisões de compra (DELGADO et al., 2006; MENNECKE et al., 2007). O desafio da inconsistência na maciez tem relação com o envolvimento de mecanismos bioquímicos complexos e interdependentes no desenvolvimento deste atributo organoléptico (RILEY et al., 2007), que englobam a degradação proteica (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; HO et al., 1997; HUFF-LONERGAN et al., 1996; LONERGAN, 2001), teor de lipídios (WOOD et al., 2003), conteúdo e maturidade do tecido conjuntivo (PURSLOW, 2005; MCCORMICK et al., 2009), e atuação de proteínas de choque térmico (BERNARD et al., 2007), com forte componente genético (WARNER et al., 2010). Estes mecanismos, que compreendem os diferentes padrões de deposição de tecidos, interagem em resposta a estratégias de manejo nutricionais (BOLEMAN et al., 1996), e afetam a maciez, tornando difícil prever esta característica de qualidade (KOOHMARAIE, 1996; OUALI, 1990).

Porém, a qualidade da carne engloba várias características e pode ser afetada por diversos fatores como: idade do animal ao abate, sexo, gordura e tecido conjuntivo, *rigor mortis* (importante para o processo de acidificação e pH final), degradação de proteínas miofibrilares, raça ou genética do animal, alimentação, manejo pré-abate, agentes hormonais e tratamentos *post-mortem* (resfriamento, estimulação elétrica das carcaças e maturação) (KOOHMARAIE et al., 1994). Todos esses fatores afetam a qualidade final do produto cárneo que é medida pelo pH, capacidade de retenção de água, cor, firmeza, textura, quantidade e distribuição da gordura, maciez, sabor e suculência, que são características determinantes na decisão de compra da carne.

Durante o desenvolvimento e crescimento do animal, tecidos corporais crescem em ordem, começando com o tecido nervoso, seguido por ósseo, muscular e adiposo (OWENS et al., 1993). Esta deposição de tecido diferencial também é modificada pela restrição nutricional, alterando o tamanho corporal à maturidade, ou seja, seu peso adulto final não atingirá patamares normais devido ao menor comprimento da ossatura e peso dos músculos. Como consequência da maturidade, os animais tendem a aumentar a deposição de gordura na carcaça, pois a musculatura perde a capacidade de hipertrofia (HWEE; BODINE, 2009) além de apresentar redução na eficiência alimentar (OWENS et al., 1993). Por outro lado, ocorrem também mudanças nos tipos de fibra muscular, sendo neste caso um aumento da contribuição de fibras oxidativas, já que essas são poupadas durante condições restritivas (BYRNE et al., 2005). Além disso, processos de renovação de colágeno estão diretamente relacionados com a taxa de crescimento muscular (FISHELL et al., 1985), visto que alguns autores relatam o aumento da solubilidade do colágeno de acordo com o ritmo de crescimento (PURSLOW, 2014; THERKILDSEN et al., 2002), que parece ser capaz de remodelar a fração colágena.

Entendendo o fato que o músculo esquelético pode ser afetado pelo crescimento, pela mudança na taxa de síntese de DNA e RNA (BEERMANN, 2004), o que consequentemente proporciona uma acreção proteica e renovação de proteínas miofibrilares (KOOHMARAIE et al., 2002), elucidar mecanismos genéticos, relações entre genes e suas funções torna-se importante para compreensão do desenvolvimento dos animais, bem como processos biológicos e vias metabólicas que determinam fenótipos de qualidade da carne.

Seguindo essa vertente, a transcriptômica permite quantificar variações na expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento do organismo, buscando identificar genes diferencialmente expressos em indivíduos submetidos a diferentes tratamentos. Atualmente, o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é uma tecnologia avançada que se apresenta como o método mais eficiente para mapear e quantificar transcriptomas, assim como caracterizar o perfil de expressão gênica global de um organismo específico (COROMINAS et al., 2013; SENDLER;

JOHNSON; KRAWETZ, 2011).

Alguns trabalhos têm usado essa técnica com êxito em pesquisas envolvendo bovinos de corte, tanto para características como desenvolvimento muscular, gordura intramuscular e perfil de ácidos graxos (BALDWIN VI et al. 2012; CESAR et al., 2016; DINIZ et al., 2016; SILVA-VIGNATO et al., 2017). Essa técnica também tem sido usada no estudo do músculo de animais em ganho compensatório de animais jovens (COSTA et al. 2017; KEOGH et al. 2016a), mostrando mudanças importantes na expressão de genes envolvidos em rotas de renovação de tecido conjuntivo, hipertrofia do tecido muscular e diferenciação de tipo de fibras. Apesar disso, existe pouca informação sobre a remodelação muscular em vacas adultas, o que seria importante para o Brasil, visto que essa categoria representa uma parcela importante dos abates e produção de carne. Apesar dos avanços na compreensão do impacto da taxa de crescimento no metabolismo miofibrilar e deposição de tecido muscular, muitos conhecimentos básicos desses processos ainda não são totalmente compreendidos. Sendo assim, é bastante relevante verificar o perfil de expressão entre diferentes momentos durante o crescimento e deposição tecidual e avaliar a expressão diferencial entre as velocidades de ganho de peso.

2. INTRODUÇÃO GERAL

2.1. Cenário brasileiro de carne bovina

O rebanho de bovinos no Brasil atualmente possui cerca de 226 milhões de animais (USDA, 2016) número maior que a população brasileira que passou dos 207 milhões de pessoas, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). Por outro lado, o Brasil também é o maior exportador de carne bovina do mundo, sendo essa atividade uma das principais dentro da economia brasileira, empregando 1,6 milhões de pessoas e gerando receita 10,09% maior em 2017 em relação ao período de janeiro a outubro do ano de 2016 (ABIEC, 2017).

A raça Nelore (*Bos taurus indicus*) compõe a maior parte do rebanho brasileiro nessa atividade, principalmente por apresentar características que favorecem sua criação no país. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2014), cerca de 80% do rebanho é composto por animais zebuínos (*Bos taurus indicus*), onde 90% são representados pela raça Nelore.

De acordo com os indicadores do IBGE (2017), dos bovinos abatidos até o segundo trimestre, 34% foram vacas de descarte. Essa grande parcela de animais são fêmeas que durante vários anos produzem bezerros, porém, com o decréscimo de sua eficiência reprodutiva, acabam sendo direcionadas ao abate.

Apesar da importância das fêmeas de descarte para o suprimento da demanda de carne pelo mercado consumidor brasileiro e para a renda dos produtores rurais, o preço pago pelos frigoríficos à carcaça de fêmeas de descarte é normalmente 10% inferior à de novilhos (MISSIO et al., 2013). A justificativa dada pelos frigoríficos em relação ao menor preço pago pela carcaça de vacas de descarte é vinculada a menor qualidade da carcaça e carne desta categoria em relação aos machos.

2.2. Qualidade da carne em bovinos adultos

A idade ou maturidade em bovinos é importante, pois existem evidências de que a qualidade organoléptica da carne, principalmente a maciez, diminuem com o avanço da idade (SHORTOSE; HARRIS, 1990; CHO et al., 2017). Um dos fatores que explicam essa mudança é o colágeno, principal componente do tecido conjuntivo intramuscular junto a quantidades significativas de elastina e substância fundamental amorfa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A conexão entre o colágeno intramuscular e a maciez da carne foi inicialmente identificada em trabalhos datados do início do século XX e reestudada com certa ênfase entre as décadas de 40 e 70, quando foram reveladas algumas das complexas maneiras com que o colágeno impacta a maciez da carne (BAILEY; LIGHT, 1989). Este tecido apresenta disposição organizada e tem a função na sustentação e suporte das fibras musculares (ASTRUC, 2014a).

No músculo existe somente uma pequena quantidade de colágeno, entre 1,5 a 15% em relação ao do peso do músculo em base de matéria seca (ASTRUC, 2014b), mas este componente fibroso inflexível do tecido conjuntivo intramuscular pode exercer influência sobre a dureza da carne, encontrando-se também envolvido no encolhimento e, portanto, nas perdas de líquido durante o cozimento (PURSLOW, 2014). Sendo assim, qualquer modificação observada no colágeno, pode resultar em benefícios significativos em relação à textura.

A carne de animais fisiologicamente maduros é geralmente considerada menos macia em relação a carne de animais jovens (XIONG et al., 2007; MOJTO et al., 2009; CHO et al., 2017), sendo isso associado ao estado de solubilidade do colágeno, ou seja, do grau e tipo de ligações cruzadas presentes no tecido conjuntivo (SHORTOSE; HARRIS, 1990). Isso ocorre durante o envelhecimento, no qual, formam-se ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno, fazendo que com essa proteína se torne termo-estável (NISHIMURA, 2010; PURSLOW, 2012). Além disso, músculos com maior teor de colágeno são afetados negativamente com o avanço da idade dos animais (PURSLOW, 2005; SCHÖNFELDT; STRYDOM, 2011). Sendo assim, acredita-se que o aumento do número de ligações cruzadas do colágeno em decorrência do aumento da idade, pode explicar parte da variação na maciez da carne de animais mais velhos (BAILEY, 1985).

Embora exista relato de correlação entre conteúdo total de colágeno e dureza da carne (TORRESCANO et al., 2003), a concentração de colágeno não muda significativamente nos músculos desde o nascimento até o abate do animal (BAILEY; LIGHT, 1989), o que nos leva a acreditar que a qualidade e não quantidade de colágeno são relevantes para a maciez da carne quando há diferenças na idade (PURSLOW, 2005; ASTRUC, 2014b).

Dentre os mecanismos que explicam a variação no fenótipo maciez, o sistema enzimático calpaína-calpastatina tem sido reconhecido como determinante no processo de amaciamento *post-mortem* (KOOHMARAIE et al., 1994). Esse fato explica as diferenças em maciez entre animais zebuínos e taurinos, já que os animais zebuínos apresentam maiores teores de calpastatinas, inibidor da calpastatina, reduzindo assim a proteólise muscular *post-mortem* (WHIPPLE et al., 1990). Por outro lado, poucas investigações foram conduzidas buscando o possível efeito da idade do animal na progressão da proteólise *post-mortem* em relação a maciez da

carne. Também foi observado que animais fisiologicamente maduros tiveram uma redução da taxa de degradação de proteínas miofibrilares do músculo durante o período *pos-mortem* em relação a animais jovens (KOOHMARAIE et al., 1984; HUFF-LONERGAN et al., 1995), no entanto, essa diferença também estava associada a variação da maciez da carne entre as idades fisiológicas. Ademais, também existem evidências que a relação calpaína/calpastatina muda em animais de idade avançada, sendo essa relação menor em comparação com animais mais jovens, contribuindo também na maior dureza na carne oriunda desse modelo biológico (CRUZEN et al., 2014).

A cor da carne é um dos primeiros atributos a serem observados pelo consumidor sendo, portanto, determinante no momento da compra (OSÓRIO; OSÓRIO; SANUDO, 2009). A cor vermelha é uma característica da carne bovina, tendo relação com as fibras musculares, o pigmento da mioglobina e a hemoglobina presente no sangue. Entretanto, com o avanço da idade essa característica pode ser prejudicada pelo acúmulo de mioglobina nos músculos, tornando a carne mais escura (FELÍCIO, 1997). Por outro lado, a estabilidade oxidativa da carne parece ser afetada pela idade do animal, visto que com aumento cronológico da idade, observa-se mudança da cor da carne para um tom mais escuro em decorrência da oxidação da mioglobina (BOCCARD et al., 1979). Embora pouco se saiba sobre a estabilidade oxidativa em animais erados, acredita-se que durante o avanço da idade, aumenta-se também a susceptibilidade das células musculares a agentes oxidantes (STADTMAN, 2006).

As mudanças na cor da carne de animais maduros não são perceptíveis somente no músculo, mas também podem ser observadas na gordura. Tratando de animais criados a pasto, a cor da gordura se torna mais amarelada como decorrência da deposição prolongada de carotenóides oriundos das forragens (FELÍCIO, 1997). Dessa forma, as mudanças na cor podem afetar a comercialização do produto, já que a cor deixa de ser atrativa para o consumidor.

2.3. Taxa de crescimento e efeito no remodelamento muscular

Diversos estudos têm avaliado as mudanças no transcriptoma de genes associados a remodelação muscular em resposta as estratégias nutricionais (LEE; HOSSNER, 2002; LEE; ENGLE; HOSSNER, 2002; BYRNE et al., 2005; KEOGH et al., 2016; COSTA et al., 2017). Estas alterações indicam a possibilidade de modificar proteínas que fazem parte da estrutura muscular envolvida na maciez da carne, tais como componentes do citoesqueleto e matriz extracelular.

Tais componentes do citoesqueleto e matriz extracelular como o colágeno intramuscular, podem apresentar diferenças em sua solubilidade de acordo com o ímpeto de

crescimento muscular (RENAND et al., 1994). Animais alimentados com dietas de alta energia no pré-abate apresentam uma grande síntese proteica e, portanto, se espera que produzam carne com grande quantidade de colágeno recém-sintetizado, que é mais termo lábil (ABERLE et al., 1981). Esse comportamento foi também observado em vacas adultas alimentadas com dietas de alta energia, no qual foi observado grande quantidade de colágeno solúvel (MILLER et al., 1983; MILLER et al., 1987). Outro estudo utilizando vacas adultas alimentadas por períodos diferentes com uma dieta de alta energia e proteína, foi constatado um aumento na solubilidade de colágeno e uma redução na força de cisalhamento com o tempo de alimentação, embora essas diferenças em maciez não tenham sido detectadas na avaliação sensorial (BOLEMAN et al., 1996).

Quando o tecido muscular se regenera após uma situação de atrofia, temos uma primeira fase caracterizada pela liberação de fatores de crescimento e citocina que sinalizam a proliferação de células e infiltração de células inflamatórias (TIDBALL; VILLALTA, 2010). Nesta primeira fase, a recuperação é caracterizada por um processo inflamatório, onde os macrófagos são recrutados (MCLENNAN, 1996) para promover a regeneração muscular como mediadores de remodelação de tecido. A miogênese e crescimento de miofibras é descrito como uma segunda fase de recuperação muscular da atrofia (CHAZAUD et al., 2009).

A reação inflamatória tem por conseguinte a ativação de células satélites, maturação de miofibras recém-formadas (CICILIOT; SCHIAFFINO, 2010) e remodelação. Simultaneamente ocorre a angiogênese e a proliferação de fibroblastos, permitindo ao músculo sintetizar componentes da matrix extracelular que se degradam durante a formação de novas miofibras (SERRANO; MUÑOZ-CÁNOVES, 2010). No entanto, se as células satélites perdem a sua capacidade de reparação durante o remodelamento do músculo esquelético, ocorre acumulação excessiva de matriz extracelular, levando à fibrose, que é caracterizada por quantidades aumentadas de colágeno do tipo I e III, fibronectina, elastina, proteoglicanas e laminina (UEZUMI et al., 2011). Além disso, pode ocorrer a infiltração de adipócitos (NATARAJAN; LEMOS; ROSSI, 2010), podendo ser acentuada pela idade (ALEXAKIS; PARTRIDGE; BOUGHARIOS; 2007).

As proteoglicanas possuem cadeias polissacarídicas sulfatadas (glicosaminoglicanas) ligadas de forma covalente a uma proteína central (KJELLEN; LINDHL, 1991), tendo papel importante na proliferação (RUOSLAHTI, 1989), crescimento (GALLAGHER, 1989), adesão celular (RUOSLAHTI, 1989; ESKO, 1991) e na determinação das propriedades mecânicas dos tecidos (ROUGHLEY; LEE, 1994; PINS et al. 1997). Foi observado que a expressão dessas proteínas muda à medida que ocorre um avanço no desenvolvimento muscular embrionário,

sendo esse processo relatado em galinhas (FERNANDEZ et al., 1991), perús (VELLEMAN et al., 1999) e camundongos (YOUNG et al., 1990).

Pertencente a família das proteoglicanas, a decorina é a principal proteoglicana de músculos esqueléticos, e interage com a molécula de colágeno durante a fibrilogênese, principalmente com os tipos I e II. (VOGEL et al., 1984; BROWN; VOGEL, 1989). Em animais adultos, essa proteína é encontrada no endomísio e no perimísio (EGGEN et al., 1994), e em alguns estudos ela juntamente ao colágeno parece modular a formação das fibras colágenas (VOGEL et al., 1984; VOGEL; TROTTER, 1987; WEBER et al., 1996). Além disso, a decorina parece poder modificar a arquitetura das fibrilas de colágeno no musculo de bovinos (NISHIMURA et al., 2003).

A fibronectina é considerada como uma das principais glicoproteínas adesivas da matriz do tecido conjuntivo intramuscular. Elas ligam-se às integrinas, atuando como receptores transmembrana de informação entre as células e a matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Sendo assim, essa conexão permite a modulação do crescimento, ou seja, migração, sobrevivência ou morte celular, eventos que são responsivos aos fatores de crescimento. De acordo com Velleman (2003), diferentes tecidos possuem matrizes diferenciadas, e que podem ser alteradas de acordo com o avanço da idade.

Observados todos esses aspectos, os processos de renovação de colágeno e de degradação do tecido conjuntivo *post-mortem* são potenciais candidatos à alteração pelo ritmo de crescimento muscular do animal à maturidade, com impacto na maciez da carne.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e tratamentos

O experimento foi conduzido na Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC) da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), localizada em Campo Grande, MS, Brasil. Os procedimentos envolvendo esse experimento foram aprovados pelo comitê de ética no uso animal (CEUA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, pelo protocolo #66.

Neste experimento foram utilizadas 28 vacas adultas da raça Nelore com idade entre 5 e 16 anos. Com exceção de 5 animais de alto escore e peso corporal, os outros possuíam baixo escore e peso corporal sendo randomicamente divididos em 3 grupos de tratamento em confinamento: GB. Base (n=4) – Vacas com baixo escore ($4 \pm 0,8$) e peso corporal ($355 \pm 15,8$ kg) que foram abatidos no início do experimento; GL. Lento (n=9) – Vacas com baixo escore ($4,5 \pm 1,1$) e peso corporal ($394 \pm 27,4$ kg) submetidas a recuperação lenta de peso; GR. Rápido (n=10) – Vacas com baixo escore ($4,4 \pm 1,1$) e peso corporal ($383,8 \pm 38,7$) submetidas a recuperação rápida de peso e GM. Manutenção (n=5) – Vacas com alto escore ($7,4 \pm 0,9$) e peso corporal ($500 \pm 20,1$ kg) mantidas sob alimentação até o final do experimento. A recuperação de peso dos tratamentos foi feita usando diferentes dietas (Tabela 1) e diferentes períodos (Figura 1).

Tabela 1. Composição da dieta de vacas adultas da raça Nelore submetidas a diferentes taxas de recuperação de peso corporal após um período de restrição alimentar

Alimentos	Dietas (%)		
	Lento (GL)	Rápido (GR)	Manutenção (GM) ²
Milho Grão Seco	-	52,04	-
Silagem de Sorgo	100,00	35,00	100,00
Farelo de soja 45%	-	10,00	-
Calcário	-	1,64	-
Sal Mineral	-	0,70	-
Ureia	-	0,56	-
Sulfato de Amônia	-	0,05	-
Características Nutricionais das dietas			
MS (% do MO)	30,00	52,62	30,00
NDT (% da MS)	61,00	75,25	61,00
PB (% da MS)	9,00	14,50	9,00
EE (% da MS)	3,00	3,49	3,00
FDNfe (% da MS)	52,36	20,14	52,36
Nitrogênio não proteico (% PDR)	60,00	40,96	60,00
Ganho Estimado (kg/dia)	0,60	1,20	-

MO= Matéria Orgânica, MS= Matéria Seca, NDT= Nutrientes digestíveis totais, PP= Proteína Bruta, EE= Extrato Etéreo, FDNfe= Fibra em detergente neutro fisicamente efetiva, PDR= Proteína degradável no rúmen, GL= Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso, GR= Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso, GM= Vacas com alto escore e peso corporal que mantiveram o peso até o final do experimento.

¹ Estimativas obtidas por meio do software RLM® Versão 3.2

² O grupo GM recebeu 20% a menos de quantidade de alimento em relação ao grupo GL.

Figura 1. Desenho experimental para os grupos de vacas com base na condição corporal no dia 0 do confinamento (GB – Vacas com baixo escore e peso corporal abatidas no início do experimento, GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso, GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso, GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento) e os pontos de abate (A) indicados em vermelho com seus respectivos dias (d).

O valor de escore corporal adotado foi de 1 a 9 adaptado de Nicholson e Butterworth (1986), sendo os valores: 1 a 3-Muito Magra (Falta de musculatura; Espinhas dorsais agudas ao tato; Ílios, ísquios, inserção da cauda e costelas proeminentes); 4-Magra (Costelas, ílios e ísquios ainda visíveis. Processo transversal das vértebras lombares não pode ser visto individualmente. Garupa ligeiramente côncava); 5-Moderada (Paleta e garupa com cobertura muscular média. Últimas costelas visíveis, boa musculatura sem acúmulo de gordura); 6-Boa (Espinhas dorsais não podem ser vistas, mas podem ser sentidas; Os ílios não são mais visíveis; Boa musculatura e alguma gordura na inserção da cauda; Aparência lisa), 7-Gorda (Animal suavemente coberto de musculatura, mas os depósitos de gordura não são acentuados; As espinhas dorsais podem ser sentidas com pressão firme, mas são mais arredondadas que agudas; Cupim bem cheio e acúmulo de gordura na inserção da cauda), 8 a 9-Muito Gorda (Acúmulo de gordura, visível principalmente na inserção da cauda, úbere, peito e linha do dorso; Espinhas dorsais, costelas, ílios e ísquios cobertos de musculatura não podem ser sentidos, mesmo com pressão firme). As dietas foram formuladas usando valores nutricionais e tabelas do NRC (1996), e os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e alimento durante o confinamento. Os animais dos grupos GB, GL e GR possuíam escore e peso corporal baixo em decorrência da baixa disponibilidade de alimento no período de seca. Antes da entrada no confinamento, esses animais tinham em média,

383,1±33,4 kg de peso, enquanto os animais do grupo GM tinham 500±20,1 kg. Todos os animais foram submetidos a um período de 7 dias de adaptação no confinamento, recebendo suas respectivas dietas. Porém os animais do grupo GB continuaram sob restrição alimentar, tendo acesso somente a água.

3.2. Abates

Os animais foram abatidos seguindo os padrões de ética e bem-estar animal no laboratório de carcaças da Embrapa Gado de Corte, que é regulado pelo RIISPOA e inspecionado pelo Serviço Municipal (SIM) de Campo Grande, MS. Os abates foram realizados em 4 períodos (A1, A2, A3, A4) sendo feitas pesagens e medidas de escore corporal um dia antes. O primeiro abate foi denominado como referência, e foi usado como parâmetro na análise de expressão gênica.

Amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram coletadas imediatamente após a sangria, sendo processadas em pequenos pedaços e armazenadas em criotubos no nitrogênio líquido. Após o abate, as amostras foram estocadas em ultra-freezer a -80 °C até o momento da extração de RNA.

3.3. Avaliação da qualidade da carne

Após um período de 24 horas depois de cada abate, fenótipos de carcaça como: Comprimento de carcaça interno (CC), Escore de Marmorização (EM), Espessura de gordura subcutânea (EGS), Cor instrumental (CIELAB), Área de olho de lombo (AOL) e pH foram medidas no laboratório de carcaças da Embrapa Gado de Corte. Foram coletados bifes para força de cisalhamento (FC) na região da 12ª e 13ª costela, sendo imediatamente coletados para análise as 24 horas e o outro mantido para posterior análise após 21 dias de maturação a 4°C em câmara de resfriamento controlada.

3.3.1. Área de olho de lombo, Espessura de gordura subcutânea e Escore de Marmorização

O Escore de marmorização (EM) foi realizado de maneira subjetiva de acordo com a escala 1 a 18 adotada por Muller (1987), sendo os baixos valores associados a menor conteúdo de gordura intramuscular, e altos valores para maior quantidade de gordura intramuscular. A EGS foi medida entre a 12ª e 13ª costela no músculo *Longissimus thoracis* com o auxílio de um paquímetro digital. A AOL foi obtida pela medida do perímetro exterior do músculo delineado com um marcador de tinta em um papel vegetal, que posteriormente foi calculado em um equipamento da marca Li-color, modelo 3100.

3.3.2. pH

Os valores de pH foram tomados no músculo *Longissimus thoracis* utilizando um aparelho-probe portátil (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), modelo HI 99163DM-2 com um eletrodo combinado modelo HI99163.

3.3.3. Cor instrumental

A cor do músculo *Longissimus thoracis* foi determinada por meio de um colorímetro miniscan XE PLUS da marca Hunter Lab, de iluminante A, usando 10° graus de ângulo. Para cada animal foram feitas três medidas repetidas em pontos diferentes no músculo, e a média desses valores foi usado como valor individual. O mesmo procedimento foi realizado para mensuração da cor na gordura.

O sistema utilizado para a avaliação foi o CIELAB, no qual o L^* indica o valor de luminosidade, e o a^* e o b^* , intensidade entre verde à vermelho, e intensidade entre azul à amarelo respectivamente. Os valores para Chroma ($a^{*2}+b^{*2}$) e Ângulo Hue ($\tan^{-1}(b^*/a^*)$) foram obtidos a partir dos valores de L^* , a^* e b^* de acordo com MacDougal (1994).

3.3.4. Força de Cisalhamento

Os bifes obtidos (24 horas e 21 dias *post-mortem*) foram descongelados em geladeira "over night" e assados no dia seguinte até atingirem a temperatura interna de 71 °C. Posteriormente os bifes foram resfriados, e de cada bife foram retiradas 6 amostras cilíndricas medindo 1,27 cm de diâmetro e cerca de 2,5 cm de comprimento, atentando ao sentido paralelo das fibras musculares. O cisalhamento foi realizado em um texturômetro da marca TA XT PLUS, com corte sendo feito perpendicularmente a orientação das fibras musculares para a obtenção dos valores em quilograma-força (kgf).

3.4. Extração de RNA

Para o processo de extração do RNA total, foi utilizado o reagente TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante, com as amostras de músculo colhidas imediatamente após o abate. Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de trizol utilizando Ultra Turrax T10 (IKA, Staufen, Alemanha). Após cinco minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio ao homogenato, e fez-se novamente a incubação por cinco minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, mais uma vez o material foi centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C, tendo a fase aquosa superior

transferida para um novo tubo. Neste, foi adicionado 500 μ L de isopropanol, deixando o material sob temperatura ambiente por dez minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por dez minutos a 4°C e o pellet lavado em 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10.000xg por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, o pellet foi desidratado a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μ L de água-DEPC (0,01%). A integridade do RNA foi verificada utilizando gel de agarose a 1% e Bioanalyser 2100 (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA, USA) para obtenção do número de integridade do RNA (RIN). Somente as amostras com valores de RIN acima de 7 foram usadas para preparação das bibliotecas.

3.5. Preparação de biblioteca e sequenciamento

Para a construção das bibliotecas, foram utilizados 2 μ g do RNA total de cada amostra. Essas foram purificadas e fragmentadas com o uso do TruSeq RNA Sample Prep Kit v2, procedimento realizado para separar as moléculas de RNA mensageiro (2 a 4% do RNA total) do restante do RNA, através da ligação dessas moléculas às caudas poli-T aderidas aos “beads” magnéticos. Uma vez purificado e fragmentado, à síntese da primeira fita de cDNA com o uso de primers aleatórios (hexâmeros) e da enzima transcriptase reversa; uma vez sintetizada, passa-se para a etapa de remoção do RNA mensageiro e síntese das segundas fitas de cDNA, as quais foram purificadas com o uso de beads magnéticos (Agencourt® Ampure XP, Beckman Coulter). As duplas fitas de cDNA foram reparadas para ficarem “blunt end”, seguido pela adenilação das extremidades 3’ para evitar a formação de concatâmetros entre as fitas e permitindo a ligação correta dos adaptadores, os quais são necessários para a correta hibridização dos fragmentos na flow cell e também para que o sequenciamento das moléculas ocorra. Há então um enriquecimento dos fragmentos de cDNA via reação em cadeia da polimerase (PCR), pelo qual apenas os fragmentos que possuem adaptadores são selecionados e amplificados através de primers específicos que se anelam ao final dos adaptadores.

A biblioteca foi então purificada e validada em Bioanalyzer, conferindo a quantidade e tamanho dos fragmentos presentes na amostra. Todas as amostras foram diluídas para 10nM, sendo que nesta etapa é possível fazer o multiplex de amostras através do uso de indexes (oligonucleotídeos de 7 pb) específicos.

Passada a fase de preparo, as amostras foram colocadas no equipamento “cBot” (Illumina), clusterizando as amostras na flow cell. Para isso, foi utilizado um kit de reagentes específicos (TruSeq™ SR e Cluster kit v2 – cBot - HS) e também um conjunto de capilares que transfere as amostras e os reagentes para a flow cell (HiSeq cBot Manifold). A clusterização foi feita por 4 horas, e após isso a flow cell ficou pronta para ser colocada no sequenciador

(HiScanSQ, Illumina). A flow cell contendo 38 bibliotecas foi colocada para o sequenciamento no HiScanSQ (Illumina) no centro de Genômica da ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.6. Controle de Qualidade, mapeamento e contagem de reads

Após o sequenciamento foi realizada a visualização da qualidade dos reads pelo FASTQC versão 0.10.1 (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/). Em seguida, foi utilizado o programa Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean/downloads>) usando como parâmetro máximo de qualidade 24 Phred de erro médio. As sequências de vetores e adaptadores do banco de dados Univec (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/>) foram usadas como guia para remoção de possíveis contaminantes durante o controle de qualidade. Os reads foram mapeados em relação ao genoma de *Bos taurus taurus* UMD 3.1 (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/) utilizando o programa TopHat version 2.0.5, e considerando no máximo 1 mismatch (KIM et al., 2013). A contagem das sequências (abundância de RNA) para todos genes foi calculada usando o programa HTSeq version 0.6.1 (ANDERS; PYL, 2015). As sequências que foram mapeadas para múltiplas características ou que por acaso se sobrepuseram foram descartadas.

3.7. Análise de expressão diferencial de genes

Com a matriz de contagem de genes, realizamos análise de expressão diferencial no pacote voom limma R (versão 3.32.2) ajustando no modelo a idade das vacas como co-variável e usando a normalização TMM. Para explorar a relação entre a expressão gênica e os tratamentos (recuperação de peso), a análise de componentes principais (PCA) foi realizada em edgeR usando as cópias logarítmicas por milhão ($\log_2\text{CPM}$). Foram formados 5 contrastes usando o grupo GB como referência, buscando encontrar genes diferencialmente expressos (DE) usando o valor ajustado (FDR) de $P \leq 0,05$ e $\log_2\text{FC} \geq 1$.

3.8. Análise de enriquecimento funcional

A análise de enriquecimento funcional de genes DE para KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways foi feita com a plataforma online DAVID (Database for Annotation, Visualization e Integrated Discovery) versão 6.8 (HUANG et al., 2007), no qual foram obtidas as vias enriquecidas para cada um dos contrastes formados. Dentro da mesma plataforma também foi utilizada a ferramenta de análise funcional e categorias GO (Gene Ontology).

3.9. Análise Estatística

O experimento foi um delineamento inteiramente casualizado (CRD). As diferenças estatísticas entre as velocidades de ganho de peso foram analisadas quanto aos caracteres de carcaça e qualidade da carne no software R (versão 3.4.0), utilizando o modelo linear (LM) do pacote Agricolae versão 1.2.4 para a análise ANOVA e teste de Tukey. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (desvio padrão) com significância estatística em $P \leq 0,05$. Calculamos os coeficientes de correlação de Pearson entre os fenótipos de carne (Marmorização, EGS, AOL e FC às 24 horas e 21 dias) usando o pacote Hmisc versão 4.0.3 também do programa R.

4. RESULTADOS

4.1. Características fenotípicas durante a recuperação de peso

Na Figura 2 e 3 podemos observar o comportamento do crescimento por meio do peso vivo e escore corporal dos animais em cada grupo de tratamento. É possível perceber que a condição corporal das vacas do grupo GM era diferente dos animais dos outros tratamentos no início do experimento. Além disso, é notório que as vacas do grupo GR recuperaram o peso mais rapidamente, atingindo uma média de 526,5 kg aos 73 dias em relação ao grupo GL (434,75 kg no mesmo período). Sendo assim, um efeito claro dos tratamentos foi observado, pois os animais partiram de um mesmo ponto com pesos quase similares.

Figura 2. Peso médio de vacas adultas da raça Nelore distribuídas em grupos (GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso, GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso, GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento) e os períodos de pesagem (P) indicados com seus respectivos dias (P1 – dia 0; P2 – 50 dias; P3 – 73 dias; P4 – 103 dias).

Por outro lado, os animais do grupo GM obtiveram um ganho de peso muito próximo ao grupo GL durante os 104 dias de confinamento, mesmo partindo de uma condição corporal diferenciada (Figura 3). Observando o grupo GL na Figura 2 percebe-se que o peso dos animais é menor aos 73 dias de confinamento, porém na Figura 3 podemos identificar um aumento gradual

no escore corporal. Por outro lado, os animais do grupo GM (Figura 2) parecem manter o escore corporal, mesmo sendo observado um aumento médio de peso para esse grupo.

Figura 3. Escore corporal médio de vacas adultas da raça Nelore distribuídas em grupos (GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso, GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso, GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento) e os períodos (P) de avaliação do escore indicados com seus respectivos dias (P1 – dia 0; P2 – 50 dias; P3 – 73 dias; P4 – 103 dias).

O resumo das características fenotípicas dos grupos de tratamento está apresentado na Tabela 2. A variável de peso ao abate mostra a média dos animais abatidos no seu respectivo período, valor que é diferente do apontado na Figura 2 que considera o peso dos animais que foram abatidos e o peso dos demais animais que continuaram em confinamento e foram abatidos posteriormente.

O peso vivo médio do grupo GL em ambos os abates não diferiu, com aumento esperado em relação ao GB. O GR no abate 2 apresentou peso vivo médio intermediário quando comparado ao GL em ambos os abates. No abate 3 o GR já apresentava valores próximos do GM no abate 4. No escore de condição corporal verificou-se uma progressão gradual a partir do GL que obedeceu ao ritmo de reposição de peso e ponto de abate na seguinte sequência crescente: GL-A2, GL-A4/GR-A2, GR-A3 e GM.

Tabela 2. Comparação de fenótipos de carcaça e qualidade da carne no músculo *Longissimus thoracis* de vacas adultas Nelore submetidas a velocidades de recuperação de peso e pontos de abate

	GB	GL		GR		GM	Valor de P<
Fenótipos	Abate 1	Abate 2	Abate 4	Abate 2	Abate 3	Abate 4	
Número de vacas	4	5	4	4	6	5	
Peso ao abate (kg)	324±24 ^a	447±35 ^b	440±34 ^b	452±15 ^{bc}	520±59 ^{cd}	583±35 ^d	<0,0001
EC	2,7±1,0 ^a	5,8±0,8 ^b	6,2±1,0 ^{bc}	6,5±0,6 ^{bc}	7,5±0,5 ^{cd}	8,8±0,4 ^d	<0,0001
CC (cm)	130±3	136±2,4	136±5,6	137±3,3	139±7,1	140±6,1	0,0920
EM	5,5±1,0	6,4±5,2	4,2±2,6	7,2±2,1	4,8±3,1	8,4±3,0	0,3900
EGS (mm)	1,57±0,7 ^a	3,69±1,5 ^a	3,52±1,2 ^a	3,67±0,2 ^a	6,83±1,3 ^b	8,22±2,8 ^b	<0,0001
AOL (cm ²)	41,1±3,7 ^a	54,9±8,6 ^{ab}	51,5±3,5 ^{ab}	53,0±9,9 ^{ab}	62,9±6,2 ^{bc}	76,5±11,6 ^c	<0,0001
FC 24 horas (kgf)	8,62±1,7	6,82±1,9	6,53±0,9	7,04±1,8	7,19±1,0	5,99±1,1	0,2000
FC 21 dias (kgf)	8,89±3,0 ^a	5,99±1,4 ^{ab}	5,72±0,5 ^b	6,38±1,5 ^{ab}	6,15±1,3 ^{ab}	4,89±1,0 ^b	0,0140
pH 24 horas	5,78±0,3	5,72±0,1	5,65±0,1	5,62±0,1	5,42±0,3	5,58±0,1	0,1000
L* Músculo	35,0±2,4 ^a	36,6±1,7 ^a	38±1,7 ^{ab}	37,7±1,8 ^{ab}	41,0±1,8 ^b	38,1±2,5 ^{ab}	0,0032
a* Músculo	22,0±1,5 ^a	23,6±0,9 ^a	23,9±1,1 ^{ab}	24,2±1,2 ^{ab}	25,8±1,3 ^b	24,3±0,9 ^{ab}	0,0021
b* Músculo	13,9±1,7 ^a	14,7±0,9 ^a	15,1±0,9 ^{ab}	15,8±0,9 ^{ab}	17,3±1,6 ^b	15,6±0,9 ^{ab}	0,0071
L* Gordura	76,5±4,2	72,7±3,3	71,8±3,4	69,7±7,1	71,1±2,1	70,1±2,5	0,1800
a* Gordura	20,5±9,5	20,2±3,3	15,6±2,6	22,1±5,2	19±2,5	19,4±3,2	0,5300
b* Gordura	35,3±5,2 ^a	31,9±4,6 ^{ab}	30,9±4,3 ^{ab}	26,5±1,8 ^b	27,5±3,3 ^b	36,4±3,2 ^a	0,0030
Chroma da Músculo	26,0±2,1 ^a	27,8±1,3 ^a	28,2±1,4 ^{ab}	28,8±1,5 ^{ab}	31,0±1,9 ^b	28,9±1,2 ^{ab}	0,0030
Ângulo Hue do Músculo	32,1±1,6	31,9±0,7	32,4±0,5	33,1±0,3	33,7±1,4	32,6±0,7	0,0845
Chroma da Gordura	41,3±7,6	37,9±3,3	34,7±4,7	34,7±4,6	33,5±3,3	41,3±4,1	0,0479
Ângulo Hue da Gordura	60,9±10,9	57,4±7,0	63,2±3,0	50,6±5,1	55,3±4,2	62,1±2,5	0,0424

Abates= (1) 0 dias de confinamento; (2) 51 dias de confinamento; (3) 74 dias de confinamento; (4) 104 dias de confinamento

Grupos = GB – Vacas com baixo escore e peso corporal abatidas no início do experimento; GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso; GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso; GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento.

EC: Escore Corporal (1 a 3- Muito Magra, 4- Magra, 5- Moderado, 6- Boa, 7- Gorda, 8 a 9- Muito Gorda)

CC: Comprimento de carcaça interno; EM: Escore de Marmorização (1 à 18); AOL: Área de olho de lombo; EGS: Espessura de Gordura Subcutânea; FC: Força de cisalhamento

Chroma ($a^{*2}+b^{*2}$) e Ângulo Hue ($\tan^{-1}(b^*/a^*)$)

Resultados estão expressos como média ± desvio padrão.

^{a-d}Diferenças significativas dos valores de médias na linha estão representados pelas letras em sobrescrito ($P \leq 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas para CC, no entanto, verificamos mudanças efetivas nos valores de AOL e EGS. Os grupos GB e GM apresentaram menores e maiores valores respectivamente para as duas características, sendo o grupo GR (A3), o único a atingir valores similares ao grupo GM.

Nos fenótipos associados a qualidade da carne (Tabela 2), não identificamos diferenças significativas ($P > 0,05$) para o EM, pH e FC às 24 horas. Entretanto, a FC aos 21 dias foi menor ($P \leq 0,05$) no grupo GL e GM (A4) em relação ao GB. Os outros grupos apresentaram valores intermediários.

Os valores de L*, a* e b* da carne foram maiores para o grupo GR (A3) em relação aos outros grupos. Na gordura, somente o valor de b* foi diferente ($P \leq 0,05$), sendo esse menor para ambos os abates do grupo GR em comparação aos grupos GB e GM.

As características da carne apresentaram correlações altas e moderadas (Tabela 3, $P \leq 0,05$). Entre os tempos de FC (24 horas e 21 dias) a correlação foi positiva alta (0,707), assim como a correlação positiva entre AOL e EGS (0,614). Porém, foi observado também uma correlação moderada e negativa da AOL com a FC aos 21 dias.

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre fenótipos de carcaça e qualidade de carne do músculo *Longissimus thoracis* de vacas adultas Nelore divididas em grupos de crescimento (GB – Base; GL – Lento; GR – Rápido; GM – Manutenção) e abatidas em diferentes períodos durante o confinamento (A1 – 0 dias; A2 – 51 dias; A3 – 74 dias; A4 – 104 dias).

	EM	EGS	AOL	FC – 24 horas
EM	1			
EGS	0,0843	1		
AOL	0,2482	0,6140**	1	
FC – 24 horas	-0,3231	-0,2965	-0,3199	1
FC – 21 dias	-0,2944	-0,3086	-0,4057*	0,7070***

EM: Escore de Marmorização (1 a 18); AOL: Área de olho de lombo; EGS: Espessura de Gordura Subcutânea; FC: Força de cisalhamento; Valores de significância apresentados: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$).

4.2. Expressão gênica diferencial

A partir da análise de componentes principais (PC), observamos na Figura 4 que o PC1 e PC2 explicaram 10 e 8% da variação total, respectivamente. A grande variabilidade apresentada entre bibliotecas pode estar associada a dificuldade em determinar diferenças de expressão entre os contrastes com os grupos GL (A2, A4) e GR (A2 e A3).

Figura 4. Projeção de bibliotecas de RNA-seq em plano definido pelos dois primeiros principais componentes (PC) de vacas adultas Nelore submetidas a diferentes grupos de recuperação de peso (GB – Base; GL – Lento; GR – Rápido; GM – Manutenção) e abatidas em diferentes períodos (A1 – 0 dias; A2 – 51 dias; A3 – 74 dias; A4 – 104 dias).

Um total de 12187 genes expressos foram identificados nesse experimento, sendo 578 desses considerados como diferencialmente expressos entre os contrastes que foram feitos. A Tabela 4 mostra a quantidade de genes expressos identificados para alguns contrastes, e distribuição dos genes de acordo com sua regulação, sendo os down-regulated genes com maior

com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento) e os períodos de abate (A) indicados com seus respectivos dias em confinamento (A1 – 0 dias; A2 – 51 dias; A3 – 74 dias; A4 – 104 dias).

4.3. Análise funcional de DE genes entre os contrastes

Os genes diferencialmente expressos obtidos em cada contraste foram utilizados na plataforma DAVID para a análise funcional. Foram encontradas 9 vias metabólicas KEGG (Tabela 5) e 5 categorias GO enriquecidas (Tabela 6).

Tabela 5. Vias metabólicas e número de genes diferencialmente expressos obtidos de acordo com o enriquecimento KEGG nos contrastes de grupos de vacas adultas Nelore submetidas a diferentes taxas de recuperação de peso após um período de restrição alimentar.

Vias KEGG	Contrastes	Genes	P valor	P ajust.
Ribosome	GB x GM (A4)	6	0.0006	0.0410
ECM-receptor interaction	GB x GR (A2)	12	<0.0001	0.0002
Focal adhesion	GB x GR (A2)	17	<0.0001	0.0004
Protein digestion and absorption	GB x GR (A2)	11	<0.0001	0.0004
PI3K-Akt signaling pathway	GB x GR (A2)	18	0.0005	0.0270
Focal adhesion	GB x GR (A3)	26	<0.0001	<0.0001
ECM-receptor interaction	GB x GR (A3)	17	<0.0001	<0.0001
Amoebiasis	GB x GR (A3)	17	<0.0001	<0.0001
Protein digestion and absorption	GB x GR (A3)	14	<0.0001	<0.0001

Abates = (A1) 0 dias de confinamento; (A2) 51 dias de confinamento; (A3) 74 dias de confinamento; (A4) 104 dias de confinamento
 Grupos = GB – Vacas com baixo escore e peso corporal abatidas no início do experimento; GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso; GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso; GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento

A maior parte das vias enriquecidas foram nos contrastes do grupo GB em comparação ao grupo GR em ambos os abates. Por outro lado, nenhuma via foi enriquecida para o grupo GL (A4), provavelmente devido a baixa quantidade de genes diferencialmente expressos.

Tabela 6. Categorias GO e número de genes diferencialmente expressos obtidos nos contrastes de grupos de vacas adultas Nelore submetidas a diferentes taxas de recuperação de peso após um período de restrição alimentar.

Type	GO terms	Contrastes	Genes	P valor	P ajust.
MF	Semaphorin receptor activity	GB x GL (A2)	5	<0.0001	0.0530
BP	Cellular response to amino acid stimulus	GB x GR (A2)	8	<0.0001	0.0200
CC	Collagen trimer	GB x GR (A2)	11	<0.0001	0.0001
MF	Extracellular matrix structural constituent	GB x GR (A2)	9	<0.0001	0.0005
MF	Extracellular matrix structural constituent	GB x GR (A3)	9	<0.0001	0.0091

Abates = (A1) 0 dias de confinamento; (A2) 51 dias de confinamento; (A3) 74 dias de confinamento; (A4) 104 dias de confinamento
 Grupos = GB – Vacas com baixo escore e peso corporal abatidas no início do experimento; GL – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação lenta de peso; GR – Vacas com baixo escore e peso corporal submetidas a recuperação rápida de peso; GM – Vacas com alto escore e peso corporal submetidas a manutenção do peso até o fim do experimento

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos grupos para fenótipos de carne

Em conjunto, os resultados de peso vivo médio e escore de condição corporal apontaram para um progresso gradual com maior incremento esperado para o GR em período mais longo de confinamento quando comparado com GB, e valores que se aproximaram do grupo GM. Estas medidas corporais corroboram as alterações em massa muscular e deposição de gordura subcutânea, com aumento gradual da primeira observada pelas alterações na AOL e uma necessidade de maior ritmo de crescimento e recuperação da massa muscular, permitindo aumento na espessura de gordura subcutânea relacionados ao maior peso vivo médio e escore de condição corporal. A AOL e EGS foram moderadamente correlacionadas, confirmando o que já havíamos observado anteriormente, que durante o crescimento muscular, o tecido adiposo aumenta na região periférica do músculo *Longissimus thoracis* na medida que o animal se aproxima de seu tamanho à maturidade, incluindo-se a massa muscular. Esta sequência de reposição segue o crescimento relativo dos componentes teciduais descrito por Owens et al. (1993).

A alta correlação positiva entre as FC (Tabela 3) indicam que carnes mais duras as 24 horas *post-mortem* provavelmente serão mais duras também aos 21 dias de maturação, e que confirma o forte efeito de componentes intrínsecos que afetam essa característica. A menor FC aos 21 dias (Tabela 2) encontrada para GL e GM no abate 4, quando comparados ao GB, poderia ser um efeito do tempo de recuperação de peso. Todavia, as FC dos grupos de reposição corporal ficaram em condição intermediária, sem diferir do maior valor do GB e dos menores valores de GL e GM (A4), indicando a possibilidade de incremento gradual na maciez durante o crescimento de reposição. Este incremento pode ser decorrente da alteração da renovação proteica durante o crescimento muscular, que também pode ser confirmada pela correlação moderada e negativa observada entre FC aos 21 dias e AOL. Animais sob restrição alimentar submetidos a um processo de realimentação apresentam uma maior taxa de renovação proteica muscular, e esse aumento da síntese proteica pode afetar a maciez da carne (Therkildsen et al., 2002). Por outro lado, a pequena alteração da maciez pode estar relacionada com limitações no processo proteolítico típico de animais *Bos taurus indicus* (WHIPPLE et al., 1990), que ainda estaria associado a atividade diminuída do sistema das calpaínas em animais adultos (CRUZEN et al., 2014).

Os valores não significativos de FC as 24 horas entre os grupos sugerem que não existe um efeito significativo do ganho compensatório nessa variável. No entanto, existe relato da redução da FC as 24 horas *post-mortem* de vacas de descarte da raça Angus realimentadas após um

período de restrição alimentar (MATULIS et al., 1987). Talvez esse comportamento ocorra devido a menor maciez na carne encontrada em *Bos taurus indicus* (WHIPPLE et al., 1990), especificamente devido aos maiores teores de calpastatina *post-mortem* encontrados nesse tipo biológico (KOOHMARAIE et al., 1992; O' CONNOR et al., 1997).

Não foram identificadas diferenças significativas para pH entre os grupos avaliados nesse experimento, resultado também já observado em novilhos sob ganho compensatório (KEADY et al. 2017). Por outro lado, animais submetidos a diferentes taxas de crescimento podem apresentar o pH muscular diferente as 24 horas, sendo esse comportamento observado tanto em vacas de descarte (MATULI et al., 1987), como em touros (COSTA et al., 2015). Apesar disso, os valores de pH parecem se manter situados abaixo de 5,8. No nosso modelo experimental, o comportamento poderia ser similar se considerássemos o valor de $P \leq 0,1$, no qual teríamos diferenças de GB para GR (A3) e GM, porém, os valores médios também continuariam situados dentro da faixa de normalidade. De qualquer forma, considerando essa diferença, a possível explicação para esses resultados poderia a ser a diferença na quantidade de gordura e alimentação entre os grupos, pois esta teria impacto na disponibilidade de glicogênio, o que permite o declínio normal do pH (IMMONEN et al., 2000).

Os animais do grupo GR (A3) apresentaram valores significativamente maiores para L^* , a^* , b^* e chroma no músculo em relação ao grupo GB. O aumento da intensidade dessas medidas já foi reportado em animais em ganho compensatório (HORNICK et al. 1998), e podem indicar a mudança de um vermelho escuro para um vermelho mais claro na carne desses animais. Por outro lado, a restrição nutricional em bovinos pode causar a diminuição de miofibras do tipo 2 (glicolítica rápida) e consequentemente manter uma maior concentração de fibras de tipo 1 (oxidativas lentas) (LEHNERT et al., 2006). Dessa forma, durante a renovação e aumento da massa muscular dos animais em rápida recuperação de peso, as concentrações de fibras retornam ao normal, podendo explicar a diferença entre as variáveis de cor obtidas entre os grupos. Além disso, o pH final está altamente correlacionado com a cor da carne, principalmente com o valor L^* (MANCINI; HUNT, 2005), e considerando os valores de pH encontrados entre os nossos grupos, essa também poderia ser uma possível explicação para a diferença em cor.

O menor valor de b^* na gordura do grupo GR (Tabela 2) em relação ao GB indica uma menor intensidade de amarelo, e pode estar associado a uma gordura com aspecto mais claro. Dessa forma parece existir um efeito da taxa de crescimento sobre essa característica. Esse comportamento tem sido observado em alguns trabalhos (REALINI et al., 2004; DEL CAMPO et al., 2008) no qual os autores observaram menores valores de b^* em animais em confinamento em comparação com animais a pasto. A cor da gordura é fortemente dependente do conteúdo de

carotenóides que estão presentes em alta quantidade nas pastagens e em baixa quantidade nos grãos (TUME; YANG, 1996; COOKE et al., 2004). Por outro lado, as diferenças na taxa de deposição de gordura também podem ter contribuído para diferenças no valor de b^* , devido à diferentes taxas de diluição do conteúdo total de carotenóides (FRENCH ET AL., 2000), podendo impactar a intensidade de amarelo na gordura desses animais. Sendo assim, essa possível mudança em valores de b^* podem ser determinantes na cor da gordura, sendo que esta é importante a nível de mercado por ter uma maior preferência pelos consumidores na Europa assim como no mercado Norte Americano (DEL CAMPO et al., 2008; KERTH et al., 2007).

Não foram identificadas diferenças para EM, provavelmente devido a grande variação dessa característica. Porém, em termos médios parece haver uma redução desse escore durante o período de realimentação (entre A1 e A4) para ambos os grupos avaliados. Esse comportamento provavelmente está associado a mudança da relação da AOL e escore de marmorização, visto que a primeira aumentou de maneira significativa como já reportado anteriormente. Outro ponto importante observado foi que ao mesmo tempo que parece haver uma redução do EM, foi observado um aumento significativo da EGS dos grupos GL e GR em relação ao grupo GB. Esses resultados de marmorização não apenas confirmam o menor potencial de deposição de gordura intramuscular na raça Nelore, como também vão de acordo com o Hornick et al. (1998), mostrando que o efeito do ganho compensatório aumenta a proporção de gordura periférica e reduz a gordura intramuscular no músculo.

Em geral, todos esses resultados observados sugerem mudanças significativas em algumas características de qualidade da carne e gordura, sendo estas influenciadas pelo efeito do ganho compensatório.

5.2. Expressão diferencial a análise funcional

Dos sete genes diferencialmente expressos que foram encontrados em todos os contrastes formados, somente cinco (*DDO*, *NEDD4*, *COL4A1*, *ATF5*, *SERPINH1*) estão identificados na literatura. Para todos os contrastes os genes *DDO* e *NEDD4* mostraram maior expressão nos animais do grupo GB. O gene *DDO* (D-aspartato oxidase) atua como um agonista no sítio glutamato e pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do organismo e está associado a funções endócrinas (BOEHNING; SNYDER, 2003). Além disso, esse gene foi identificado em várias proteínas de humanos idosos, provavelmente devido à redução da eficiência metabólica nesses indivíduos (SILVA; SILVA, 2009). Por outro lado, o gene *NEDD4* está expresso no músculo esquelético, estado localizado na região do sarcolema (KONCAREVIC; JACKMAN; KANDARIAN, 2007) e associado à atrofia muscular, uma vez

que parece ser capaz de inibir a ação dos sinais Notch (Notch Flags), sinais que são sugeridos por desempenhar um papel fundamental no potencial de regeneração muscular, sendo este potencial diminuído em decorrência do aumento da idade (CONBOY et al., 2003).

Os genes *COL4A1*, *SERPINH1* e *ATF5* foram positivamente regulados para ambos os grupos de animais submetidos a realimentação. O gene *COL4A1* tem sido descrito (PURSLOW, 2005) como o principal componente não fibroso da membrana basal, mas responsável pela ligação da camada fibrosa do endomísio à membrana celular muscular (sarcolema). No mesmo sentido, a proteína codificada pelo gene *SERPINH1* desempenha um papel de síntese de colágeno como uma co-chaperona (*HSP47*) na retículo endoplasmático, principalmente para a formação da tripla-hélice do colágeno (LINDERT et al., 2015). O papel do gene *ATF5* tem sido relacionado à modulação da sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e homeostase. Em condições normais, o *ATF5* tem uma meia-vida curta e é rapidamente degradado devido a modificações pós-tradução. Por outro lado, o *ATF5* é regulado positivamente em células sob estresse (GAITHER, MADARAMPALLI, LIU, 2017). Sendo assim, esse cenário de expressão sugere modificações em tecido conjuntivo associado a um processo de estresse celular durante a recuperação de peso nos animais dos grupos GL e GR. Por outro lado, os genes positivamente regulados no grupo GB indicam que os animais estavam em processo de regulação fisiológica para gasto de energia e renovação proteica muscular, devido principalmente a baixa condição corporal dos animais desse grupo.

5.2.1. Base vs Manutenção

No enriquecimento do contraste entre Base e Manutenção (GBvsGM), apenas uma via significativa de KEGG (*Ribosome*) foi encontrada, esta via (Tabela 5) está relacionada com a síntese da proteína ribossômica, ou seja, o controle da expressão gênica. Os genes enriquecidos nesta rota foram *RPL10A*, *RPL21*, *RPL27A*, *RPL35A*, *RPL5*, *RPS4X*. Estes genes e outros da mesma família foram descritos em vários estudos associados ao processo de restrição e realimentação (CASSAR-MALEK et al., 2007; KEOGH et al., 2016A; KEOGH et al., 2016B). Como todos os genes identificados se apresentavam com maior expressão para o grupo GB, é possível afirmar que fisiologicamente, esses animais estariam controlando a síntese proteica devido à baixa condição corporal. Essa hipótese pode ser verdade pois a resposta hipertrófica no músculo esquelético envelhecido está associada à diminuição da biogênese do ribossomo (KIRBY et al., 2015).

5.2.2. Base vs Ganho Lento

Encontrou-se apenas uma via GO enriquecida (Tabela 6) no abate 2 para o contraste GBvsGL, a *Semaphorin receptor activity*. Esta via indica uma função molecular associada a sinalização para o desenvolvimento muscular. Os genes comuns (*PLXNA1*, *PLXNB1*, *PLXNB2*, *PLXND1* e *MET*) apresentados nesta via estão associados a domínios extracelulares de plexina com aproximadamente 500 aminoácidos de domínios de semaforina. O gene *MET* representa o receptor c-met (proto-oncogene) para a proteína HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), o último mostrando a capacidade de estimular as células satélites adultas a ciclos anteriores (TATSUNAMI et al., 1998). Além disso, *MET* foi relatado como um gene capaz de aumentar a atividade das metaloproteinases e estimular a angiogênese (HENNINGSEN et al., 2010). No entanto, outros genes não agrupados nesta via também estão associados ao processo de regulação do desenvolvimento muscular, como *SEMA3B*, *SEMA3F* e *NFAT5*. Os genes *SEMA3B* e *SEMA3F* (família das semaforinas) estão ligados ao desenvolvimento do músculo esquelético, resposta imune e regulação da angiogênese (TAMAGNONE et al., 1999). O gene *NFAT5* foi descrito com um regulador da miogênese durante a regeneração muscular. Em um estudo em camundongos (O'CONNOR et al., 2007), a expressão de *NFAT5* causou um efeito migratório bem como a diferenciação de mioblastos. Outros genes diferencialmente expressos associados à renovação do colágeno (*COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A3*, *COL6A2*, *COL11A2*, *COL18A1*), reestruturação da matriz extracelular (*EMILIN1*, *HAPLN3*, *LAMA5*, *PKN3*, *VAV2*) e crescimento muscular (*ATP2B2*, *KRAS*, *MYL9*, *ZYX*) também foram encontrados regulados no contraste GBvsGL2.

Embora não tenham sido encontradas vias metabólicas significativas no contraste GBvsGL4, os genes *COL4A1*, *COL4A2*, *IGFBP6*, *MET* e outros em comum para todos os contrastes, mostram a existência de um estímulo para a modificação no tecido conjuntivo e crescimento do músculo, mas de forma reduzida em relação ao contraste GBvsGL2. Presumimos que a dieta oferecida aos animais no grupo GL não foi suficiente para promover modificações mais complexas durante um período mais longo de recuperação de peso. Isto pode ser confirmado pelo peso médio (Figura 2) dos animais no abate 4, ou seja, esses animais foram mais afetados fisiologicamente pelo período inicial de realimentação, mas com alterações nos fenótipos observados no contraste GBvsGL4.

5.2.3. Base vs Ganho Rápido

Em ambos os contrastes GBvsGR2 e GBvsGR3, encontramos quatro caminhos de KEGG e GO estimulados semelhantes (Tabela 5 e Tabela 6): *ECM-receptor interaction*, *Focal adhesion*, *Protein digestion and absorption* e *Extracellular matrix structural constituent*. As outras vias, *PI3K-Akt signaling pathway*, *Amoebiasis*, *Collagen trimer* e *Cellular response to amino acid stimulus* foram enriquecidas exclusivamente para cada contraste. Identificamos rotas metabólicas quase todas especificamente associadas a renovação de tecido conjuntivo. Nessas mesmas rotas, identificamos genes como *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL5A2*, *COL5A3*, *COL6A1*, *COL6A2*, *COL11A2*, *COL18A1* e *COL6A3*, *COL15A1* apenas presentes no contraste GBvsGR3. Todos esses genes estão ligados à síntese de colágeno, principalmente o tipo 1 e 3, uma vez que eles são os mais abundantes no tecido esquelético e ordem afetar a maciez da carne (BLANCO; ALONSO, 2010). Como esses genes tiveram uma maior expressão para o grupo GR, entendemos que esses animais estavam em um processo intenso e complexo de renovação de colágeno intramuscular em relação ao grupo GL.

Outros genes em comum também foram diferencialmente expressos entre os contrastes GBxGR2 e GBxGR3: *HSPG2*, *HAPLN3*, *LAMA5*, *MYL9*, *VAV2* e *ZYX*. Os genes *MYL9* e *ZYX* foram relatados na literatura como ativos no processo de desenvolvimento muscular, sendo o *MYL9* representado na síntese da cadeia leve da miosina (LICHT et al., 2010) e *ZYX* modulando a organização de feixes de actina no citoesqueleto (CRAWFORD; MICHELSEN; BECKERLE, 1992). Os outros genes estão associados a proteínas proteoglicanas que compõem a matriz extracelular e têm um papel estabilizador para outras moléculas, além de promover a adesão celular (BEACHLEY et al., 2015; GALIMOV et al., 2016; GOPAL et al., 2016).

Nas vias enriquecidas do contraste GBxGR2, identificamos outros importantes genes diferencialmente expressos *MET*, *EMILIN1*, *PKN3*. O gene *MET* previamente mencionado está indiretamente associado ao processo de estimulação do crescimento muscular, *EMILIN1* e *PKN3* são genes importantes na codificação das proteínas da matriz extracelular do tecido conjuntivo (COLOMBATTI et al., 2000; MÖPERT et al., 2012), como a elastina e outras microfibrillas responsáveis por junções celulares. Esses genes mostraram-se regulados para os grupos GL e GR no abate 2, indicando novamente processos estimuladores semelhantes entre tratamentos, mas com mudanças mais complexas para o grupo GR. Já o gene *PLOD3* encontrado foi descrito como um fator importante para a manutenção e a estabilidade das ligações cruzadas (HAUTALA et al., 1992) de moléculas de colágeno, que podem ser uma das diferenças fisiológicas entre os tratamentos.

As vias enriquecidas no contraste GBvsGR3 mostraram também genes importantes no processo de crescimento do tecido muscular. Os genes *FN1*, *ITGA9*, *LAMB2* codificam respectivamente as proteínas: fibronectina, integrina e laminina. Estes estão envolvidos no processo de adesão célula-célula e célula-matriz, além da manutenção das junções neuromusculares (MAYER 2003; SANES; SCHACHENER; COVAULT, 1983). Outros estudos também indicam que integrina e laminina estão associadas ao desenvolvimento do músculo esquelético, em particular fibronectina em músculo adulto submetido a lesão (LEHTO; DUANCE; RESTALL, 1985; CARSON; WEI 2000). Por outro lado, outros genes (*ACTN1*, *ACTN4*, *RAC3*, *FLNA*, *PAK4* e *SERPINB9*) foram associados à mediação de ligação do filamento da actina e adesão celular (OTEY; CARPEN 2004), regulação da apoptose celular no envelhecimento (LARROSA et al., 2015) e reorganização do citoesqueleto muscular (ABO et al., 1998; DENG et al., 2012; NAKAYA et al., 1996).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes taxas de recuperação de peso de vacas adultas após um período de restrição alimentar propostas nesse trabalho parecem impactar diferentemente a força de cisalhamento e variáveis de cor. Enquanto uma lenta taxa de recuperação de peso (GL) mostrou uma redução na força de cisalhamento aos 21 dias de maturação em relação ao grupo base (GB), a rápida taxa de recuperação de peso (GR) mostrou valores estatisticamente iguais ao grupo GB, indicando uma maior resistência na redução da força de cisalhamento aos 21 dias. Por outro lado, diferentes valores de L^* , a^* e b^* para o grupo GR aos 73 dias, indicam a possibilidade de melhora no aspecto de cor do músculo e gordura.

O perfil de transcritos entre os grupos com diferentes taxas de recuperação de peso mostraram diferentes cenários de remodelação tecidual, tendo o grupo GL uma menor quantidade de genes e vias enriquecidas associadas a modificações no tecido conjuntivo, ao contrário do grupo GR, que mostrou uma maior gama de genes e vias metabólicas associadas a remodelação do tecido conjuntivo, sugerindo um processo de fibrose no músculo com possível impacto em força de cisalhamento observado no grupo GR.

REFERÊNCIAS

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira. São Paulo, 2014.

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira. São Paulo, 2017.

ABO, A.; QU, J.; CAMMARANO, M.S.; DAN, C.; FRITSCH, A.; BAUD, V.; BELISLE, B.; MINDEN, A. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 22, p. 6527-6540, 1998.

ABERLE, E. D.; REEVES, E. S.; JUDGE, M. D.; HUNSLEY, R. E.; PERRY, T. W. Palatability and muscle characteristics of cattle with controlled weight gain: time on a high energy diet. **Journal of animal science**, v. 52 n. 4, p. 757-763, 1981.

ALEXAKIS, C.; PARTRIDGE, T.; BOU-GHARIOS, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C661-C669, 2007.

ANDERS, S.; PYL, P.T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.

ASTRUC, T. Carcass composition, muscle structure, and contraction. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v- 1, p. 148-166, 2014b.

ASTRUC, T. Connective tissue: structure, function, and influence on meat quality. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v- 1, p. 321-328, 2014a.

BAILEY, A.J. The role of collagen in the development of muscle and its relationship to eating quality. **Journal of Animal Science**, v.60, n.6, p.1580-1587, 1985.

BAILEY, A.J.; LIGHT, N.D. **The connective tissue of meat and meat products**. London: Elsevier, 1989. 356 p.

BALDWIN VI, R. L.; LI, R. W.; LI, C.; THOMSON, J. M.; BEQUETTE, B. J. Characterization of the *longissimus lumborum* transcriptome response to adding propionate to the diet of growing Angus beef steers. **Physiological Genomics**, Bethesda, USA, v. 44, n. 10, p. 543-550, 2012.

BEACHLEY, V. Z.; WOLF, M. T.; SADTLER, K.; MANDA, S. S.; JACOBS, H.; BLATCHLEY, M.; BADER, J.S.; PANDEY, A.; PARDOLL, D.; ELISSEEFF, J. H. Tissue matrix arrays for high throughput screening and systems analysis of cell function. **Nature methods**, v. 12, n. 12, p. 1197, 2015.

- BEERMANN, D.H. Physiology. In: JENSEN, W.K; DEVINE, C.; DIKEMAN, M. **Encyclopedia of meat sciences**. Cambridge: Woodhead Publ., 2004. v. 2: Growth of meat animals, p. 511-518.
- BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; CUNFF, M.L.; DUBROEUCO, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J.F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 5229–5237, 2007.
- BLANCO, M.R.; ALONSO, C.R. Collagen types I and III in bovine muscles: influence of age and breed. **Journal of Muscle Foods**, v.21, p.417–423, 2010.
- BOCCARD, R. L., NAUDE, R. T., CRONJE, D. E., SMIT, M. C., VENTER, H. J., & ROSSOUW, E. J. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. **Meat Science**, v. 3, n. 4, p. 261-280, 1979.
- BOEHNING, D.; SNYDER, S. H. Novel neural modulators. **Annual review of neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 105-131, 2003.
- BOLEMAN, S.J.; MILLER, R.K.; BUYCK, M.J.; CROSS, H.R.; SAVELL, J.W. Influence of realimentation of mature cows on maturity, color, collagen solubility, and sensory characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 2187– 2194, 1996.
- BROWN, D. C.; VOGEL, K. G. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PGII) of bovine tendon with type I collagen. **Matrix**, v. 9, n. 6, p.468-478, 1989.
- BYRNE, K.A. WANG, Y.H.; LEHNERT, S.A.; HARPER, G.S.; MCWILLIAM, S.M.; BRUCE, H.L.; REVERTER, A. Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 1-12, 2005.
- CARSON, J. A.; WEI, L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 88, n. 1, p. 337-343, 2000.
- CASSAR-MALEK, I.; PASSELAIGUE, F.; BERNARD, C.; LÉGER, J.; HOCQUETTE, J. F. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 63, 2007.
- CESAR, A. S. M.; REGITANO, L. C. A.; POLETI, M. D.; ANDRADE, S. C. S.; TIZIOTO, P. C.; OLIVEIRA, S. N.; FELÍCIO, A. M.; NASCIMENTO, M. L.; CHAVES, A. S.; LANNA, D. P. D.; TULLIO, R. R.; NASSU, R. T.; KOLTES, J. E.; FRITZ- WATERS, E.; MOURÃO, G. B.; ZERLOTINI-NETO, A.; REECY, J. M.; COUTINHO, L. L. Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genomics**, London, GBR, v. 17, p. 961-976, 2016.

- CHAZAUD, B.; BRIGITTE, M.; YACOB-YOUSSEF, H.; ARNOLD, L.; GHERARDI, R.; SONNET, C., LAFUSTE, P.; CHRETIEN, F. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 37, n. 1, p. 18-22, 2009.
- CHO, S. H., KANG, G., SEONG, P., KANG, S., SUN, C., JANG, S., ... & HWANG, I. Meat quality traits as a function of cow maturity. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 5, p. 781-789, 2017.
- CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 8, p. 906-914, 2010.
- COLOMBATTI, A.; DOLIANA, R.; BOT, S.; CANTON, A.; MONGIAT, M.; MUNGIGUERRA, G.; PARON-CILLI, S.; SPESSOTTO, P. The EMILIN protein family. **Matrix Biology**, v. 19, n. 4, p. 289-301, 2000.
- COOKE, D.W.I.; MONAHAN, F.J.; BROPHY, P.O.; BOLAND, M.P. Comparison of concentrates or concentrates plus forages in a total mixed ration or discrete ingredient format: effects on beef production parameters and on beef composition, colour, texture and fatty acid profile. **Irish Journal of Agricultural and Food Research** 43: 201–216, 2004.
- CONBOY, I. M.; CONBOY, M. J.; SMYTHE, G. M.; RANDO, T. A. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1575-1577, 2003
- COROMINAS, J.; RAMAYO-CALDAS, Y.; PUIG-OLIVERAS, A.; ESTELLÉ, J.; CASTELLÓ, A.; ALVES, E.; PENA, R. N.; BALLESTER, M.; FOLCH, J. M. Analysis of porcine adipose tissue transcriptome reveals differences in de novo fatty acid synthesis in pigs with divergent muscle fatty acid composition. **BMC Genomics**, London, GRB, v. 14, p. 843-856, 2013.
- COSTA, P.; SIMÕES, J. A.; COSTA, A. S. H.; LEMOS, J. P. C.; NAVAS, D.; HOCQUETTE, J. F.; CALKINS, C. R.; BESSA, R. J. B. Repercussions of growth path on carcass characteristics, meat colour and shear force in Alentejana bulls. **Animal**, v. 9, n. 8, p. 1414-1422, 2015.
- COSTA, P.; SIMÕES, J. A.; ALVES, S. P.; LEMOS, J. P. C.; ALFAIA, C. M.; LOPES, P. A.; PRATES, J. A. N.; HOCQUETTE, J. F.; CALKINS, C. R.; VLECK, V.; BESSA, R. J. B. Beef palatability and its relationship with protein degradation and muscle fibre type profile in *longissimus thoracis* in Alentejana breed from divergent growth pathways. **Animal**, v. 11, n. 1, p. 175-182, 2017.
- CRAWFORD, A.W.; MICHELSEN, J.W.; BECKERLE, M.C. An interaction between zyxin and alpha-actinin. **The Journal of cell biology**, v. 116, n. 6, p. 1381-1393, 1992.
- CRUZEN, S. M.; PAULINO, P. V.; LONERGAN, S. M.; HUFF-LONERGAN, E. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. **Meat science**, v. 96, n. 2, p. 854-861, 2014.

DEL CAMPO, M.; BRITO, G.; DE LIMA, J. S.; MARTINS, D. V.; SANUDO, C.; SAN JULIÁN, R.; HERNÁNDEZ, P.; MONTOSI, F. Effects of feeding strategies including different proportion of pasture and concentrate, on carcass and meat quality traits in Uruguayan steers. **Meat science**, v. 80, n. 3, p. 753-760, 2008.

DELGADO, E.F.; AGUIARI, A.P.; ORTEGA, E.M.M.S.; SPOTO, M.H.F.; CASTILLO, C.J.C. Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 232- 239, 2006.

DENG, W.; LOPEZ-CAMACHO, C.; TANG, J. Y.; MENDOZA-VILLANUEVA, D.; MAYA-MENDOZA, A.; JACKSON, D. A.; SHORE, P. Cytoskeletal protein filamin A is a nucleolar protein that suppresses ribosomal RNA gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1524-1529, 2012.

DINIZ, W. J. S.; COUTINHO, L. L.; TIZIOTO, P. C.; CESAR, A. S. M.; GROMBONI, C. F.; NOGUEIRA, A. R. A.; OLIVEIRA, P. S. N.; SOUZA, M. M.; REGITANO, L. C. A. Iron content affects lipogenic gene expression in the muscle of Nelore beef cattle. **Plos One**, San Francisco, USA, v. 11, n. 8, p. 1-19, 2016.

EGGEN, K. H.; MALMSTRØM, A.; KOLSET, S. O. Decorin and a large dermatan sulfate proteoglycan in bovine striated muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1204, n. 2, p.287–297, 1994.

ESKO, J. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Current Opinion Cell Biology**, Bethesda, v. 3, p. 805-816, 1991.

FELÍCIO, P.E. DE. Fatores ante et post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. In: Peixoto, A.M.; Moura, J.C. de; FARIA, V.P. de (editores). **Produção do Novilho de Corte**. FEALQ-USP, Piracicaba SP, p.79-97, 1997.

FERNANDEZ, M. S.; DENNIS, J. E.; DRUSHEL, R. F.; CARRINO, D. A.; KIMATA, K.; YAMAGATA, M.; CAPLAN, A.I. The dynamics of compartmentalization of embryonic muscle by extracellular matrix molecules. **Developmental Biology**, v. 147, n. 1, p. 46-61, 1991.

FISHELL, V.K.; ABERLE, E.D.; JUDGE, M.D.; PERRY, T.W. Palatability and muscle properties of beef as influenced by pre-slaughter growth rate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 61, p. 151-157, 1985.

FRENCH, P.; O'RIORDAN, E. G.; MONAHAN, F. J.; CAFFREY, P. J.; VIDAL, M.; MOONEY, M. T.; TROY, D. J.; MOLONEY, A. P. Meat quality of steers finished on autumn grass, grass silage or concentrate-based diets. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 173-180, 2000.

GAITHER, K. A.; MADARAMPALLI, B.; LIU, D. X. MicroRNA mediated regulation of ATF5 contributes to homeostasis and benign to malignant transformation in breast cancer cells [abstract]. In: **Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting** 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2017;77 (13 Suppl): Abstract nr 476. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-476

GALIMOV, A.; MERRY, T. L.; LUCA, E.; RUSHING, E. J.; MIZBANI, A.; TURCEKOVA, K.; HARTUNG, A.; CROCE, C.M.; RISTOW, M.; KRÜTZFELDT, J. MicroRNA-29a in Adult Muscle Stem Cells Controls Skeletal Muscle Regeneration During Injury and Exercise Downstream of Fibroblast Growth Factor-2. **Stem Cells**, v. 34, n. 3, p. 768-780, 2016.

GALLAGHER, J. The extended family of proteoglycan; social residents of the pericellular zone. **Current Opinion in Cell Biology**. Bethesda, v. 1, p. 1201-1218, 1989.

GEESINK, G.H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 2685-2692, 1999.

HAUTALA, T.; BYERS, M. G.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; KIVIRIKKO, K. I.; MYLLYLÄ, R. Cloning of human lysyl hydroxylase: Complete cDNA-derived amino acid sequence and assignment of the gene (PLOD) to chromosome 1p36. 3→ p36. 2. **Genomics**, v. 13, n. 1, p. 62-69, 1992.

HENNINGSSEN, J.; RIGBOLT, K. T.; BLAGOEV, B.; PEDERSEN, B. K.; KRATCHMAROVA, I. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2482-2496, 2010.

HO, C.Y.; MARVIN, H.; STROMER, M.H.; GENE ROUSE, G.; RICHARD, M.; ROBSON, R.M. Effects of electrical stimulation and postmortem storage on changes in titin, nebulin, desmin, troponin-t, and muscle ultrastructure in Bos indicus crossbred cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 366–376, 1997.

HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; CLINQUART, A.; DIEZ, M.; ISTASSE, L. Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue bulls: I. animal performance, nitrogen balance, meat characteristics, and fat composition. **Journal of animal science**, v. 76, n. 1, p. 249-259, 1998.

HUANG, D.W.; SHERMAN, B.T.; TAN, Q.; KIR, J.; LIU, D.; BRYANT, D.; GUO, Y.; STEPHENS, R.; BASELER, M.W.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R. A. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W169-W175, 2007.

HUFF-LONERGAN, E., MITSUHASHI, T., BEEKMAN, D. D., PARRISH, F. C., OLSON, D. G., & ROBSON, R. M. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 5, p. 993-1008, 1996.

HUFF-LONERGAN, Elisabeth; PARRISH, F. C.; ROBSON, Richard M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine *longissimus* muscle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 1064-1073, 1995.

HWEE, D. T.; BODINE, S. C. Age-related deficit in load-induced skeletal muscle growth. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 6, p. 618-628, 2009.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

IBGE. (2015). Indicadores. Pesquisa da pecuária. Retrieved in October, 2017 from <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/>

IBGE. (2017). Indicadores. Pesquisa da pecuária. Retrieved in October, 2017 from <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/>

IMMONEN, K.; RUUSUNEN, M.; HISSA, K.; PUOLANNE, E. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science**, v. 55, n. 1, p. 25-31, 2000.

KEADY S.; WATERS S.; HAMILL R.; DUNNE P.; KEANE M.; RICHARDSON R.; KENNY D.; MOLONEY A. Compensatory growth in crossbred Aberdeen Angus and Belgian Blue steers: effects on the colour, shear force and sensory characteristics of *longissimus* muscle. **Meat science**, v. 125, p. 128-136, 2017.

KJELLEN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 60, p. 443-475, 1991.

KEOGH, K.; KENNY, D. A.; CORMICAN, P.; MCCABE, M. S.; KELLY, A. K.; WATERS, S. M. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of bovine skeletal muscle. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. e0149373, 2016A.

KEOGH, K.; KENNY, D. A.; CORMICAN, P.; KELLY, A. K.; WATERS, S. M. Effect of dietary restriction and subsequent re-alimentation on the transcriptional profile of hepatic tissue in cattle. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 244, 2016B.

KERTH, C. R.; BRADEN, K. W.; COX, R.; KERTH, L. K.; RANKINS, D. L. Carcass, sensory, fat color, and consumer acceptance characteristics of Angus-cross steers finished on ryegrass (*Lolium multiflorum*) forage or on a high-concentrate diet. **Meat Science**, v. 75, n. 2, p. 324-331, 2007.

KIM, D.; PERTEA, G.; TRAPNELL, C.; PIMENTEL, H.; KELLEY, R.; SALZBERG, S.L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome biology**, v. 14, n. 4, p. R36, 2013.

KIRBY, T. J.; LEE, J. D.; ENGLAND, J. H.; CHAILLOU, T.; ESSER, K. A.; MCCARTHY, J. J. Blunted hypertrophic response in aged skeletal muscle is associated with decreased ribosome biogenesis. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 4, p. 321-327, 2015.

KONCAREVIC, A.; JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S.C. The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 427-437, 2007.

KOOHMARAIE, M.; KENNICK, W. H., ELGASIM, E. A., & ANGLEMIER, A. F. Effects of Postmortem Storage on Muscle Protein Degradation: Analysis by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 292-293, 1984.

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: **Proceedings Reciprocal Meat Conference**, p. 63, 1992.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, v.36, p.93–104, 1994.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening tenderization processes of meat. **Meat Science**, Barking, v. 43, p. 193-201, 1996.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHACKELFORD, S.D.; VEISETH, E.; WHEELER, T.L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 345–352, 2002.

LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**. 10, R25, 2009.

LARROSA, P. F.; GRECCO, M. R.; GÓMEZ, D. M.; ALVARADO, C. V.; PANELO, L. C.; RUBIO, M. F.; ALONSO, D.F.; GÓMEZ, D.E.; COSTAS, M. A. RAC3 more than a nuclear receptor coactivator: a key inhibitor of senescence that is downregulated in aging. **Cell death & disease**, v. 6, n. 10, p. e1902, 2015.

LEE, S. H.; ENGLE, T. E.; HOSSNER, K. L. Effects of dietary copper on the expression of lipogenic genes and metabolic hormones in steers. **Journal of animal science**, v. 80, n. 7, p. 1999-2005, 2002.

LEE, S. H.; HOSSNER, K. L. Coordinate regulation of ovine adipose tissue gene expression by propionate. **Journal of animal science**, v. 80, n. 11, p. 2840-2849, 2002.

LEHNERT, S. A.; BYRNE, K. A.; REVERTER, A.; NATTRASS, G. S.; GREENWOOD, P. L.; WANG, Y. H.; HUDSON, N. J.; HARPER, G. S. Gene expression profiling of bovine skeletal muscle in response to and during recovery from chronic and severe undernutrition. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 12, p. 3239-3250, 2006.

LEHTO, M.; DUANCE, V. C.; RESTALL, D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. **Bone & Joint Journal**, v. 67, n. 5, p. 820-828, 1985.

LICHT, A. H.; NÜBEL, T.; FELDNER, A.; JURISCH-YAKSI, N.; MARCELLO, M.; DEMICHEVA, E.; HU, J.H.; HARTENSTEIN, B.; AUGUSTIN, H.G.; HECKER, M.; ANGEL, P.; KORFF, T.; KISTNER, M.S. Junb regulates arterial contraction capacity, cellular contractility, and motility via its target Myl9 in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 7, p. 2307, 2010.

LINDERT, U.; WEIS, M. A.; RAI, J.; SEELIGER, F.; HAUSSER, I.; LEEB, T.; EYRE, D.; ROHRBACH, M.; GIUNTA, C. Molecular consequences of the SERPINH1/HSP47 mutation in the dachshund natural model of osteogenesis imperfecta. **Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 29, p. 17679-17689, 2015.

LONERGAN, S.M.; HUFF-LONERGAN, E.; WIEGAND, B.R.; KRIESE-ANDERSON, L.A. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from Brangus cattle. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 12, p. 121-136, 2001.

MANCINI, R. A.; HUNT, M. Current research in meat color. **Meat science**, v. 71, n. 1, p. 100-121, 2005.

MATULIS, R. J.; MCKEITH, F. K.; FAULKNER, D. B.; BERGER, L. L.; GEORGE, P. Growth and carcass characteristics of cull cows after different times-on-feed. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 3, p. 669-674, 1987.

MAYER, U. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle?. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 14587-14590, 2003.

MCCORMICK, R.J. Collagen. In: MIN, D.; MCCORMICK, R.J. **Collagen applied muscle biology and meat science**. Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 7, p. 129-148.

MCLENNAN, I. S. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. **Journal of anatomy**, v. 188, n. 1, p. 17, 1996.

MENNECKE, B.E.; TOWNSEND, A.M.; HAYES, D.J.; LONERGAN, S.M. A study of the factors that influence consumer attitudes toward beef products using the conjoint market analysis tool. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 2639-2659, 2007.

MILLER, R. K.; TATUM, J. D.; CROSS, H. R.; BOWLING, R. A.; CLAYTON, R. P. Effects of Carcass Maturity on Collagen Solubility and Palatability of Beef from Grain-Finished Steers. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 2, p. 484-486, 1983.

MILLER, M. F.; CROSS, H. R.; CROUSE, J. D.; JENKINS, T. G. Effect of feed energy intake on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. **Meat Science**, v. 21, n. 4, p. 287-294, 1987.

MISSIO, R. L.; RESTLE, J.; MOLETTA, J. L.; KUSS, F.; NEIVA, J. N. M.; MOURA, I. C. Características da carcaça de vacas de descarte abatidas com diferentes pesos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 644, 2013.

MOJTO, J.; ZAUJEC, K.; GONDEKOVÁ, M. Effect of age at slaughter on quality of carcass and meat in cows. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 34-37, 2009.

MÖPERT, K.; LÖFFLER, K.; RÖDER, N.; KAUFMANN, J.; SANTEL, A. Depletion of protein kinase N3 (PKN3) impairs actin and adherens junctions dynamics and attenuates endothelial cell activation. **European journal of cell biology**, v. 91, n. 9, p. 694-705, 2012.

MORGAN, J. B.; SAVELL, J.W.; HALE, D. S.; MILLER, R.K.; GRIFFIN, D. B.; CROSS, H. R.; SHACKELFORD, S.D. National beef tenderness survey, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 3274-3283, 1991.

MULLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concursos de carcaça de novilhos**. 2. Ed. Santa Maria: UFSM, 1987, 31p.

NAKAYA, N.; NISHIBORI, M.; KAWABATA, M.; SAEKI, K. Cloning of a serine proteinase inhibitor from bovine brain: expression in the brain and characterization of its target proteinases. **Molecular brain research**, v. 42, n. 2, p. 293-300, 1996.

NATARAJAN, A.; LEMOS, D.R.; ROSSI, Fabio M.V. Fibro/adipogenic progenitors: a double-edged sword in skeletal muscle regeneration. **Cell Cycle**, Georgetown, v.9, p. 2045-2046, 2010.

NICHOLSON, M. J.; BUTTERWORTH, Martyn Holt. **A guide to condition scoring of zebu cattle**. ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1986.

NISHIMURA, T.; TANEICHI, A.; WAKAMATSU, J.; HATTORI, A. Effect of skeletal muscle decorin on collagen fibrillogenesis *in vitro*. **Animal Science Journal**, v.74, n. 5, p. 399–405, 2003.

NISHIMURA, T. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. **Animal science journal**, v. 81, n. 1, p. 21-27, 2010.

NRC. National research council. **Nutrient requirements of beef cattle**. (1996). Washington: National Academy Press.

O'CONNOR, R. S.; MILLS, S. T.; JONES, K. A.; HO, S. N.; PAVLATH, G. K. A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. **Journal of cell science**, v. 120, n. 1, p. 149-159, 2007.

O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 7, p. 1822-1830, 1997.

OSÓRIO, J.C.S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.292-300, 2009.

OTEY, C.A.; CARPEN, α -actinin revisited: A fresh look at an old player. **Cytoskeleton**, v. 58, n. 2, p. 104-111, 2004.

OUALI, A. Meat tenderization: possible cause and mechanisms; a review. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v. 1, p. 129-165, 1990.

OWENS, F.N.; BUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 3138-3150, 1993.

PINS, G. D.; CHRISTIANSEN, D. L.; PATEL, R.; SILVER, F. H. Selfassembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 4, p. 2164-2172, 1997.

PURSLOW, P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, v. 70, p. 435-447, 2005.

PURSLOW, P.P.; ARCHILE-CONTRERAS, A.C.; CHA, M.C. Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 950-959, 2012.

PURSLOW, P. P. New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 133-153, 2014.

REALINI, C. E.; DUCKETT, S. K.; BRITO, G. W.; DALLA RIZZA, M.; DE MATTOS, D. Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 567-577, 2004.

RENAND, G.; BERGE, P.; PICARD, B.; ROBELIN, J.; GEAY, Y.; KRAUSS, D.; MÉNISSIER, F. Genetic parameters of beef production and meat quality traits of young Charolais bulls progeny of divergently selected sires. In: **Proc 5th World Congress in Genetics Applied to Livestock Production**. v.19, Guelph Canada, p.446-449, 1994.

RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE Jr., C. C.; WEST, R.L.; COLEMAN, S. W. OLSON, T.A.; HAMMOND, A.C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, Barking, v. 70, p. 347-356, 2007.

ROUGHLEY, P. J.; LEE, E. R. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. **Microscopy Research and Technique**, v. 28, p. 385-397, 1994.

RUOSLAHTI, E. Proteoglycans in cell regulation. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 264, p. 13369-13372, 1989.

SAVELL, J.; SHACKELFORD, S.D. Significance of tenderness to the meat industry. In: **Proceedings Reciprocal Meat Conference**. 1992. p. 43-46.

SANES, J.R.; SCHACHNER, M.; COVAULT, J. Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. **The Journal of cell biology**, v. 102, n. 2, p. 420-431, 1986.

SERRANO, A.L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. **Experimental cell research**, v. 316, n. 18, p. 3050-3058, 2010.

SCHÖNFELDT, H. C.; STRYDOM, P. E. Effect of age and cut on tenderness of South African beef. **Meat science**, v. 87, n. 3, p. 206-218, 2011.

SENDER, E.; JOHNSON, G. D.; KRAWETZ, S. A. Local and global factor affecting RNA sequencing analysis. **Analytical Biochemistry**, New York, USA, v. 419, n. 2, p. 317-322, 2011.

SHORTHOSE, W. R.; HARRIS, P. V. Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 1, p. 1-8, 1990.

SILVA, J.J.; SILVA, J.A.L. D-amino acids in biology: more than one thinks. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 554-561, 2009.

SILVA-VIGNATO, B.; COUTINHO, L. L.; CESAR, A. S.; POLETI, M. D.; REGITANO, L. C.; & BALIEIRO, J. C. Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nellore cattle. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 506, 2017.

STADTMAN, EARL R. Protein oxidation and aging. **Free radical research**, v. 40, n. 12, p. 1250-1258, 2006.

TAMAGNONE, L.; ARTIGIANI, S.; CHEN, H.; HE, Z.; MING, G.; SONG, H.; CHEDOTAL, A.; WINBERG, M.L.; GOODMAN, C.S.; POO, M.; TESSIER-LAVIGNE, M.; COMOGLIO, P.M. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. **Cell**, v. 99, n. 1, p. 71-80, 1999.

TATSUMI, R.; ANDERSON, J.E.; NEVORET, C.J.; HALEVY, O.; ALLEN, R.E. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. **Developmental biology**, v. 194, n. 1, p. 114-128, 1998.

THERKILDSEN, M.; LARSEN, L. M.; BANG, H.G.; VESTERGAARD, M. Effect of growth rate on tenderness development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 253-264, 2002.

TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. R1173-R1187, 2010.

TORRESCANO, G.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A.; GIMÉNEZ, B.; RONCALÉS, P.; BELTRÁN, J. A. Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. **Meat Science**, v.64, p. 85-91, 2003.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v25: 1105–1111, 2009.

TUME, R. K.; YANG, A. Fat color in beef. **Meat Focus International**, p. 81, 1996.

UEZUMI, A.; ITO, T.; MORIKAWA, D.; SHIMIZU, N.; YONEDA, T.; SEGAWA, M.; YAMAGUCHI, M.; OGAWA, R.; MATEV, M.M.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; TSUJIKAWA, K.; TSUCHIDA, K.; UAMAMOTO, H.; FUKADA, S. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. **Journal Cell Science**, v. 124, n. 21, p. 3654-3664, 2011.

USDA (2016). United States Standards for Grades of Carcass Beef. Disponible em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/statsByCommodity>

VELLEMAN, S. The Role of the Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development. **Poultry Science**, v. 78, n. 5, p.778-784, 1999.

VELLEMAN, S. **Extracellular matrix and growth**. In Scanes, C.G., Biology of Growth of Domestic Animals, Blackwell Publishing, 2003, 408p.

VOGEL, K. G.; PAULSSON, M.; HEINEGARD, D. Specific inhibition of type I and II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. **Biochemical Journal**, v. 223, n.3, p.587-597, 1984.

VOGEL, K. G.; TROTTER, J. A. The effects of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. **Collagen and Related Research**, v.7, n. 2, p.105-114, 1987.

XIONG, Y. L., MULLINS, O. E., STIKA, J. F., CHEN, J., BLANCHARD, S. P., & MOODY, W. G. Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscles from mature cows of various ages. **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 105-113, 2007.

YOUNG, H. E.; CARRINO, D. A.; CAPLAN, A. I. Change in synthesis of sulfated glycoconjugates during muscle development, maturation, and aging in embryonic to senescent CBF-1 mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 53, n. 2, p.179-193, 1990.

WARNER, R. D.; Greenwood, P. L.; Pethick, D. W.; Ferguson, D. M. Genetic and environmental effects on meat quality. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 171-183, 2010.

WEBER, I. T.; HARRISON, R. W.; IOZZO, R. V. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 50, p. 31767-31770, 1996.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2716-2728, 1990.

WOOD, J.D.; RICHARDSON, R.I.; NUTE, G.R.; FISHER, A.V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, Barking, v. 66, p. 21-32, 2003.