UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIKAELE ALEXANDRE PEREIRA

**pH final e suas alterações na concentração de HSP27 e HSP70 e
no perfil proteômico do músculo esquelético de bovinos
cruzados**

Pirassununga

2018

MIKAELE ALEXANDRE PEREIRA

**pH final e suas alterações na concentração de HSP27 e HSP70 e
no perfil proteômico do músculo esquelético de bovinos
cruzados**

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de
Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade
e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Joanir Pereira
Eler

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P436p Pereira, Mikaele Alexandre
 pH final e suas alterações na concentração de
 HSP27 e HSP70 e no perfil proteômico do músculo
 esquelético de bovinos cruzados / Mikaele Alexandre
 Pereira ; orientador Joanir Pereira Eler. --
 Pirassununga, 2018.
 86 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
 Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
 de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. biomarcadores. 2. maciez da carne. 3.
 gliconeogênese. 4. Longissimus thoracis . 5.
 western blotting. I. Eler, Joanir Pereira, orient.
 II. Título.

MIKAELE ALEXANDRE PEREIRA

**pH final e suas alterações na concentração de HSP27 e HSP70 e
no perfil proteômico do músculo esquelético de bovinos cruzados**

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Joanir Pereira Eler – Presidente da Banca Examinadora

Professor Titular - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade
de São Paulo - Orientador

Carmen Josefina Contreras Castillo

Professora Associada - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da
Universidade de São Paulo

Cristiane Gonçalves Titto

Professora Doutora - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

Mário Luiz Chizzotti

Professor Adjunto - Universidade Federal de Viçosa

Mirele Daiana Poleti

Doutora - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Dedicatória

*Dedico este trabalho à Deus, à minha mãe Silvanice Alexandre Pereira,
assim como à Madalena Lima Menezes.*

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida e por me guiar durante essa caminhada.

À minha mãe, Silvanice Alexandre Pereira, por toda garra e amor em todas as fases da minha vida.

Aos meus avós (*in memorian*), José Alexandre Sobrinho e Jovelina Alexandre Pereira, por todo amor e proteção seja nesse ou em um outro plano espiritual.

À Madalena Lima Menezes pelo companheirismo e amor durante todos esses anos, sem o seu apoio nada seria possível.

Aos meus anjinhos (*in memorian*) Shelinho e Milinha, por me ensinarem o real significado do amor incondicional, perdão pela ausência durante a minha jornada acadêmica.

À minha Tininha por todo o amor dedicado e pelo apoio e incentivo que não requerem palavras para serem sentidos.

Ao meu orientador, professor Dr. Joanir Pereira Eler, pela confiança a mim depositada na condução deste trabalho.

À Leydiana Duarte Fonseca pela amizade e parceria construída ao longo dos nossos experimentos. Obrigada por toda a ajuda na execução das análises!

À Dr^a Alessandra Fernandes Rosa pelas orientações, confiança e parceria durante a execução desse trabalho.

As integrantes do LEACC: Dr^a Cristina Tschorny Moncau, Dr^a Mirele Daiana Poleti e Dr^a Bárbara Silva Vignato, por todos os ensinamentos, trocas de conhecimentos e pela parceria nas discussões sobre as análises.

Aos integrantes do GMAB da FZEA/USP: Yuri, Isa, Elisângela, Gerardo, Lenin e D. Vera, pelos momentos compartilhados.

Aos amigos da Zootecnia UFS turma de 2007, em especial a Roberta, Shara, Neto, Karen, Camila e Marise, que mesmo distantes sempre se mantiveram presentes. Obrigada pela amizade de uma vida!

Aos amigos Lúcio e Maíra pela presença constante em todos os momentos.

À Bárbara, Bruno, Zen, Simone e Júnior pelo acolhimento e construção de uma amizade.

Ao meu sempre orientador professor Dr. Anselmo Domingos Ferreira Santos pela amizade e por sempre acreditar em meu potencial. Obrigada por todos os ensinamentos, o mérito sempre será nosso!

Ao professor Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro pela oportunidade e incentivo ao meu ingresso no programa de pós-graduação.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas-SP, pela estrutura oferecida para a realização das análises de espectrometria de massas.

Ao Dr. Juliano Coelho da Silveira e Dr. Juliano Rodrigues Sangalli pela estrutura oferecida para a realização das análises de *western blotting*, e por todo o auxílio durante a condução dessas análises.

À todos os meus professores da graduação em Zootecnia na UFS, por serem a minha base profissional. Obrigada por todos os ensinamentos e por acreditarem em meu potencial!

Aos professores do programa de pós-graduação em Zootecnia da FZEA/USP pelos conhecimentos transmitidos e aos funcionários pelo suporte.

À Capes pela concessão da bolsa por um período da realização do doutorado.

À todos que de alguma forma tenham contribuído no desenvolvimento desse estudo.

Sou grata!!

Epígrafe

“...

*Se avexê não
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada
Se avexê não
A lagarta rasteja até o dia
Em que cria asas*

*Se avexê não
Que a burrinha da felicidade
Nunca se atrasa
Se avexê não
Amanhã ela para na porta
Da sua casa*

*Se avexê não
Toda caminhada começa
No primeiro passo
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá*

*Se avexê não
Observe quem vai subindo a ladeira
Seja princesa ou seja lavadeira
Para ir mais alto vai ter que suar*

...”

(Accioly Neto)

RESUMO

PEREIRA, M. A. **pH final e suas alterações na concentração de HSP27 e HSP70 e no perfil proteômico do músculo esquelético de bovinos cruzados**. 2018. 80f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Este estudo teve como objetivo investigar inicialmente o efeito do pH_f na qualidade da carne, nas concentrações de HSP27 e HSP70, bem como no perfil proteômico da carne (*Longissimus thoracis*) de bovinos cruzados - 1/2 (Simental Sul Africano x Nelore) de forma a contribuir para a predição de biomarcadores que poderão ser agregados em programas de melhoramento genético. Foram avaliados 415 bovinos (180 fêmeas e 235 machos imunocastrados) terminados em confinamento. As carcaças foram classificadas de acordo com pH_f, mensurados 48 horas após o abate, em dois grupos: normal (pH_f ≤ 5,80) e intermediário (pH_f = 5,81 – 6,19). Os parâmetros físico-químicos pH, cor (L*, a* e b*), perda de água por cocção (PAC, %) e força de cisalhamento (FC, kg), foram mensurados para avaliar a qualidade da carne em dois tempos de maturação (1 e 14 dias). Para a quantificação de HSP27 e HSP70 foram selecionadas 38 amostras em função dos grupos de pH_f, dentro de cada tempo de maturação, totalizando 76 amostras. Para a realização das análises proteômicas foram selecionadas três amostras de cada grupo de pH_f nos dois tempos de maturação, totalizando doze amostras. Observou-se interação (p<0,05) entre os grupos de pH_f e os tempos de maturação para a cor e FC. A concentração de HSP27 foi maior (p<0,05) em pH_f intermediário e com 1 de maturação, para a HSP70 só foi possível observar maior concentração (p<0,05) aos 14 dias de maturação, as correlações indicam que as HSPs modulam a qualidade da carne. Foram identificadas 13 proteínas diferencialmente expressas (p<0,05) envolvidas com funções metabólicas (triosefosfato isomerase - TPI1; fosfoglicerato mutase 2 - PGAM2; malato desidrogenase - MDH1; piruvato quinase - PKM2; e adenilato quinase isoenzima 1 - AK1), estrutural (troponina I tipo 2 - TTN12; tropomiosina cadeia beta - TPM2; troponina C tipo 2 - TNNC2; e cofilina 2 - CFL2) e defesa em resposta ao estresse (proteína deglicase DJ-1 - PARK7; αβ-cristalina - CRYAB; proteína do choque térmico 27 - HSPB1; e peroxirredoxina 1 - PRDX1). As correlações demonstraram que essas proteínas estão envolvidas na determinação do pH_f e dos demais atributos da qualidade da carne. A bioinformática permitiu observar que essas proteínas estão envolvidas nas três categorias de ontologia gênica, sendo 18 termos de componentes celulares, 1 termo de função molecular e 61 termos dos processos biológicos, foram identificadas também 6 vias metabólicas. A proteína MDH1, esteve associada a mecanismos de produção de energia, confirmando o potencial desta como um biomarcador para a determinação do pH_f assim como para a cor da carne, enquanto que a TPI1 foi relacionada somente no estabelecimento do pH_f. Outras proteínas como a PKM2, com função metabólica, e a PARK7, com função protetora, estiveram associadas aos atributos maciez e cor da carne, respectivamente. Os resultados obtidos são de grande relevância no âmbito das ciências da carne e do melhoramento genético animal, por permitir a identificação de possíveis biomarcadores que poderão ser utilizados na seleção animal.

Palavras-chave: biomarcadores, gliconeogênese, *Longissimus thoracis*, maciez da carne, *western blotting*

ABSTRACT

PEREIRA, M. A. **Ultimate pH and its alterations in HSP27 and HSP70 concentrations and crossbred cattle skeletal muscle proteomic profile.** 2018. 80p. Thesis (PhD) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2018.

The objective of this study was to investigate the effect of pH_f on meat quality, on the concentrations of HSP27 and HSP70, as well as on the proteomic profile in beef (*Longissimus thoracis*) of crossbred cattle - 1/2 (South African Simmental x Nellore) – in order to explore the contribute to the prediction of biomarkers that can be added to the process of animal selection in breeding programs. Were evaluated 415 cattle (180 females and 235 immunocastrated males) feedlot-finished. Carcasses were classified according to pH_u, measured 48 hours after slaughter, in two groups: normal (pH_u ≤ 5.80) and intermediate (pH_u = 5.81 – 6.19). The physical-chemical parameters pH, color values (L *, a * and b *), cooking loss (CL,%) and shear force (SF, kg) were measured to evaluate the meat quality in two aging times (1 and 14 days). For quantification of HSP27 and HSP70, 38 samples were selected according to the pH_u groups, and aging time, totaling 76 samples. To perform the proteomic analysis were selected three samples from each group and aging time, totaling twelve samples. Color and SF meat quality attributes showed interaction (p<0.05) between pH_u groups and aging times. The concentration of HSP27 was higher (p<0.05) at intermediate pH_u and at 1 day of aging. It was only possible to observe a higher concentration (p<0.05) for HSP70 at 14 days of aging. Correlations analysis indicate that HSPs modulate the quality of meat. Thirteen differentially expressed proteins (p<0.05) were identified as involved with metabolic (triosephosphate isomerase - TPI, phosphoglycerate mutase 2 - PGAM2; malate dehydrogenase, cytoplasmic - MDH1; pyruvate kinase - PKM2; and adenylate kinase isoenzyme 1- AK1), structural (troponin I type 2 - TTN12; tropomyosin beta chain - TPM2; troponin C type 2 - TNNC2; and cofilin 2 - CFL2) and defense in response to stress functions (protein deglycase DJ-1- PARK7; αβ-cristallin - CRYAB; heat shock protein 27 - HSPB1; and peroxiredoxin 1 - PRDX1). Correlations analysis showed that these proteins are involved in the determination of pH_u and other attributes of meat quality. Using bioinformatics it was possible to observe that these proteins are involved in three gene ontology categories, which were 18 cellular components terms, 1 molecular function term and 61 biological processes terms. Other six metabolic pathways have also been identified. The MDH1 protein was associated with energy production mechanisms, confirming its potential as a biomarker for the determination of pH_u as well as meat color, while TPI was related to the establishment of pH_u only. Other proteins such as PKM2, with metabolic function, and PARK7, with protective function, were associated with the attributes of meat tenderness and color, respectively. The obtained results are of great relevance in the field of meat science and animal breeding genetic, it allows the identification of biomarkers that can be used in animal selection.

Keywords: biomarkers, gluconeogenesis, *Longissimus thoracis*, meat tenderness, western blotting

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Níveis de expressão das proteínas triosefosfato isomerase (TPI) e pequena proteína do choque térmico 27 (HSPB1) no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f, normal e intermediário, e tempos de maturação 1 e 14 dias, com base em análise western blotting.....55
- Figura 2** - Distribuição dos componentes celulares significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no musculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.57
- Figura 3** - Processos biológicos significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no musculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.....58
- Figura 4** – Via metabólica do carbono (bta01200).....61
- Figura 5** - Rede de interação das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no musculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo String v10.5.62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição dos grupos segmentados de acordo com os valores de pH_f mensurado no músculo *Longissimus thoracis* após 48 horas *post mortem* de animais F1 oriundos do cruzamento Simental Sul Africano x Nelore em frigorífico comercial.38
- Tabela 2** - Estatística descritiva e P-valor para validação da segregação dos grupos de pH_f para as análises físico-químicas e das HSPs.38
- Tabela 3** - Estatística descritiva e P-valor para validação da segmentação dos grupos de pH_f para as análises proteômicas.39
- Tabela 4** – Estatística descritiva dos atributos físico-químicos: cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.40
- Tabela 5** - Análise de variância dos atributos físico-químicos: cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC) e perda de água por cocção (PAC) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f e tempos de maturação.40
- Tabela 6** - Desdobramento dos atributos físico-químicos cor (L*, a* e b*) e força de cisalhamento (FC) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com efeito de interação (G*T) significativa entre os fatores grupo de pH_f (G) e tempo de maturação (M).41
- Tabela 7** - Análise de variância da concentração das Proteínas do Choque Térmico HSP 27 e 70 no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f e tempos maturação.....44
- Tabela 8** – Coeficientes de correlação de pearson (r) entre as concentrações das HSPs 27 e 70 e as variáveis físico-químicas: cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) nos tempos 1 e 14 dias de maturação no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f.....46
- Tabela 9** - Proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, nos dois tempos de maturação (1 e 14 dias).48
- Tabela 10** - Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as proteínas diferencialmente expressas, em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, e as variáveis físico-químicas: pH_f, cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore53
- Tabela 11** - Componentes celulares significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal,

no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.....56

Tabela 12 – Dez processos biológicos significativos ($FDR < 0,05$) com menores valores de FDR das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.59

Tabela 13 – Vias metabólicas significativas ($FDR < 0,05$) enriquecida funcionalmente pelo String v.10.5, das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.....60

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Proteínas totais identificadas por análise GeLC-MC/MC em função da relação entre o pH_f intermediário e pH_f normal durante a maturação, no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.76

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo String v10.5.80

Apêndice C – Processos biológicos significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.85

Apêndice D – Rede de interação proteínas totais identificadas por análise GeLC-MC/MC em relação ao pH final no músculo Longissimus thoracis de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo String v10.5...86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Influência do pH final na qualidade da carne	17
2.2. Proteínas do choque térmico	21
2.3. Proteômica.....	22
2.4. Proteômica aplicada à qualidade da carne	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Geral	27
3.2. Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Local	28
4.2. Animais	28
4.3. Amostras.....	29
4.4. Análises Físico-químicas	30
4.4.1. pH e Temperatura	30
4.4.2. Cor	30
4.4.3. Perda de água por cocção (PAC)	30
4.4.4. Força de cisalhamento (maciez)	31
4.5. Análise das HSPs	31
4.5.1. Extração de proteínas sarcoplasmáticas.....	31
4.5.2. Determinação das concentrações	32
4.6. Análises Proteômicas	32
4.6.1. Extração de proteínas total	32
4.6.2. Separação de proteínas	33
4.6.3. Digestão <i>in gel</i> das proteínas.....	33
4.6.4. Análises de LC-MS/MS	34

4.6.5. <i>Análises de western-blotting</i>	35
4.7. Análise dos Resultados	36
4.7.1. Físico-químicos e análises das HSPs	36
4.7.2. Bioinformática	36
4.7.3. Correlação entre os resultados	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Análises Físico-químicas	40
5.2. Análises das HSPs	44
5.3. Análise Proteômica	47
5.3.1. <i>GeLC-MS/MS</i>	47
5.3.2. Western blotting	54
5.3.3. Enriquecimento Funcional.....	55
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
8. APÊNDICES.....	76

1. INTRODUÇÃO

Com um rebanho bovino de mais de 220 milhões de cabeças, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne bovina com aproximadamente 9,5 milhões de toneladas de equivalente-carcaça, ficando atrás apenas dos Estados Unidos em volume produzido, e é o segundo maior exportador de carne, com um volume de exportação de 1,76 milhões de toneladas de equivalente-carcaça (USDA, 2017). No ano de 2015, a cadeia produtiva da pecuária brasileira movimentou cerca de R\$ 483,5 bilhões (ABIEC, 2016), desempenhando um papel fundamental na composição do Produto Interno Bruto (PIB) do país. O agronegócio representou 21% do PIB nacional, sendo que 30% desse valor deve-se ao PIB da pecuária (ABIEC, 2016).

Apesar desta posição de destaque no cenário econômico, a pecuária de corte nacional se caracteriza por apresentar baixa produtividade e uma grande variação na qualidade da carne produzida, fatos que podem comprometer a competitividade deste setor no mercado globalizado e cada vez mais exigente. A área nacional destinada a produção de gado de corte é de 167,49 milhões de hectares e apenas 13% dos abates de bovinos são provenientes da terminação em confinamento (ABIEC, 2016). Estima-se que mais de três quartos do rebanho bovino de corte no Brasil seja composto por animais Zebuínos (*Bos taurus indicus*), sendo a raça Nelore a principal, e seus cruzamentos com Taurinos (*Bos taurus taurus*) (RODRIGUES et al., 2017).

A utilização do cruzamento, que é o acasalamento entre animais de grupamentos genéticos diferentes, é uma das ferramentas adotadas pelos pecuaristas brasileiros com objetivo de melhorar os índices de produtividade zootécnica e a qualidade da carne, já que carnes de bovinos de origem Zebuína geralmente possuem uma qualidade inferior quando comparada a de origem Taurina, principalmente no que se refere a maciez (LAGE et al., 2012; PEREIRA et al., 2015), aliando essas características à rusticidade e melhor adaptação às condições climáticas que os Zebuínos apresentam.

Diante do cenário atual, a pesquisa tem como desafio a busca pela evidente necessidade de elevar-se a produtividade e a qualidade no setor da pecuária de corte com o objetivo de manter a competitividade comercial. As oportunidades de expansão do mercado de carne bovina estão diretamente associadas à capacidade competitiva do setor produtivo e, nesse aspecto, a qualidade é ponto fundamental (ALVES, GOES e MANCIO, 2005).

Dentre os atributos da qualidade da carne, o pH final (pH_f) tem sido amplamente discutido na recente literatura, devido ao seu potencial em prever os demais atributos e os níveis de reserva de energia no músculo, exercendo influência direta sobre a proteólise da carne e os mecanismos bioquímicos que ocorrem no músculo durante o *rigor mortis*. As proteínas do choque térmico (HSPs – *heat shock protein*) estão sendo discutidas na literatura recente como reguladoras da atividade proteolítica, sendo que a concentração e degradação destas é diretamente influenciada pelo pH_f.

Características de qualidade de carne estão intimamente relacionadas com aspectos biológicos do animal vivo, incluindo, portanto, genética, fisiologia, biologia celular e bioquímica, as quais têm sido amplamente utilizadas para caracterizar os mecanismos que atuam por trás da grande variabilidade das características de qualidade de carne (BENDIXEN, 2005). Nesse sentido, a utilização de ferramentas ômicas como a proteômica, que é o estudo do proteoma de um determinado tecido, célula ou organismo (CRAVATT; SIMON; YATES, 2007; GINGRAS et al., 2007; ONG; MANN, 2005; WITZE et al., 2007), contribuem para um melhor entendimento dos processos biológicos e bioquímicos que atuam sobre as características da qualidade da carne.

Assim, a realização do presente trabalho teve como objetivo investigar inicialmente o efeito do pH_f na qualidade da carne, nas concentrações de HSP27 e HSP70, bem como no perfil proteômico do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, de forma a contribuir para a predição de biomarcadores que poderão ser agregados em programas de melhoramento genético.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Influência do pH final na qualidade da carne

A percepção do consumidor quanto à qualidade da carne é uma questão crítica para a indústria de carne bovina porque impacta diretamente na rentabilidade do setor (TROY; KERRY, 2010). O pH_f é um preditor da qualidade da carne, seu valor e sua taxa de queda são influenciados por eventos bioquímicos que ocorrem nos componentes estruturais, células musculares associadas ao tecido conjuntivo, antes e após o abate. Em particular, a velocidade e extensão da queda do pH têm influência direta sobre a desnaturação das proteínas, no arranjo das proteínas miofibrilares e no encolhimento das células musculares, sendo, portanto, fundamental na determinação da qualidade da carne (HUGHES et al., 2014).

Após o abate, o fornecimento de oxigênio é interrompido e o músculo entra em metabolismo anaeróbico, na tentativa de manter a homeostase celular e os níveis de ATP, consumindo glicogênio e acumulando ácido láctico. Cada vez que uma molécula de ATP é hidrolisada, são liberados um íon de hidrogênio (H⁺), ADP e fosfato inorgânico (Pi): $ATP + H_2O \rightarrow ADP + H^+ + Pi$, pela atividade da enzima ATPase (ENGLAND et al., 2014), a qual controla a taxa de declínio do pH *post mortem* (BOWKER et al., 2004; ENGLAND et al., 2015). Como resultado, os prótons que são produzidos através da hidrólise da ATP e o acúmulo de lactato durante a glicólise causam diminuição significativa do pH intracelular.

A não ocorrência de uma acidificação satisfatória resulta em carnes DFD (*Dark, Firm and Dry* – escura, firme e seca), sendo proveniente da diminuição da concentração de lactato e de íons de H⁺ no músculo em consequência das perdas de reservas de glicogênio antes do abate. Os principais fatores que podem influenciar nas reservas de glicogênio antes do abate são o sexo, o estado nutricional dos animais, fatores genéticos, tipo de manejo antes do embarque e condição térmica do ambiente (PAREDI et al, 2012).

Devido as especificidades que a produção brasileira de bovinos de corte possui, onde 80% do rebanho bovino de corte é formado pela raça Nelore ou cruzados (CARVALHO et al., 2014), aproximadamente 50% dos bovinos abatidos são inteiros (ROSA et al., 2017) associada ao fato de 87% do total de bovinos abatidos serem criados e terminados a pasto (ABIEC, 2016), tem-se observado uma alta incidência

de carnes DFD o que acarreta em prejuízos financeiros para a indústria nacional da carne.

Segundo Franco et al. (2015) em carnes DFD ocorre redução na desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, este tipo de carne possui grandes variações na textura, elevada capacidade de retenção de água (PURCHAS; AUNGSUPAKORN, 1993) e diminuição do tempo de vida na prateleira pelo alto potencial de deterioração por microrganismos (NEWTON; GILL, 1981) quando comparada à carne normal. A incidência de carne DFD é comum em diversos países, podendo chegar a 10%, ocasionando grandes perdas econômicas no cenário mundial da carne (ADZITEY; NURUL, 2011; MOORE et al., 2012). Recentemente foi relatado pelo nosso grupo a presença de 40% de carne DFD em amostras de carne de animais Nelore, inteiros e terminados a pasto (ROSA et al., 2017).

Até poucos anos atrás, o pH_r era classificado em duas classes: normal (≤ 5.99) e alto (>6.0) (YOUNG et al., 2004). Mais recente, pesquisadores (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; LOMIWES et al., 2013, 2014a) reportaram diferenças na qualidade da carne, principalmente relacionadas à maciez, em faixas de pH intermediário, propondo uma nova classificação para o pH_r: normal (≤ 5.80), intermediário (5,81 - 6,19) e alto (≥ 6.20), sendo que o valor de pH 5,8 tem sido considerado como limite entre a carne normal e a DFD. Por outro lado, alguns outros pesquisadores utilizam valores de 6,2 a 6,3 (ALVES; GOES; MANCIO, 2005) como divisória entre a carne normal e a DFD.

A glicólise *post mortem* diminui o pH da carne, tornando-a mais brilhante e úmida superficialmente (SWATLAND; IRVING; MILLMAN, 1989). Se o pH_r da carne for elevado, as proteínas associam-se com a água contida no músculo, deixando as fibras com uma maior intensidade de ligação. Esta carne é chamada DFD e é escura porque a sua superfície não dispersa a luz da mesma forma que a carne normal (SEIDMAN et al., 1984).

A cor da carne é o primeiro critério utilizado pelo consumidor no momento da compra (MANCINI; HUNT, 2005; MUCHENJE et al. 2009), uma vez que é uma característica de fácil percepção nesse momento (ANDRÉS et al., 2008). De acordo com Hughes et al. (2014) quando a luz entra em contato com a superfície da carne, ela pode ser refletida, absorvida ou espalhada, e é a combinação destes três atributos que determinam a cor da carne. A luz que é refletida de volta para o olho é de

importância fundamental, pois é esta que determina a percepção do consumidor e, portanto, a aceitabilidade.

Fisiologicamente, a coloração indica a concentração de mioglobina (Mb), proteína hidrossolúvel que desempenha a função de transporte e armazenamento de oxigênio, que pode ser encontrada nas formas reduzida (mioglobina reduzida – Mb, vermelho purpura), oxigenada (oximioglobina – MbO₂, vermelho brilhante), ou oxidada (metamioglobina – MetMb, marrom) na superfície do músculo (ABRIL et al., 2001; MANCINI; HUNT, 2005). A mioglobina é formada por uma porção proteica, denominada globina, e uma porção não proteica, denominada anel ou grupo heme. O teor do pigmento Mb no músculo é proveniente de fatores intrínsecos e varia de acordo a espécie, idade do animal ou sistema de alimentação. Outros fatores extrínsecos também afetam a cor, tais como condições pré-abate, abate e os processos de oxigenação e oxidação durante a maturação. Estes atuam diretamente sobre a mioglobina ou indiretamente alterando a coloração de acordo com a taxa de declínio do pH (HONIKEL, 1997; RENERRE; LABAS, 1987).

A maciez da carne tornou-se uma das áreas mais extensivamente pesquisadas em ciência da carne (YANCEY et al., 2010), sendo essa constantemente avaliada pelos consumidores e tida como o componente mais importante da qualidade (MILLER et al., 1995; OUALI et al., 2006). As variações encontradas na maciez da carne é um dos principais problemas da cadeia da qualidade identificado pela indústria da carne no Brasil e pelos produtores (LAGE; OLIVEIRA; PAULINO, 2009). Inúmeras pesquisas relatam que o pH exerce influência sobre as enzimas endógenas responsáveis pela maciez durante o processo de maturação. As principais enzimas presentes nesse processo são as calpaínas e as catepsinas, capazes de hidrolisar as proteínas miofibrilares (ANDRIGHETTO et al., 2006).

Segundo Oliveira (2000) o principal sistema relacionado a maciez é o complexo das calpaínas, que são tiolproteases (contém cistina) produzidas pelos músculos como proenzimas ativadas pelo íon cálcio (Ca⁺²), sendo um sistema totalmente dependente de cálcio para ser ativado. O complexo é composto por: calpaína tipo I ou μ -calpaína (enzima que requer baixos níveis ou micromoles, μ M, de cálcio), ativada quando o pH decai de 6,8 para aproximadamente 5,7; calpaína tipo II ou m-calpaína (enzima que requer níveis mais elevados ou milimoles, mM, de cálcio), ativada quando o pH está em torno de 5,7 e responsável pela continuidade do processo de amaciamento, estando ativa em torno das 16 horas *post mortem* e assim

permanecendo por longos períodos; e a calpastatina, que tem como principal função inativar as calpaínas, diminuindo a degradação das proteínas miofibrilares durante o processo de maturação, reduzindo assim a maciez (VOLPELLI et al., 2005).

As catepsinas são enzimas que se localizam na fração lisossômica da célula, também importantes no processo de maturação. São proteínas intracelulares dos tecidos animais, ativas em meio ácido (ANDRIGHETTO et al., 2006). São descritas cinco catepsinas, designadas com as letras A, B, C, D e E. As catepsinas B e D degradam a actina e miosina nativas e as catepsinas B e E degradam o colágeno, porém, sua atividade em pH 5,5 é baixa (ROÇA, 2000).

As catepsinas não degradam somente proteínas miofibrilares como também exercem ação sobre as proteínas do tecido conjuntivo (colágeno), o que pode indicar um sinergismo entre os dois sistemas (MALTIN et al., 2003). A atividade proteolítica do complexo enzimático calpaína e catepsinas está relacionada com o valor do pH_f, a atividade da μ calpaína reduz com o concomitante aumento da atividade das catepsinas B à medida que ocorre o decréscimo do pH_f (PULFORD et al., 2009).

Lomiwes et al (2013) descrevem que em pH_f alto, a força de cisalhamento foi menor durante todo o período *post mortem* (1, 2, 7, 14 e 28 dias). No entanto, para pH_f normal só foram encontrados valores aceitáveis de força de cisalhamento após 14 dias *post mortem*, sendo que os maiores valores de força de cisalhamento foram observados quando as carnes apresentavam pH_f intermediário em todos os tempos *post mortem*. Lomiwes et al. (2014a) relatam que em pH_f alto ocorre uma rápida e precoce degradação predominante das proteínas estruturais, como a titina, nebulina e filamina, enquanto que em pH_f normal essas proteínas são degradadas mais tardiamente e lentamente. Essas proteínas estruturais constituem aproximadamente 10% do total de proteínas miofibrilares e sua degradação exerce influência direta sobre o processo de maciez da carne.

Wu et al. (2014) corroborando com os estudos anteriores, relataram uma menor força de cisalhamento em carnes com pH_f alto e normal, enquanto que em pH_f intermediário as carnes foram mais duras. Esse resultado é notório ao papel crítico que o pH_f desempenha na degradação de proteínas miofibrilares durante o *post mortem*, e consequentemente na presença de variações da maciez da carne, tendo sido o pH_f alto associado a uma rápida e maior taxa de degradação de proteínas estruturais como a titina, nebulina e filamina, o pH_f normal associado a lenta mas

eficiente degradação dessas proteínas estruturais, enquanto que no pH_i intermediário a taxa de degradação foi mínima.

2.2. Proteínas do choque térmico

Existe um consenso da ação enzimática sobre o processo de amaciamento da carne, envolvendo os sistemas proteolíticos (OUALI et al., 2013). No entanto outras proteínas estão sendo estudadas por terem sido relatadas como tendo participação direta no processo de amaciamento da carne e por sua atividade ser influenciada pelo pH_i. As proteínas do choque térmico ou HSPs (*Heat Shock Proteins*) são proteínas associadas à defesa dos tecidos. Após o abate, células musculares são levadas inevitavelmente à apoptose devido à perda de nutrientes e ao fornecimento de oxigênio para o músculo (OUALI et al., 2006). Em consequência, as HSP são recrutadas para impedir a apoptose e atuar na degradação das proteínas musculares, com objetivo de manter a homeostase celular.

De acordo com Lomiwes et al. (2014b) as HSP pertencem a um grupo de proteína chaperonas e podem ser classificadas em cinco classes de acordo com seu tamanho molecular monomérico. Quatro destas classes possuem massas moleculares de aproximadamente 60 kDa, 70 kDa, 90 kDa e 100 kDa, e são denominadas HSP60, HSP70, HSP90 E HSP100, respectivamente. As pequenas proteínas do choque térmico (Small Heat Shock Proteins – sHSPs) são a quinta classe, com peso molecular variando entre 12 e 43 kDa, possuem um papel protetor na célula, e sua expressão é particularmente identificada em células que são expostas a condições adversas como a hipertermia, hipóxia e oxidantes nocivos (LOMIWES et al., 2013). Existem relatos de que as sHSPs também estejam envolvidas na recuperação da proteína e manutenção da sobrevivência celular (SOTI; SREEDHAR; CSERMELY, 2003).

É consenso de que a actina é um componente importante dos microfilamentos do citoesqueleto das células musculares, sendo essencial para a manutenção e integridade da estrutura muscular. Lomiwes et al. (2014b) explicam que a fosforilação das sHSPs exercem influência sobre a regulação dinâmica dos microfilamentos, pois possuem a capacidade de inibir a polimerização da actina no tecido muscular regulando assim a formação de filamentos. Brophy; Lamb; Graham (1999) e Rembold et al. (2000) propuseram que as sHSPs interagem diretamente com os filamentos de

actina, interrompendo assim a formação do complexo de actino-miosina, induzindo o relaxamento do músculo liso, mas no momento em que as sHSPs são fosforiladas essas perdem seu sítio de ligação ativo e consequentemente não conseguem mais ligarem-se aos monômeros de actina, assim ocorre a formação dos filamentos de actina e do complexo actino-miosina, induzindo a musculo ao estado de contração. Embora as funções que as sHSPs desempenham antes da morte celular já tenham sido elucidadas, ainda não existe uma total identificação da sua participação no processo de amaciamento da carne.

A influência que as HSPs exercem sobre o desenvolvimento da maciez da carne está sendo amplamente discutida na literatura. Balan; Kim; Blijenburg (2014) discorreram sobre a presença de uma maior quantidade de sHSPs intactas em pH_f intermediário, quando comparadas com o pH_f baixo no tempo de 1 dia *post mortem*. Os autores ainda relataram que existe uma alta correlação ($r = 0,94$) entre a presença das sHSPs 20 e 27 intactas com a presença de proteínas miofibrilares intactas. Lomiwes et al. (2013) e Pulford et al. (2009) sugeriram que a atividade proteolítica da μ -calpaína pode ser influenciada pelo valor do pH_f da carne através da regulação inibitória que as HSPs promovem.

Pulford et al. (2008) relataram que as proteínas HSP foram precipitadas a partir da fase solúvel do músculo à medida que o pH diminuiu até a faixa de pH_f normal, enquanto que em pH_f intermediário houve uma redução na perda de HSPs por precipitação. Corroborando com essas informações, Lomiwes et al. (2013) observaram que existe um comportamento linear entre a concentração das HSPs e o pH_f, entretanto à presença de degradação das HSPs em pH_f alto e normal, mas em pH_f intermediário não foram encontrados vestígios de degradação das HSPs em amostras de carne bovina.

2.3. Proteômica

Proteínas são moléculas que desempenham as mais distintas funções, capazes de modular a expressão de genes, catalisar reações metabólicas, e compor a parte estrutural da célula. Proteoma, inicialmente utilizado para descrever o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma (WILKINS et al., 1996), designa o conjunto de proteínas que estão sendo expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento (EMIDIO et al., 2015). O estudo do proteoma, denominado

proteômica, compreende atualmente não só o nível de expressão e função das proteínas, mas também o conjunto de todas as modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e seus mecanismos regulatórios (TYERS; MANN, 2003).

Segundo Picard et al. (2010) a proteômica pode gerar grandes conjuntos de dados que podem ser analisados com ferramentas bioinformáticas de alto rendimento, permitindo a identificação de interações de moléculas e análises de vias moleculares, além de possibilitar a identificação de biomarcadores. Nas últimas duas décadas, a proteômica tornou-se uma ferramenta de pesquisa fundamental no âmbito acadêmico, através da sua utilização na caracterização de proteínas e descoberta de biomarcadores (RONCADA et al., 2012). Do ponto de vista zootécnico, a proteômica torna-se uma poderosa ferramenta do melhoramento genético, devido a essa possibilidade de identificação de biomarcadores que poderão ser utilizados em programas de seleção de animais.

Resultados proteômicos podem ser obtidos através de um fluxo experimental, normalmente utilizado, que compreende a extração de proteínas, quantificação, digestão da proteína por enzima, separação através de técnicas como eletroforese e cromatografia, e por último, na sua identificação por espectrometria de massas e bioinformática (ALMEIDA et al., 2015; HEIN et al., 2013; SALVATO; CARVALHO, 2010).

O extrato de proteínas é uma mistura complexa que permite a identificação de proteínas, de uma maneira geral, por meio de duas abordagens: a *bottom-up* e a *top-down*. Na abordagem *top-down* a mistura complexa, ou seja, as proteínas intactas são submetidas à análise de espectrometria de massas, e fornecem uma determinação de alta precisão sobre a estrutura primária da proteína, sobre as modificações pós-traducionais ocorridas, e informações sobre polimorfismos de aminoácidos únicos (GEMPERLINE; KELLER; LI, 2016; ZHANG et al., 2013;). No entanto o método *top-down* possui algumas limitações metodológicas, entre elas a mais importante é a dificuldade de separação de proteínas quando estas estão intactas (GEMPERLINE; KELLER; LI, 2016) o que requer equipamentos de alta performance para que essa limitação seja contornada, tornando essa técnica menos atrativa devido ao elevado custo de implementação (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010; CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014).

A abordagem *bottom-up*, têm sido a mais amplamente difundida dentro do fluxo de trabalho proteômico, na qual as proteínas contidas em uma mistura complexa são

digeridas química ou enzimaticamente, e os peptídeos resultantes são analisados por espectrometria de massa (AEBERSOLD; MANN, 2016). Esse tipo de abordagem permite inferir sobre a identificação da proteína através da comparação dos espectros de massa gerados com uma base de dados de proteínas e pela atribuição de sequências peptídicas das proteínas, uma vez que os peptídeos podem ser unicamente atribuídos a uma única proteína ou compartilhados por mais de uma proteína. As proteínas identificadas podem ser adicionalmente marcadas e agrupadas com base nos seus peptídeos (ZHANG et al., 2013).

O resultado da ionização do composto por espectrometria de massas é em uma mistura de íons que são separados de acordo com suas relações massa e carga (m/z) e em seguida isolados e submetidos à fragmentação, tornando-se possível a determinação de cada proteína ou peptídeo intacto, denominado de espectro MS/MS (BENDIXEN, 2005). A partir desse ponto a proteômica é dependente de uma outra ferramenta, a bioinformática.

A bioinformática pode ser definida como uma ferramenta que aplica técnicas computacionais, matemáticas e estatísticas para a análise de dados biológicos, gerando e gerenciando a bioinformação (LUSCOMBE; GREENBAUM; GERSTEIN, 2001). Dentro da proteômica essa ferramenta pode ser utilizada desde a identificação das proteínas, realizada pelo contraste dos espectros obtidos com o espectro de todas as proteínas existentes contra um banco de sequências de peptídeos através de um *software* (WU et al., 2003) na análise estatística para verificação de possíveis diferenças de expressão entre os grupos de interesse, no enriquecimento funcional com a finalidade de descrever a função molecular, o processo biológico, a localização celular de atuação das proteínas e a vias metabólicas nas quais essas estão envolvidas (CAMON et al., 2004). Assim, a associação entre as ferramentas proteômicas e bioinformática permite a descoberta de biomarcadores associados ao fenótipo de interesse.

2.4. Proteômica aplicada à qualidade da carne

Embora tenham ocorrido avanços desde o desenvolvimento da técnica de separação de proteínas por eletroforese (ALMEIDA et al., 2015) e sua integração com a espectrometria de massas para a identificação de proteínas, ainda existe uma aplicação limitada da proteômica em relação à ciência animal (ECKERSALL;

ALMEIDA, 2012). O objetivo da proteômica é obter informações sobre a expressão da proteína celular e, assim, também revelar a função dos genes e, finalmente, explicar como a hereditariedade e o ambiente interagem para controlar as funções celulares e as características fisiológicas dos organismos vivos (BENDIXEN, 2005).

Atualmente a proteômica tem sido amplamente utilizada na identificação de proteínas relacionadas com características de qualidade de carne (RODRIGUES et al., 2017). A conversão do músculo em carne implica em mecanismos bioquímicos complexos que influenciam na qualidade final, o estudo dessas alterações que ocorrem no proteoma leva a um maior entendimento a respeito dos mecanismos bioquímicos e moleculares, ocorridos durante o *post mortem*, envolvidos nas características de qualidade de carne (HOLLUNG et al., 2007).

Diversos estudos já utilizaram a proteômica como ferramenta para a obtenção de proteínas diferencialmente expressas em fenótipos contrastantes da qualidade de carne. Laville et al. (2009) em estudo proteômico do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Charolês, contrastou dois grupos: maior e menor maciez, e relataram a proteína antioxidante deglicase DJ-1 (PARK7) como um biomarcador para maciez, sendo a sua expressão maior em carnes com menor maciez.

Outras proteínas com função de defesa em resposta ao estresse, as chaperonas, também são relatadas como potenciais biomarcadores para qualidade da carne. Morzel et al. (2008) associou a maior expressão da HSP27, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos, com a ineficiência da maciez da carne durante o *post mortem*. Do mesmo modo Carvalho et al. (2014) reportaram a HSP27 e HSP70 como possíveis biomarcadores para a maciez, essas proteínas possuem função anti-apoptótica e a fosforilação das mesmas durante o *post mortem* exercem uma influência negativa na degradação das proteínas miofibrilares de modo que a maior expressão destas implica em uma carne com menor maciez.

Wu et al. (2015) sugeriram as proteínas triosefosfato isomerase, lactato desidrogenase A, frutose bifosfato aldolase A, peroxirredoxina-6 e piruvato quinase como candidatas a biomarcadores para as mudanças ocorridas na cor da carne durante o processo *post mortem* e de maturação, por serem reveladas, por meio da bioinformática, como representantes da via glicolítica, metabolismo energético e redox. Zuo et al. (2016) em estudo recente com dois grupos contrastantes de perda de água por gotejamento, alto e baixo, para avaliar a capacidade de retenção de água no músculo *Longissimus lumborum* de laques, relatou 55 proteínas diferencialmente

expressas e através da bioinformática pôde evidenciar a relação entre proteínas estruturais e enzimas e relacioná-las com a via glicolítica e o metabolismo energético.

Recentemente Rodrigues et al. (2017) relataram que a abordagem proteômica no músculo *Longissimus lumborum* permitiu a verificação de diferenças na qualidade da carne entre bovinos Angus e Nelore, através dos mecanismos de atuação das proteínas envolvidas na contração e organização celular (tropomiosina cadeia alfa 1, troponina T, miosina de cadeia leve 1, malato desidrogenase e alfa enolase), e das proteínas do choque térmico (HSP70). Tendo em vista esse cenário, é notável que a utilização de técnicas de eletroforese para separação de proteínas, espectrometria de massa e bioinformática, associadas ao fenótipo permitem um processo de aceleração do melhoramento genético para características de difícil mensuração, que demandam um longo tempo e apresentam alto custo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar o efeito do pH_f na qualidade da carne, nas concentrações de HSP27 e HSP70, bem como no perfil proteômico do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, de forma a contribuir para a descoberta de biomarcadores que poderão ser agregados em programas de melhoramento genético.

3.2. Específicos

- Avaliar os atributos de qualidade da carne de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore em função das distintas faixas de pH_f e tempos de maturação;
- Determinar as concentrações de HSP27 e HSP70 no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, e verificar suas correlações com características indicadoras da qualidade da carne, em função das distintas faixas do pH_f e tempos de maturação;
- Determinar as possíveis diferenças no perfil proteico da carne de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore em diferentes faixas de pH_f e nos diferentes tempos de maturação;
- Avaliar as correlações entre as proteínas diferencialmente expressas em função do pH_f e os atributos da qualidade da carne;
- Verificar o papel das proteínas diferencialmente expressas no processo de conversão do músculo em carne e sobre os atributos de qualidade da carne;
- Expandir os conhecimentos sobre o ponto de vista fisiológico, bioquímico e molecular dos possíveis fatores que influenciam diretamente no pH_f e por consequência na qualidade da carne, contribuindo para a progresso no melhoramento genético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos Avançados em Ciências da Carne (LEACC) pertencente ao Grupo de Melhoramento Genético Animal e Biotecnologia (GMAB) do Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) em parceria com o Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne (LAAQC) do Departamento de Zootecnia (ZAZ). Ambos os departamentos pertencentes à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo (FZEA/USP) situados na cidade de Pirassununga-SP. As análises de espectrometria de massas foram conduzidas em parceria com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), situado na cidade de Campinas-SP.

4.2. Animais

Foram avaliados 415 bovinos (180 fêmeas e 235 machos imunocastrados) F1 oriundos do cruzamento Simental Sul Africano x Nelore, recriados a pasto e terminados em confinamento, no município de Pirassununga/SP, pertencentes a Agropecuária Zurita.

Os bovinos foram desmamados aos 8 meses de idade e mantidos em pastagem até atingirem 350 kg de peso vivo, quando então foram encaminhados para confinamento. Até os primeiros 40 dias de confinamento a dieta inicial, de crescimento, foi composta por uma relação 70% de volumoso e 30% de concentrado (V:C), com ganho de peso médio diário aproximado de 1,3 kg/dia, até atingirem 400 kg. Em seguida, a dieta foi alterada para dieta de terminação onde a relação V:C passou a ser de 56:44%, com ganho de peso médio diário aproximado de 1,3 kg/dia, até que os animais atingissem 500 kg com idade média de 18 a 20 meses.

Ao final do período de confinamento, os animais foram abatidos após jejum de sólidos de aproximadamente 12 horas. No dia do abate, os animais foram transportados em caminhão boiadeiro até o frigorífico, localizado a aproximadamente 210 km do local de confinamento, onde foram então abatidos, de acordo com procedimentos humanitários do frigorífico, conforme exigido pela legislação brasileira.

Os animais foram insensibilizados por atordoamento com pistola pneumática e em seguida sangrados pela seção dos grandes vasos do pescoço. Na sequência foi realizada a esfolagem, evisceração, divisão e lavagem das carcaças, conforme procedimento padrão do frigorífico.

4.3. Amostras

Ao final do abate, as carcaças foram resfriadas por 48 horas, com temperatura variando entre 0 a 2°C, de acordo com exigência do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.) para a maturação sanitária. Após o resfriamento, o pH final das meias carcaças esquerdas foram determinados, e de acordo com os resultados classificadas em dois grupos conforme proposto por Pulford et al. (2008):

- Normal: $\text{pH}_f \leq 5,80$;
- Intermediário: $\text{pH}_f = 5,81 - 6,19$.

As carcaças foram seccionadas na região da 12ª e 13ª costela no sentido crânio-caudal da meia carcaça esquerda, onde foi coletada uma porção de aproximadamente 15 cm do músculo *Longissimus thoracis* (LT), a qual foi identificada e imediatamente embalada a vácuo, sendo transferida para o LEACC da FZEA/USP, para processamento.

No laboratório, as embalagens foram abertas e as porções particionadas em bifes de 2,5 cm de espessura, que foram identificados individualmente, pesados e embalados a vácuo em filme plástico de alta barreira. Em seguida foram maturados em câmara fria à temperatura média de $2^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 1 e 14 dias. Durante o período de maturação foram coletadas amostras no primeiro e no 14º dia, para análises físico-químicas e amostras para as análises das HSPs e proteômicas com peso aproximado de 5 gramas. As amostras para as análises das HSPs e proteômicas foram imediatamente congeladas a -80°C .

4.4. Análises Físico-químicas

4.4.1. pH e Temperatura

Foram determinados 48 horas após o abate por meio de um medidor digital portátil (HI99163, Hanna®) de pH e temperatura com sonda de penetração.

4.4.2. Cor

A cor foi determinada após os bifes terem sido retirados da embalagem à vácuo e expostas ao ambiente por 30 minutos, foi utilizado um colorímetro portátil (mod. CM-2500d, marca Konica Minolta®), com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30 mm, usando-se a escala L*, a*, b* do sistema CIELab (1976), onde o L* é o croma associado à luminosidade e ao brilho (L* = 0 preto, 100 branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+) e define a intensidade de vermelho; e b*, que varia do azul (-) ao amarelo (+) e determina a intensidade de amarelo, sendo tomadas medidas em três diferentes pontos da amostra, e tendo a média das três leituras definido como sendo os valores de L*, a*, b* (AMSA, 1995).

4.4.3. Perda de água por cocção (PAC)

Foi realizada segundo metodologia proposta pela AMSA (1995). Após a abertura dos sacos plásticos a vácuo os bifes foram pesados (Pi) em balança analítica e em seguida levados ao forno elétrico (Fecher de Ouro, F05) à temperatura de 170°C. A temperatura interna (aproximadamente no centro geométrico) dos bifes foi acompanhada por termopares digitais *Data Logger* individuais (700-10s, *Gulterm*). Os bifes foram virados ao atingir 42°C e retirados do forno quando a temperatura interna alcançou valores da ordem de 71°C. Após a retirada do forno, os bifes foram novamente pesados (Pf) na mesma balança e as perdas por cocção (%) foram então determinadas por meio do cálculo: $PC\% = (P_i - P_f / P_i) \times 100$.

4.4.4. Força de cisalhamento (maciez)

Para os estudos de maciez da carne, foram realizadas as análises de força de cisalhamento (WBSF, kg), seguindo os protocolos recomendados pela AMSA (1995). Após a determinação da PAC os bifes foram resfriados em temperatura ambiente e embalados em filme plásticos, em seguida refrigerados por 24 horas a 4°C.

Após refrigeração foram retiradas oito sub-amostras cilíndricas de 1,27 cm ($\frac{1}{2}$ " de diâmetro, com auxílio de um vazador elétrico (*Ferrari*, FG-13B), de cada um dos bifes. O cisalhamento foi realizado no aparelho *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico (*Salter*®, 235), equipado com balança de 25 kg de capacidade e utilizando-se sonda com deslocamento de 500 mm/min de velocidade. O valor WBSF de cada amostra foi constituído da média aritmética dos valores de força de cisalhamento obtidos nas oito sub-amostras.

4.5. Análise das HSPs

Para realização desta análise foram selecionados 38 animais em função do valor de pH_f (normal e intermediário) obtidos 48 *post mortem*. Foram classificados 19 animais em cada grupo de pH_f analisados nos dois tempos de maturação (1 e 14 dias), totalizando 76 amostras.

4.5.1. Extração de proteínas sarcoplasmáticas

Foi pesada uma alíquota de 250 µg das amostras e homogeneizadas sobre o gelo por 15 segundos a 30.000 rpm com um homogeneizador *Turrattec* (*IKA*®, *Ultra Turrattec* T-10) em 2,5 mL de tampão de extração fosfato-salino (PBS) 10x concentrado. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 4°C e 10.000g por 30 minutos e sobrenadante resultante aliquoteado em microtubos e armazenados a -80°C.

4.5.2. Determinação das concentrações

As determinações quantitativas das proteínas do choque térmico, HSP27 e HSP70 foram realizadas por meio de *Kits* comerciais imunoenzimáticos (*MyBioSource, Bovine heat shock protein 27 ELISA Kit* - #MBS011935 e *Bovine heat shock protein 70 ELISA Kit* - #MBS019766) em duplicatas e leitura a uma densidade ótica de 450 nm.

Os resultados das quantificações foram expressos em função da quantidade do total de proteína do extrato das amostras (pg HSP/mg Proteína Total), para tal a quantificação total do extrato de proteínas sarcoplasmáticas foi realizada seguindo a metodologia de Bradford (1976).

4.6. Análises Proteômicas

Dos 38 animais selecionados anteriormente para as análises de HSPs, seis foram escolhidos. A seleção para esta análise foi realizada em função do pH_f (normal e intermediário), sendo selecionados três animais com valores extremos. As análises foram realizadas nos dois tempos de maturação (1 e 14 dias), totalizando 12 amostras.

4.6.1. Extração de proteínas total

Foi realizada de acordo com o proposto por Lametsch et al. (2003) onde foram pesadas alíquotas de 0,5 g da amostra de musculo LT e homogeneizadas em 5 mL de tampão de extração contendo 8M de Uréia, 2M de Thiourea, 2% Chaps, 65 mM de DTT e 1% de inibidor de protease (*GE Healthcare*). As amostras foram homogeneizadas sobre o gelo durante 1 min a 30.000 rpm com o auxílio de *Turrattec (IKA, Ultra Turrattec T-10)*. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 4°C e 10.000g por 30 min, o sobrenadante resultante foi aliqotado em microtubos e armazenados a -80°C para posterior análise. A concentração de proteína foi determinada pelo kit de análise de proteína *PlusOne 2-D Quant (GE Healthcare)*.

4.6.2. Separação de proteínas

A separação de proteínas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS unidimensional (SDS-PAGE), as amostras foram preparadas para obtenção de um total de 60 µg de proteínas e solubilizadas em tampão de diluição, composto por 0,5 M de Tris-HCL (pH 6,8), 10% glicerol, 10% SDS (dodecil sulfato de sódio), 5% 2-mercaptoethanol e 1% azul de bromofenol, ajustados para um volume final de 10 µL. Em seguida, o homogeneizado foi aquecido durante 4 min a 100°C, e aplicados nos poços dos géis de empilhamento 4% de Tris-HCL (0,5 M de Tris-HCL (pH 6,8), 10% SDS, 30% Acrilamida/Bis, 10% persulfato de amônio e TEMED).

A corrida eletroforética foi realizada em *Mini-Protean System (Bio-Rad®)* a 180 v constantes e 50 mA/gel até a descida para o gel de separação 12% de Tris-HCL (1,5 M de Tris-HCL (pH 8,8), 10% SDS, 30% Acrilamida/Bis, 10% persulfato de amônio e TEMED), após a descida a amperagem foi alterada para 15 mA/gel. Após a finalização da corrida os géis foram subsequentemente corados em solução *Coomassie G250* (sulfato de amônio a 8%, ácido fosfórico a 0,8%, *Coomassie Blue G-250* a 0,08% e metanol a 20%). O marcador de peso molecular utilizado foi *PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*. O gel foi digitalizado por meio de um *Image Scanner III (GE Healthcare®)* e a análise quantitativa das bandas dos géis foi realizada com auxílio do programa *ImageQuantTL (GE Healthcare)*.

4.6.3. Digestão *in gel* das proteínas

A etapa de digestão em gel foi realizada conforme Shevchenko et al (2006). Antes de proceder à digestão com a enzima tripsina, as colunas do gel referentes às amostras, foram cortadas individualmente em 5 segmentos de tamanho igual e em seguidas picotadas em fragmentos de aproximadamente 1mm³. Os fragmentos de géis foram descorados com três lavagens de 10 minutos cada com solução de descoloração (Acetonitrila – ACN 50% em AmBic 25 mM). Posteriormente os fragmentos foram desidratados com 100% ACN por 10 minutos. Em seguida o resíduo de gel foi mantido a temperatura ambiente para completa evaporação da ACN. Os fragmentos foram reduzidos por meio de uma solução contendo 20 mM DTT em AmBic 50 mM por 40 minutos a 56°C. Em seguida, foram alquilados utilizando uma solução de 55 mM Iodoacetamida em AmBic 50 mM, incubadas por 30 minutos a

temperatura ambiente e no escuro. Esta solução foi removida e os fragmentos lavados com AmBic 25 mM. Em seguida, procedeu-se a desidratação com ACN 100% por duas vezes.

Para digestão, aos fragmentos foram adicionados 15 µl de tripsina com concentração de 20ng/µl, e incubados por 15 minutos a 4°C. O excesso de tripsina foi retirado e adicionou-se AmBic 50 mM até completa cobertura dos fragmentos. Esta solução foi incubada a 37°C por 14 horas. Posteriormente, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (ácido fórmico 5% em ACN 50%). O sobrenadante foi recuperado por eluição, consistindo em três etapas, sendo que a primeira e a segunda foram realizadas duas vezes cada. Na primeira, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 40°C, com agitação a cada cinco minutos, em 40 µl da solução de eluição I (ácido fórmico 1% em Metanol 60%). Na segunda em 40 µl da solução de eluição II (ácido fórmico 1% em ACN 50%). A terceira eluição consistiu na adição de 40 µl de ACN 100% para desidratação dos fragmentos. O sobrenadante foi recuperado e concentrado à vácuo a temperatura ambiente até a secagem completa. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de TFA 0,1%, agitadas em *vortex* e dessalinizadas pela passagem em colunas de fase reversa *Zip Tip* C18, P10 (Millipore). Logo após foram secas e concentradas a vácuo, à temperatura ambiente. As amostras foram então armazenadas a -80°C até as análises de cromatografia líquida seguido de espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4.6.4. Análises de LC-MS/MS

Os peptídeos foram ressuspensas em uma solução de ácido fórmico a 0,1% em 50% de acetonitrila e separadas através de coluna de fase reversa C18 (100µmx100mm), utilizando-se um cromatógrafo de alto desempenho *nanoAcquity* (Waters®, *nanoACQUITY Ultra Performance LC*) acoplado ao espectrômetro de massa (Waters®, *Q-TOF Premier*) com fonte de ionização do tipo *nanoelectrospray*, a uma taxa de fluxo de 0,6µL/min, em gradiente de 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% por 50 minutos em uma tensão ajustada para 3,5kV e voltagem do cone de 30V com a temperatura da fonte a 100°C.

O instrumento foi programado para o modo *top three*, no qual um espectro de MS é adquirido seguido por MS/MS dos três principais picos identificados com maior intensidade. Os espectros foram adquiridos utilizando o *software MassLynx v4.1*

originando dados brutos (raw) que serão convertidos para o formato peak list (.mgf) através do *software mascot Distiller v2.3.02 (Matrix Science Ltd.)* e confrontados com o banco de dados do *UniProt*.

4.6.5. Análises de western-blotting

A validação dos resultados provenientes da análise unidimensional SDS-PAGE submetidas a cromatografia líquida seguido de espectrometria de massas (*GeLC-MS/MS*) foi realizada por meio do *western blotting*. Um total de 5 µg do extrato de proteína total foi solubilizado em tampão de diluição composto por 4x *Laemmli sample buffer* (#161-0747, Bio-Rad) suplementado com 10% v/v de 2-mercaptoetanol 5% (v/v), para um volume final de 15 µL, em seguidas aquecidas à 100°C por cinco minutos. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida 4-15% (SDS-PAGE) com 15 poços, utilizando o *precast gel Mini-Protean TGX* (#456-1086, Bio-Rad) e tampão de corrida diluído para 1x (#170-6435, Bio-Rad) em *Mini-Protean System* (Bio-Rad) a 100 V constantes por 120 minutos

Após a corrida, os géis foram lavados em água destilada e em seguida as proteínas foram transferidas em sistema de transferência semi-seco *Trans-Blot Turbo* para membranas PVDF (#170-4156, Bio-Rad) com duração de 3 min. Após, as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com tampão TBS-T (Tris - #170-6435, Bio-Rad -, com 0,1% de Tween) contendo 5% de BSA (#1870, INLAB) por uma hora a temperatura ambiente sobre agitação moderada.

As membranas foram então lavadas por três vezes por cinco minutos com TBS-T, e em seguidas incubadas overnight a 4°C em TBS-T contendo 5% de BSA e anticorpo primário HSPB1 (27 kDa, #sc-13132, Santa Cruz Biotechnology) e TPI (30 kDa, #sc-166785, Santa Cruz Biotechnology), nas respectivas diluições de 1:20000 e 1:500. No dia seguinte, as membranas foram novamente lavadas três vezes em TBS-T por cinco minutos, e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com HRP (#A2554, Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 em TBS-T contendo 5% de BSA por uma hora a temperatura ambiente.

Após a incubação com o anticorpo secundário as membranas foram lavadas 3x em TBS-T por 5min, e reveladas utilizando o sistema quimioluminescente *Clarity Western ECL Substrate* (#170-5060, Bio-Rad). As imagens foram capturadas usando câmera de CCD de alta resolução com sistema ChemiDoc MP Image System Bio

Rad®. Para mensurar os níveis de expressão das proteínas os volumes das bandas foram calculados utilizando o *Software Image Lab* v.6.0. Os volumes das bandas das amostras foram normalizados com a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 31 kDa, #G9295, Sigma-Aldrich), na diluição de 1:20000, em função da razão entre o volume da banda da proteína de interesse, HSP27 e TPI, pelo volume da sua respectiva banda de GAPDH (JEONG et al., 2014).

4.7. Análise dos Resultados

4.7.1. Físico-químicos e análises das HSPs

Os dados foram submetidos a verificação das pressuposições de análises de dados (normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias), utilizando o procedimento PROC UNIVARIATE. Em seguida os dados passaram por análise de variância pelo PROC MIXED adotando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os procedimentos foram realizados com o auxílio do programa estatístico SAS 9.3 (Statistical Analysis System), utilizando o modelo matemático especificado a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + pH_{fi} + T_j + pH_{fi} * T_j + GC_k + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} é a observação do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore, no grupo de pH_{fi} , no tempo de maturação j , no GC k ; μ é a média geral do experimento; pH_{fi} é o efeito do fixo pH_f, sendo i = normal e intermediário; T_j é o efeito fixo do tempo de maturação, sendo j = 1 e 14 dias; $pH_{fi} * T_j$ o efeito fixo da interação entre os fatores pH_{fi} e o tempo de maturação j ; GC é o efeito aleatório do grupo de contemporâneo k , formado pela ordem de abate (1 a 16) e condição sexual (M e F), sendo k = 1 (1-M), 2 (1-F), 3 (2-M), ... 32 (16-F); e_{ijk} o efeito aleatório residual associado à característica Y_{ij} , normalmente distribuída, com média 0 e variância σ^2 .

4.7.2. Bioinformática

Os espectros GeLC-MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram processados através do software *Mascot* 2.3.02 contra o banco de dados *Bos taurus UniProtKB* (44491, 2016), com tolerância 0,100 Da para peptídeos e 0,50 Da para os fragmentos, com um sítio de clivagem ausente.

Os resultados foram analisados com o programa estatístico proteômico *Scaffold* v4.6.1, considerando confiabilidade >95% para peptídeos e para proteínas >99% e no mínimo dois peptídeos, para identificação das proteínas. A comparação entre grupos de pH_f ao longo da maturação foi realizada pelo T-Test ao nível de significância de 5% (p<0,05), utilizando-se a normalização dos espectros pelo método quantitativo *total spectra*. A variação quantitativa de abundância das proteínas no grupo pH_f normal para pH_f intermediário foi determinada pelo Log2 da *fold difference* (FD), calculado através da razão entre o pH_f intermediário (pH_fI) e o pH_f normal (pH_fN).

$$\text{Log2FD} = \frac{pH_f I}{pH_f N}$$

As proteínas identificadas como diferencialmente expressas foram submetidas a análise de enriquecimento funcional, para análise de interação proteína-proteína e anotação para termos da ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) e vias metabólicas *KEGGs* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), adotando-se o nível de 95% para controle de falsos positivos (*False Discovery Rate*, FDR < 0,05) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), por meio do programa *String* v10.5 (SZKLARCZYK et al., 2017). Posteriormente as categorias ontológicas – componente celular (CC), função molecular (FM) e processos biológicos (PB) – significativas foram submetidas a análise por REVIGO (*Reduce + Visualize GO*) para resumir os termos GO agrupando os termos redundantes.

4.7.3. Correlação entre os resultados

Para avaliação das possíveis relações entre as características de qualidade da carne e as análises das HSPs e proteômica foram utilizadas análises de correlação Momento-Produto de Pearson utilizando o procedimento PROC CORR do programa estatístico SAS 9.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos valores de pH_f foi possível observar uma incidência de 4,6% de carnes com pH_f > 5,81, entretanto obtivemos apenas dois grupos distintos: pH_f normal: menor ou igual a 5,80; e pH_f intermediário: 5,81 até 6,19. O valor máximo de pH_f nas 415 carcaças analisadas foi de 5,97, fator que não permitiu a classificação das carcaças em um terceiro grupo o do pH_f alto: maior ou igual a 6,20 (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos grupos segmentados de acordo com os valores de pH_f mensurado no músculo *Longissimus thoracis* após 48 horas *post mortem* de animais F1 oriundos do cruzamento Simental Sul Africano x Nelore em frigorífico comercial.

Grupo	pH _f	N ¹	Média	DP ²	Mín ³	Máx ⁴
Normal	≤ 5,80	396	5,51	0,12	5,21	5,80
Intermediário	5,81 – 6,19	19	5,88	0,05	5,81	5,97
Alto	≥ 6,20	0	-	-	-	-

¹N = número de meias carcaças; ²DP = desvio padrão; ³Min = valor mínimo de pH_f; ⁴Max = valor máximo de pH_f.

Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, Poleti et al. (2012) encontraram incidência de 16,6% de carnes DFD em um total de 241 bovinos da raça nelore. É possível que a heterose proveniente do incremento da genética de animais *Bos taurus taurus* tenha influenciado em uma menor ocorrência de carnes DFD no presente estudo.

De acordo com o número de carcaças identificadas com pH_f intermediário (19) foram então selecionadas outras 19 carcaças com pH_f normal, totalizando 38 carcaças para as análises físico-químicas e das HSPs como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Estatística descritiva e P-valor para validação da segregação dos grupos de pH_f para as análises físico-químicas e das HSPs.

Grupo	N ¹	Média	DP ²	Mín ³	Máx ⁴	P-valor
Normal	19	5,52	0,02	5,49	5,55	>,0001
Intermediário	19	5,88	0,05	5,81	5,97	

¹N = número de meias carcaças; ²DP = desvio padrão; ³Min = valor mínimo de pH_f; ⁴Max = valor máximo de pH_f.

Balan; Kim; Blijenburg (2014) classificaram um total de 12 bovinos em dois grupos de pH_f, normal e intermediário, com o objetivo de avaliar o papel das HSPs na degradação das proteínas miofibrilares. Rios-Mera; Pinto; Contreras-Castillo (2017) analisando o efeito do pH e do tempo de maturação sobre a proteólise do músculo de bovinos Nelore abatidos em frigorífico comercial no Brasil, classificaram apenas dois grupos de pH_f com valores médios de 5,58 ± 0,06 e 5,83 ± 0,03, respectivamente para

normal e intermediário, corroborando com os resultados apresentados na presente pesquisa.

Para as análises proteômicas foram selecionadas 3 carcaças para cada um dos grupos de pH_f (normal e intermediário), dos 38 animais selecionados anteriormente para as análises de HSPs. A seleção das carcaças para essa análise foi realizada em função do pH_f sendo selecionados os valores próximos a média presentes nos dois grupos, totalizando 6 amostras (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatística descritiva e P-valor para validação da segmentação dos grupos de pH_f para as análises proteômicas.

Grupo	N¹	Média	DP²	Mín³	Máx⁴	P-valor
Normal	3	5,53	0,01	5,52	5,54	>,0001
Intermediário	3	5,87	0,02	5,85	5,89	

¹N = número de meias carcaças; ²DP = desvio padrão; ³Min = valor mínimo de pH_f; ⁴Max = valor máximo de pH_f.

Os valores médios de pH_f encontrados para os dois grupos estão corroborando com os utilizados por Contreras-Castillo et al. (2016); Lomiwes et al (2013); Pulford et al. (2008); Rios-Mera; Pinto; Contreras-Castillo (2017) e Wu et al. (2014) que estudaram a influência que o pH_f exerce sobre os mecanismos bioquímicos e degradação de proteínas no músculo e em consequência nos atributos que definem a qualidade da carne.

5.1. Análises Físico-químicas

As características físico-químicas do músculo *Longissimus thoracis* estão descritas na tabela 4. Os valores de pH apresentaram baixa dispersão ($CV < 15\%$), enquanto que a dispersão dos valores dos parâmetros L^* e a^* do atributo cor foram moderados ($CV = 15 - 30\%$), apenas os valores de b^* e FC, apresentaram alta dispersão ($CV > 30\%$).

Tabela 4 – Estatística descritiva dos atributos físico-químicos: cor (L^* , a^* e b^*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

Variável	N ¹	Média	EPM ²	CV (%) ³	Mín ⁴	Máx ⁵
pH 1d	38	5,70	0,030	3,24	5,49	5,97
L^* 1d	36	29,48	1,391	28,71	9,71	40,35
a^* 1d	36	13,83	0,676	29,07	7,86	26,00
b^* 1d	36	10,05	0,595	35,10	4,87	18,91
PAC 1d	38	27,73	0,539	11,98	19,72	37,38
FC 1d	38	8,86	0,475	33,07	1,90	14,50
pH 14d	38	5,60	0,021	2,33	5,06	5,90
L^* 14d	38	31,33	0,870	17,12	20,46	40,30
a^* 14d	38	14,71	0,573	24,03	7,34	21,35
b^* 14d	38	12,76	0,750	36,25	4,26	21,05
PAC 14d	38	27,92	0,571	12,60	19,86	34,58
FC 14d	38	6,27	0,429	42,15	2,95	12,70

¹N = número de meias carcaças; ²EPM = erro padrão da média; ³CV = coeficiente de variação em porcentagem; ⁴Min = valor mínimo; ⁵Max = valor máximo.

Na tabela 5 são apresentados os resultados das análises físico-químicas. Não foi observado efeito da interação entre os grupos de pH_f e tempo de maturação ($p > 0,05$) para a variável perda de água por cocção (PAC) ($p > 0,05$). Entretanto, as variáveis cor (L^* , a^* e b^*) e força de cisalhamento (FC) tiveram efeito da interação ($p < 0,05$) e são descritos na tabela 6.

Tabela 5 - Análise de variância dos atributos físico-químicos: cor (L^* , a^* e b^*), força de cisalhamento (FC) e perda de água por cocção (PAC) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f e tempos de maturação.

Variável	Grupo (pH _f)		Tempo (Dias)		EPM ¹	P-valor ²		
	Normal	Intermediário	1	14		G ³	M ⁴	G*M ⁵
L^*	32,85	27,96	29,48	31,33	0,816	0,0071	0,0934	<,0001
a^*	14,59	13,94	13,83	14,71	0,441	0,5464	0,1374	0,0006
b^*	10,57	12,24	10,05	12,76	0,502	0,0856	0,0033	0,0062
PAC%	27,33	28,33	27,73	27,92	0,390	0,2286	0,8000	0,1804
FC (kg)	7,34	7,78	8,86	6,27	0,351	0,5848	<,0001	<,0001

¹EPM = erro padrão da média; ²P-valor: significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); ³G = efeito do grupo de pH_f; ⁴M = efeito do tempo de maturação; ⁵G*M = efeito da interação entre os fatores grupo de pH_f e tempo de maturação.

O parâmetro L^* , componente da cor indica a luminosidade e determina o brilho da carne. A influência que os grupos de pH_f exercem sobre esse parâmetro nos tempos de maturação foi significativa ($p < 0,05$) somente no tempo de 1 dia de maturação (Tabela 6), ocorrendo uma diminuição dos valores de L^* com o aumento do pH_f indicando o menor brilho da carne em pH_f intermediário (24,43) o que pode ser devido à maior absorção e menor reflexão da luz nesse grupo de pH_f , resultado semelhante ao encontrado por Abril et al. (2001).

Já em relação ao tempo de maturação, observou-se efeito apenas no grupo pH_f intermediário sobre L^* ($p < 0,05$), observando-se um aumento no valor de L^* em carnes maturadas. O aumento dos valores de L^* em pH_f intermediário ao longo da maturação já foi reportada anteriormente por Lee et al. (2008) e pode ser devido as modificações estruturais das proteínas. Com o aumento no tempo de maturação em carnes que apresentam pH_f acima de 5,80, as fibras musculares perdem a capacidade de manter a água, diminuindo a ligação entre as proteínas e a água, melhorando a capacidade da carne em refletir a luz e aumentar o brilho (ENGLISH et al., 2016).

Os valores de L^* encontrados em pH_f normal estão próximos aos valores médios de 31,10 observados por Soji; Muchenje (2016) em bovinos da raça Simental terminados em sistema de confinamento.

Tabela 6 - Desdobramento dos atributos físico-químicos cor (L^* , a^* e b^*) e força de cisalhamento (FC) do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com efeito de interação ($G \times T$) significativa entre os fatores grupo de pH_f (G) e tempo de maturação (M).

Maturação (dias)	Grupo (pHf)		EPM ¹	p-valor G ²
	Normal	Intermediário		
L*				
1	34,52	24,43	1,127	0,0005
14	31,18	31,48	0,882	0,9981
p-valor M ³	0,1583	0,0002	-	-
a*				
1	13,06	14,60	0,678	0,6705
14	16,13	13,29	0,531	0,0524
p-valor M ³	0,0045	0,3696	-	-
b*				
1	7,97	12,13	0,488	0,0008
14	13,17	12,34	0,757	0,9460
p-valor M ³	0,0008	0,9982	-	-
FC (kg)				
1	9,46	8,25	0,471	0,5765
14	5,23	7,31	0,398	0,0595
p-valor M ³	<,0001	0,2927	-	-

¹EPM = erro padrão da média; ²P-valor G: efeito do grupo de pH_f significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); ³P-valor M = efeito do tempo de maturação significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$).

A intensidade da cor vermelha, mensurada pelo parâmetro de cor a^* , não sofreu influência do pH_f ($p > 0,05$) nos dois tempos de maturação, no entanto a maturação teve efeito em pH_f normal, sendo que aos 14 dias de maturação foi observada maior intensidade de vermelho (16,13). A concentração total e estrutura da mioglobina, proteína hidrossolúvel presente no músculo e responsável pela oxigenação, é quem determina a intensidade da cor da carne, sendo o consumo de oxigênio intramuscular regulado pela atividade das mitocôndrias (MANCINI; RAMANATHAN, 2014). Em ambiente de atmosfera a vácuo o consumo de oxigênio residual pelas mitocôndrias limita a formação da oximioglobina, mantendo a mioglobina no estado de desoximioglobina (MCKENNA et al., 2005).

Durante o processo de maturação a respiração mitocondrial é paralisada (NASSU et al., 2014), devido ao esgotamento de substratos e coenzimas (NAD^+ e FAD^+) e pela degradação das enzimas envolvidas na respiração mitocondrial (AROEIRA et al., 2017; TANG et al., 2005), favorecendo a penetração de oxigênio no músculo contribuindo para maior formação de oximioglobina resultando em aumento nos valores de a^* . Corroborando com o resultado obtido por Oliete et al. (2006) que verificaram que durante o período de maturação da carne, em virtude de uma redução na competição pelo oxigênio por parte dessas enzimas, existe mais oxigenação da mioglobina e consequente formação de oximioglobina, aumentando os valores de a^* .

Na intensidade da cor amarela, mensurada pelo valor de b^* , o pH_f influenciou ($p < 0,05$) somente no tempo 1 dia de maturação, onde houve um acréscimo no valor de b^* (12,13) em pH_f intermediário, esse resultado possivelmente está relacionado a paralização da atividade mitocondrial em pH_f intermediário, devido a menor disponibilidade de substratos, dessa forma o oxigênio penetra na carne e ocorre a oxigenação da mioglobina (MANCINI; RAMANATHAN, 2014; NASSU et al., 2014). Já a maturação exerceu influência ($p < 0,05$) apenas em pH_f normal, sendo observado maior valor dessa característica aos 14 dias de maturação (13,17), semelhante ao que ocorreu com o parâmetro a^* de intensidade da cor vermelha. Resultados mais elevados de b^* em carnes maturadas podem ser atribuídos à uma maior oxigenação da mioglobina, transformando-a em oximioglobina e oxidação desta para metamioglobina (KARAMUCHI et al., 2011; OLIEITE et al., 2006).

Para a variável FC não houve efeito do pH_f ($p > 0,05$) nos dois tempos de maturação. Em geral, os valores de FC foram considerados altos nas 2 classes de pH_f avaliadas, pH_f normal = 7,34kg e pH_f intermediário = 7,78kg, em relação ao valor

médio de 3,95kg reportado por Soji; Muchenje (2016) para bovinos da raça Simental Sul Africano. Esse contraste em relação aos valores observados no presente estudo e ao já reportado na literatura pode ser devido ao cruzamento com bovinos de origem *Bos taurus indicus*, tendo em vista que esses animais apresentam uma carne com menor maciez (CARVALHO et al., 2014).

A influência que a composição genética de bovinos *Bos taurus indicus* exercem sobre a maciez da carne já foi demonstrada em diversos estudos (GURSANSKY et al., 2010; HIGHFILL et al., 2012; LUCKET et al., 1997). Segundo Savell; Shackelford (1992) carnes com mais de 25% de genótipo *Bos taurus indicus* possuem menor maciez e são inaceitáveis por consumidores americanos. Rodrigues et al. (2017) reportaram o valor de 7,6 kg de FC para animais em bovinos da raça Nelore.

O amaciamento da carne é dependente da degradação das proteínas miofibrilares: titina, nebulina, desmina e troponina T durante o processo de maturação (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2014a; WU et al., 2014). Segundo Herrera-Mendez et al. (2006) e Ouali et al. (2006) a proteólise das proteínas miofibrilares é amplamente atribuída aos sistemas de enzimas das calpaínas e catepsinas que são negativamente reguladas pelas calpastatinas. A associação da maior expressão das calpastatinas à maiores índices de FC em animais *Bos taurus indicus* é amplamente discutida na literatura (MULLINS et al., 2016).

A maturação exerceu ação sobre a FC em pH_f normal, sendo que aos 14 dias de maturação houve uma menor FC (5,23). No entanto, em pH_f intermediário apesar de ter ocorrido um decréscimo no valor de FC, este não foi significativo ($p>0,05$), resultados que corroboram com os obtidos por Balan; Kim; Blijenburg (2014), Contreras-Castillo et al. (2016), Lomiwes et al. (2014a), Pulford et al. (2008) e Wu et al. (2014). O amaciamento em carnes no grupo pH_f intermediário acontece de uma forma mais tardia, sendo necessário um período mínimo de 21 dias de maturação para que esse decréscimo seja significativo (FAROUK et al., 2007), enquanto que em pH_f normal o amaciamento ocorre mais precocemente. O processo de amaciamento da carne durante a maturação é geralmente atribuído a proteólise de proteínas miofibrilares, sendo o sistema enzimático proteolítico das calpaínas e catepsinas os que desempenham o papel mais efetivo nessa degradação (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016).

De acordo com Lomiwes et al. (2014a), o amaciamento da carne ao longo da maturação em pH_f normal é devido à proteólise da desmina associada à degradação um pouco mais tardia de titina e nebulina, o que provoca um processo de amaciamento mais lento e as carnes nesse grupo de pH_f apresenta um maior valor inicial de FC, a degradação dessas proteínas miofibrilares está associada a maior atividade da catepsina B nesse grupo. Contraditoriamente no grupo de pH_f intermediário, que apresentam carnes com menor grau de maciez e com valores de FC inaceitáveis pelo consumidor (WU et al., 2014), a uma diminuição na taxa e extensão da degradação das proteínas miofibrilares, as enzimas proteolíticas calpaínas e catepsina B são encontradas em baixos níveis de atividade acarretando em uma mínima degradação da desmina combinada a mínima proteólise de filamina, titina e troponina T (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2013).

5.2. Análises das HSPs

Com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na determinação da qualidade da carne bovina, as HSPs presentes no músculo foram mensuradas. Na tabela 7 estão descritos os resultados HSPs. A concentração de HSP 27 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre grupos de pH_f e entre os tempos de maturação. Já a concentração e HSP70 foi influenciada ($p < 0,05$) somente pelo tempo de maturação. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) de interação entre os fatores pH_f e maturação.

Tabela 7 - Análise de variância da concentração das Proteínas do Choque Térmico HSP 27 e 70 no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f e tempos maturação.

HSP ¹	Grupo		Maturação (Dias)		EPM ²	P-valor ³		
	Normal	Intermediário	1	14		G ⁴	M ⁵	G*M ⁶
HSP 27	139,51	167,60	181,95	125,17	8,351	0,0485	0,0009	0,0602
HSP 70	23,72	26,58	29,39	20,91	1,421	0,3459	0,0008	0,0607

¹HSP = *heat shock protein*: pg/mg Proteína total; ²EPM = erro padrão da média; ³P-valor: significativo ao nível de 5% ($p < 0,05$); ⁴G = efeito do grupo de pH_f; ⁵M = efeito do tempo de maturação; ⁶G*M = efeito da interação entre os fatores grupo de pH_f e tempo de maturação.

Em relação ao efeito do grupo de pH_f as maiores concentrações de HSP27 foram observadas no grupo de pH_f intermediário (167,60) e com 1 dia de maturação (181,95). A HSP27, uma pequena proteína do choque térmico que está envolvida na organização celular e que interage com os miofilamentos (CARVALHO et al., 2014), é

associada a processos de apoptose que ocorrem no músculo, sua ação independe da presença de ATP, contrariando as HSPs de maior peso molecular (GARRIDO et al., 2006).

Com o fim do fornecimento de oxigênio e nutrientes ao músculo no *post mortem*, as células musculares entram em apoptose. Em resposta ao início desse processo, ou exposição a condições adversas como a hipertermia, hipóxia e oxidantes nocivos, as proteínas do choque térmico são fosforiladas de forma progressiva na tentativa de manter a homeostase muscular, desempenhando um papel protetor nas células, as HSPs ligam-se as proteínas miofibrilares danificadas ou que estão sendo degradadas e impedem a proteólise (LOMIWES et al., 2013; SUN; MACRAE, 2005), corroborando com nossos resultados apresentados na tabela 6 em que no pH_i intermediário ao tempo 1 dia de maturação observou-se carne com maior FC que aos 14 dias, as quais apresentaram maior quantidade HSP27. Esses mesmos resultados foram observados por Balan; Kim; Blijenburg (2014) e Lomiwes et al. (2013).

Em relação a HSP70 observa-se a maior concentração em 1 dia de maturação. A HSP é uma proteína dependente de energia em forma de ATP, capaz de reestruturar as proteínas miofibrilares que sofreram desnaturação (WANG; SPECTOR, 2001). Segundo Mullins et al. (2016) devido a HSP70 ser dependente de ATP, com declínio irreversível de ATP durante o *post mortem*, a capacidade de síntese da HSP70 é gradativamente declinante ao longo da maturação, por isso foi observada a sua maior concentração no tempo 1 dia de maturação.

Análises de correlações simples entre as concentrações de HSPs 27 e 70 e os resultados das análises físico-químicas estão apresentadas na tabela 8. É possível observar correlações de moderadas a fracas (moderada: $r = 0,30 - 0,70$ e fracas: $r < 0,30$). A FC aos 14 dias de maturação obteve correlação significativa ($p < 0,05$) com as duas HSPs analisadas no grupo pH_i intermediário, já a PAC em 1 dia de maturação foi significativamente ($p < 0,05$) correlacionada com a HSP70 no grupo pH_i intermediário. Não houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre as demais variáveis físico-químicas nos tempos 1 e 14 dias de maturação e as HSPs nos dois grupos de pH_i definidos.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação de *pearson* (r) entre as concentrações das HSPs 27 e 70 e as variáveis físico-químicas: cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) nos tempos 1 e 14 dias de maturação no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f.

Variáveis	HSPs ¹			
	HSP27		HSP70	
	pH _f Normal	pH _f Intermediário	pH _f Normal	pH _f Intermediário
L* 1d	-0,3048	-0,1319	-0,2760	-0,2989
a* 1d	0,3916	0,1360	0,3027	0,2689
b* 1d	0,3826	0,1753	0,4873	0,4121
PAC 1d	-0,2277	-0,2543	-0,2205	-0,4765*
FC 1d	0,1739	-0,1633	-0,0836	-0,3983
L* 14d	-0,2238	-0,3584	-0,0484	-0,3804
a* 14d	0,3684	0,1781	-0,1101	0,2470
b* 14d	0,4361	0,7009	0,0620	0,1298
PAC 14d	0,3539	-0,1761	0,2139	-0,4116
FC 14d	0,2391	0,5371*	0,1364	0,4937*

¹HSP = *heat shock proteins*: pg/mg Proteína total;

*P-valor < 0,05, significativo ao nível de 5%.

As correlações moderadas positivas observadas entre FC aos 14 dias de maturação com as HSPs 27 (r = 0,5371) e 70 (r = 0,4937) no grupo pH_f intermediário, reforçam os resultados apresentados anteriormente, evidenciando a influência que o pH_f exerce sobre a maciez da carne.

De acordo com Mullins et al. (2016) a HSP 27 e a HSP 70 exercem ação em conjunto, inibindo a proteólise através de sua ligação com as proteínas miofibrilares reestruturando as que já estão em processo de desnaturação. Assim a concentração e degradação desse grupo de proteínas está diretamente relacionada ao processo inibitório de amaciamento da carne, ou seja, maior concentração e menor degradação das HSPs promove a diminuição da maciez da carne. Esses achados são vastamente reportados em estudos das ciências da carne (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2013; PULFORD et al., 2008), relatos que corroboram com os resultados observados nesse estudo.

De acordo com Lomiwes et al. (2013, 2014b) os maiores valores de FC em pH_f intermediário estão relacionados com a associação entre o sistema protetor que as HSPs desempenham e o sistema enzimático calpaína – calpastatina. A degradação lenta das HSPs em pH_f intermediário favorece a ação das calpastatinas, atuando como um substrato alternativo por ser um inibidor competitivo da proteólise realizada pelas calpaínas. Carvalho et al. (2014) identificaram 13 proteínas diferencialmente expressas por LC-MS/MS entre os grupos com baixa e alta FC no músculo de bovinos da raça Nelore, dentre elas as HSPs 27 e 70, que apresentaram menor abundância

no grupo baixa FC, esses resultados permitiram indicar a importância destas proteínas para a qualidade de carne.

Portanto, entre os sistemas proteolíticos envolvidos no inevitável processo de apoptose *post mortem*, destacam-se as HSPs, as quais podem modular a ação dos sistemas enzimáticos proteolíticos e influenciar na maciez da carne.

5.3. Análise Proteômica

5.3.1. GeLC-MS/MS

A análise GeLC-MS/MS permitiu a identificação de um total de 93 proteínas (APÊNDICE A). Na análise de variância foram identificadas 13 proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) entre os grupos de pH_f (Tabela 9). Dessas três proteínas foram identificadas nos dois tempos de maturação, sete em 1 dia de maturação e três aos 14 dias de maturação.

As proteínas diferencialmente expressas foram agrupadas de acordo com as distintas funções que exercem. As proteínas Triosefosfato isomerase (TPI1), fosfoglicerato mutase 2 (PGAM2), malato desidrogenase (MDH1), piruvato quinase (PKM2) e adenilato quinase isoenzima 1 (AK1) exercem função metabólica. A troponina I tipo 1 (TTNI2), tropomiosina cadeia beta (TPM2), troponina C tipo 2 (TNNC2) e cofilina 2 (CFL2) são proteínas que desempenham função estrutural. As proteínas relacionadas à resposta ao estresse identificadas como diferencialmente expressas foram a proteína deglicase DJ-1 (PARK7), $\alpha\beta$ -cristalina (CRYAB), proteína do choque térmico 27 (HSPB1) e peroxirredoxina 1 (PRDX1).

A TPI1 e a PGAM2 foram menos expressas em pH_f intermediário aos 1 e 14 dias de maturação, a PKM2 apresentou menor abundância no tempo 1 de maturação e a AK1 aos 14 dias de maturação. Todas essas 4 proteínas são enzimas da via glicolítica responsáveis pela produção de energia. Carnes DFD são provenientes da perda de reservas de glicogênio antes do abate, em consequência da diminuição da concentração de lactato e de íons de H⁺ no músculo, não ocorrendo a acidificação de forma satisfatória, justificando a menor expressão destas proteínas em pH_f intermediário.

Tabela 9 - Proteínas diferencialmente expressas no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, nos dois tempos de maturação (1 e 14 dias).

Nome da proteína	Gene	PM ¹ (kDa)	ID <i>Uniprot</i> ²	N. Pept. Unic. ³ / % Cob. ⁴	Maturação (dias)				Função
					1		14		
					Log2FD ⁵	P-valor ⁶	FD ⁵	Log2P-valor ⁶	
Triosephosphate isomerase	TPI1	27	Q5E956	14/68,70	-0.95	0.0110	-0.95	0.0110	Metabólica
Phosphoglycerate mutase 2	PGAM2	29	F1N2F2	9/37,90	-0.84	0.0280	-0.84	0.0280	Metabólica
Pyruvate kinase	PKM2	58	A5D984	21/49,50	-0.40	0.0044		ns	Metabólica
Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	22	P00570	8/47,40		ns	-0.98	0.0450	Metabólica
Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	36	Q3T145	4/19,20	2.25	0.0180		ns	Metabólica
Troponin I type 2 (skeletal, fast)	TNNI2	23	A5PJM2	4/16,00	-1.25	0.0330	-1.64	0,0270	Estrututal
Troponin C type 2 (Fast)	TNNC2	18	Q148C2	6/24,30		ns	-2,30	-1.20	0.0480
Cofilin-2	CFL2	19	Q148F1	2/24,30		ns	-2,50	-1.32	0.0310
Tropomyosin beta chain	TPM2	33	Q5KR48	15/42,60	0.79	0.0320		ns	Estrututal
Alpha-crystallin B chain	CRYAB	20	P02510	10/56,60	-0.94	0.0190		ns	Resposta ao estresse
Heat shock protein beta-1	HSPB1	22	Q3T149	10/60,70	-0.80	0.0170		ns	Resposta ao estresse
Protein deglycase DJ-1	PARK7	20	Q5E946	3/27,50	-2.07	0.0180		ns	Resposta ao estresse
Peroxiredoxin-1	PRDX1	22	Q5E947	3/15,60	-2.12	0.0270		ns	Resposta ao estresse

¹PM: peso molecular em kDa; ²ID *UNIPROT*: identificação da proteína no *UNIPROT*; ³N. Pept. Unic.: número de peptídeos únicos; ⁴% Cob.: porcentagem de cobertura; ⁵Log2FD: *fold difference* (Log2), calculado através da razão entre o pH_i intermediário e o pH_i normal; ⁶P-valor: significativo ao nível de 5%, p<0,05.

ns: não significativo ao nível de 5% (p>0,05).

Segundo D'Alessandro et al. (2012) a taxa de glicólise contribui positivamente com os processos de acidificação (aumento na concentração de lactato e prótons), a diminuição na concentração de íons de H^+ , provocada pela diminuição da taxa glicolítica, aumenta a repulsão eletrostática entre os filamentos musculares, o que contribui para aumento lateral das fibras musculares e, portanto, a extensão do sarcômero. Nossos resultados corroboram, indicando uma menor expressão dessas proteínas em pH_f intermediário, e adicionalmente encontramos uma menor FC nesse grupo de pH_f . Zuo et al. (2016) observaram relação da maior expressão da TPI1, PKM2 e AK1 com a menor perda de água por gotejamento e por consequência na maior capacidade de retenção de água, característica da carne que apresenta pH_f elevado.

A PKM2 é uma enzima glicolítica que catalisa a síntese de ATP e piruvato a partir da transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato para uma molécula de ADP (fosfoenolpiruvato + ADP $\rightarrow$ Piruvato + ATP). A maior expressão e atividade dessa enzima denota um aumento no metabolismo glicolítico muscular que é associado a uma maior eficácia no amaciamento da carne no *post mortem* (PICARD; CASSAR-MALEK, 2009). Baldassini et al. (2015) também relataram uma maior expressão de PKM2 em carnes mais macias.

Em contrapartida, das proteínas metabólicas reportadas acima, a MDH1, enzima que desempenha função crucial no metabolismo energético, foi mais expressa em pH_f intermediário no tempo 1 de maturação. A função dessa proteína no sistema de coenzimas $NAD^+/NADH$ é de oxidar a malato em oxaloacetato, reduzindo NAD^+ , de maneira reversível, desempenhando um importante papel de transportadora de malato e aspartato através da membrana mitocondrial (MINARIK et al., 2002).

Acentuadas perdas de glicogênio antes do abate podem ocasionar o aumento da expressão da MDH1 com o intuito de manter a homeostase das células do músculo. Portanto a gliconeogênese é ativada e a MDH1 reduz oxaloacetato a malato, através da oxidação do NADH e consumo de H^+ para NAD^+ , com consequente formação de fosfoenolpiruvato e posteriormente da glicose. O processo de gliconeogênese diminui as concentrações de lactato e de íons H^+ ocasionando a ineficiência no declínio do pH e consequentemente carnes com $pH_f > 5,80$.

De acordo com Sasaki; Nakamura; Soeta (2014) os níveis de expressão de MDH1 foram maiores no músculo em comparação com outros tecidos, incluindo o tecido adiposo, evidenciando a importância que essa proteína desempenha no *rigor*

mortis. As alterações na expressão das proteínas com função metabólica permitem o conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos que estão envolvidos na determinação do pH_f.

Com exceção da TPM2, todas as outras proteínas diferencialmente expressas que desempenham função estrutural foram menos expressivas em pH_f intermediário, a TNNI2 foi menos expressiva em pH_f intermediário nos dois tempos de maturação avaliados, enquanto que a TNNC2 e a CFL2 somente aos 14 dias.

As troponinas são proteínas miofibrilares com importante papel na contração muscular e correlacionam-se com a maciez da carne (GOLL et al., 2008; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Segundo Fink et al. (2008) o complexo de troponinas, localizado no filamento fino do sarcômero, participam da regulação da interação cálcio-dependente da miosina com actina na contração muscular. TNNC2 é o local de ligação com íons de cálcio e a TNNI2 tem a função de ligar os filamentos de actina e tropomiosina.

Alguns autores relacionam a degradação das troponinas com o amaciamento da carne (IWANOWSKA et al., 2010; KOLCZAK et al., 2003; MOCZKOWSKA et al., 2017). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que em pH_f intermediário a falta de ligação da troponina aos íons de cálcio, devido ao pouco ATP disponível, é responsável pela ação inibitória do complexo de troponina nos filamentos de actina. Franco et al. (2015) reportaram a menor abundância de TNNC2 em músculos bovinos com pH_f > 5,80, corroborando com os resultados obtidos.

A CFL2 é uma proteína conhecida como fator de despolimerização da actina dependente de íons de H⁺ (PAPALOUKA et al., 2009). Isto significa que a maior concentração de íons de H⁺ favorecerá mais ligações entre a CFL2 e a actina, promovendo a despolimerização e, conseqüentemente, enfraquecendo os filamentos de actina. Em pH_f intermediário há uma menor concentração de íons de H⁺ o que acarreta em uma maior rigidez da actina e, portanto, menor maciez da carne.

A TPM2 foi a única proteína com função estrutural em que foi observada a maior expressão em pH_f intermediário que ocorreu com 1 dia de maturação. Assim como a troponinas, as isoformas de tropomiosinas também são proteínas miofibrilares que participam da regulação da interação cálcio-dependente da miosina com actina na contração muscular. De acordo com Oe et al. (2016) a isoforma TPM2 é mais expressa em fibras do tipo lenta. As fibras lentas possuem uma maior predisposição a se manterem encurtadas, devido à perda do número de sarcômeros em série,

ocasionada pela maior manutenção da fibra em estado de contração, o que acarreta em uma maior rigidez muscular (SCOTT; STEVENS; BINDER-MACLEOD, 2001).

A ligação da TPM2 a actina estabiliza os filamentos de actina e evitando assim a interação desses com a CFL2, o que promove a polimerização da actina conferindo maior rigidez ao músculo. Carvalho et al. (2014) relataram uma menor abundância de tropomiosina em amostras de carne com menor FC. Marino et al. (2014) reportaram a maior expressão desta proteína em amostras de *Longissimus dorsi* de bovinos que apresentaram menor perda de água por gotejamento e, por consequência, uma maior capacidade de retenção de água. A maior expressão da TPM2 e menor da CFL2 em pH_f intermediário aos 14 dias de maturação, podem ser relacionadas ao fato da maturação não ter sido eficiente no processo de amaciamento da carne em amostras deste grupo de pH_f.

Alterações observadas na expressão de proteínas estruturais permitem inferir sobre o modo de atuação dessas no *post mortem*, nas diferentes faixas de pH_f, sobre a determinação dos atributos de qualidade de carne.

Quanto as proteínas relacionadas às respostas ao estresse, PARK7, CRYAB, HSPB1 e PRDX1, todas apresentaram menor abundância em pH_f intermediário no tempo 0 de maturação.

A CRYAB e a HSPB1 (também denominada de HSP27) pertencem a um grupo de proteínas denominado de chaperonas, são classificadas como pequenas proteínas do choque térmico (sHSPs), com peso molecular ≤ 43 kDa e, são responsáveis pela resposta celular aos mecanismos estressores aos quais as células estão expostas. No *post mortem* o cálcio se acumula no sarcoplasma, à medida que as concentrações de ATP decrescem, ativando a calpaína e iniciando a proteólise miofibrilar levando ao amaciamento da carne. Ouali et al. (2006) propuseram que as sHSPs são recrutadas com a função de manutenção da homeostase celular, prevenindo a inevitável apoptose das células musculares no *post mortem*.

De acordo com Lomiwes et al. (2013) e Pulford et al. (2009) as sHSPs, incluindo a CRYAB e a HSPB1, inibem a atividade de proteólise que a calpaína exerce sobre as proteínas miofibrilares através da ligação dessas com as proteínas miofibrilares danificadas ou que estão sendo degradadas, impedido que a calpaína exerça sua ação proteolítica.

Diversos autores reportaram a associação da maior expressão das sHSPs e a lenta degradação dessas com a ineficiência da proteólise das proteínas miofibrilares

em pH_f intermediário, resultado em carnes menos macias (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; LOMIWES et al., 2013).

No entanto, o presente estudo revela a maior abundância destas proteínas em pH_f normal no tempo 1 de maturação. É importante observar que aos 14 dias de maturação não houve diferença de expressão das proteínas CRYAB e HSPB1, porém na Tabela 6 é possível observar que a maturação exerceu efeito sobre a FC no grupo de carnes com pH_f normal, indicando que com processo de maturação essas HSPs tendem a degradar e por consequência reduzem a eficiência na atividade protetora das proteínas miofibrilares, permitindo a efetividade no amaciamento da carne.

Assim como as sHSPs, as proteínas PARK7 e PRDX1 desempenham a função de proteção e resistência a apoptose e oxidação celular. A PARK7 é uma proteína pertencente ao grupo das chaperonas e participa da resposta ao estresse oxidativo mitocondrial. A PRDX1 é uma isoforma das peroxirredoxinas, essa proteína atua como antioxidante principalmente por hidrólise de peróxidos de hidrogênio facilitando assim o reparo das células danificadas (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Os resultados observados para as proteínas com função associada à resposta ao estresse indicam que em carnes não maturadas, essas proteínas exercem uma atividade mais eficiente em pH_f normal que em pH_f intermediário, mas durante o processo de maturação essas proteínas são degradadas e o amaciamento da carne ocorre de forma efetiva. No entanto, a função destas proteínas no processo *post mortem* e na definição dos atributos da qualidade de carne ainda necessitam de mais estudos para elucidação de seus mecanismos de atuação de diferentes faixas de pH_f sobre o processo de amaciamento da carne durante a maturação.

Análises de correlações simples entre as proteínas diferencialmente expressas e os atributos de qualidade de carne (pH_f, L*, a*, b*, PAC e FC) estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10 - Coeficientes de correlação de *Pearson* (*r*) entre as proteínas diferencialmente expressas, em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, e as variáveis físico-químicas: pH_f, cor (L*, a* e b*), força de cisalhamento (FC, kg) e perda de água por cocção (PAC, %) no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore

Proteínas ¹	Variáveis físico-químicas					
	pH _f	L*	a*	b*	PAC	FC
TPI1	-0,5802*	0,4292	-0,3792	-0,2909	-0,2550	0,3432
PGAM2	-0,5752	0,3296	-0,2824	-0,1651	-0,4075	0,1843
PKM2	-0,5676	0,2911	-0,5364	-0,3154	0,0419	-0,5912*
AK1	-0,3726	0,1224	-0,1067	-0,1388	-0,1995	0,2623
MDH1	0,7916*	-0,6580*	0,6603*	0,0940	0,1513	-0,3717
TNNI2	-0,4986	0,3938	-0,2775	0,0860	-0,2203	0,2044
TNNC2	-0,0967	0,2074	-0,2162	-0,0437	0,3343	0,4515
CFL2	0,0418	0,0869	-0,1304	-0,4096	-0,0055	0,3544
TPM2	0,6676*	-0,4645	0,3259	-0,3174	0,2508	-0,0251
CRYAB	-0,4697	0,2563	-0,0830	0,0025	-0,2085	0,1457
HSPB1	-0,5426	0,3875	-0,3108	-0,1183	-0,1348	0,3874
PARK7	-0,5716*	0,5426	-0,5935*	-0,3384	-0,1761	0,5294
PRDX1	-0,5327	0,4771	-0,4073	-0,0152	-0,3195	0,3065

¹Genes correspondentes as proteínas (TPI1: Triosefosfato isomerase; PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PKM2: piruvato quinase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; MDH1: malato desidrogenase; TNNI2: troponina I tipo 1; TNNC2: troponina C tipo 2; CFL2: cofilina 2; TPM2: tropomiosina cadeia beta; CRYAB: αβ-cristalina; HSPB1: proteína do choque térmico 27; PARK7: proteína deglicase DJ-1; PRDX1: peroxirredoxina 1).

*P-valor < 0,05; significativo ao nível de 5%.

Foi observada correlação moderada negativa ($r = -0,5802$) entre a proteína TPI1 e o pH_f, evidenciando que a maior expressão dessa proteína diminui o pH_f das amostras. O potencial dessa proteína como biomarcador relacionado aos atributos de qualidade da carne como por exemplo a maciez (HWANG et al., 2005) e capacidade da retenção de água (MARINO et al., 2014; ZUO et al., 2016) vem sendo estudado ao longo dos últimos anos, porém a sua relação com o pH_f ainda não foi bem estabelecida, o que permite sugerir uma possível capacidade preditora dessa proteína sobre o pH_f.

A enzima glicolítica PKM2 apresentou correlação moderada negativa ($r = -0,5912$) com a FC, a maior expressão dessa proteína acarreta em um decréscimo na FC e, conseqüente, aumento da maciez da carne. A relação dessa proteína com a maciez já foi amplamente discutida anteriormente, no entanto, a correlação evidencia o potencial biomarcador desta proteína para os atributos de qualidade da carne.

Em outra proteína metabólica, a MDH1, foi possível observar correlação alta positiva com o pH_f ($r = 0,7916$), e correlações moderadas negativa ($r = -0,6580$) com L* e positiva ($r = 0,6603$) com a*. Como já citado anteriormente, a MDH1 tem o aumento de expressão ainda antes do abate, contribuindo para a redução nas concentrações de lactato e de íons de H⁺, ocasionando o aumento no pH_f da carne.

No início do *post mortem* as mitocôndrias mantêm a atividade metabólica consumindo o oxigênio residual, reduzindo a MetMb a Mb mioglobina (MOHAN et al. 2010)

Gagaoua et al. (2015) correlacionaram a MDH1 positivamente com a^* e mais recentemente Gagaoua; Terlouw; Picard (2017) relataram a correlação negativa desta proteína com L^* , corroborando com os resultados observados no presente estudo. Lanari; Cassens (1991) e Renerre (1984) sugeriram que a atividade enzimática é o principal fator na estabilidade da cor da carne. A atividade da MDH1 no músculo durante o *post mortem* é dependente do pH, à medida que o valor do pH é elevado a atividade enzimática da MDH1 é otimizada e a concentração de NADH é elevado no músculo, resultando na redução de MetMb a Mb, aumentando os valores de a^* (MOHAN et al., 2010).

A proteína antioxidante PARK7 correlacionou-se de forma moderada e negativa com o pH_i ($r = -0,5716$) e com a^* ($r = -0,5935$), indicando que a maior expressão dessa proteína está relacionada com a redução no pH_i e na intensidade de vermelho. A PARK7 possui a capacidade de oxidar e de se translocar para as mitocôndrias em resposta ao estresse oxidativo, atuando na proteção e limitando a fragmentação mitocondrial (SAYD et al., 2006; THOMAS et al., 2011), dessa maneira ela impede a rápida taxa de declínio do pH durante o *post mortem*. Gagaoua et al. (2017) relataram a correlação negativa desta proteína com a^* , corroborando com os resultados observados no presente estudo.

Os resultados obtidos através das correlações das proteínas permitem inferir que as proteínas TPI1, PKM2, MDH1 e PARK7, são potenciais biomarcadores dos mecanismos de determinação do pH_i e na atuação deste sobre os atributos da qualidade de carne.

5.3.2. Western blotting

Os resultados obtidos pela análise *GeLC-MC/MC* foram validados através da técnica de *western blotting*, para tanto foram selecionadas duas proteínas a TPI1 e a HSPB1 (Figura 1).

Figura 1 - Níveis de expressão das proteínas triosefosfato isomerase (TPI) e pequena proteína do choque térmico 27 (HSPB1) no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, em função dos distintos grupos de pH_f, normal e intermediário, e tempos de maturação 1 e 14 dias, com base em análise *western blotting*.

A) Membranas reveladas para as proteínas de interesse: triosefosfato isomerase (TPI) e pequena proteína do choque térmico 27 (HSPB1), e normalizador gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). **B)** Nível de expressão da proteína triosefosfato isomerase (TPI). **C)** Nível de expressão da pequena proteína do choque térmico 27 (HSPB1). pH_fN: pH final normal; pH_fI: pH final intermediário; *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de pH_f dentro de cada tempo de maturação.

A TPI apresentou um menor nível de expressão significativa ($p < 0,05$) em pH_f intermediário em ambos os tempos de maturação, 1 e 14 dias. Na HSPB1 só foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) em 1 dia de maturação sendo o pH_f normal com maior expressão. Os resultados obtidos permitem a validação dos dados observados pela análise de espectrometria de massas, fortalecendo as descobertas do presente estudo.

5.3.3. Enriquecimento Funcional

A análise de enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente expressas possui a finalidade de aprofundar o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos em determinado fenótipo. Foram enriquecidos 80 termos ontológicos (Apêndice B) ($FDR < 0,05$), sendo 18 e 61 termos para as categorias componente celular (CC) e processo biológico (PB), respectivamente, e um para a categoria função molecular (FM). Os termos das categorias CC e PB foram submetidos a análise pelo *software* REVIGO que permitiu resumir os termos através do agrupamento dos redundantes.

O REVIGO permitiu agrupar em 10 termos a categoria CC (Tabela 11) onde é possível observar a participação de 9 proteínas das 13 que foram identificadas como diferencialmente expressas, sendo 3 com função metabólica (MDH1, AK1 e TPI1), 2 proteínas de função estrutural (CFL2 e TPM2) e as 4 proteínas com função de defesa ao estresse (CRYAB, PRDX1, HSPB1 e PARK7).

As proteínas MDH1, CFL2 e CRYAB foram as mais presentes dentro os CC, evidenciando a importância da interação entre as funções exercidas pelas proteínas na determinação da qualidade da carne.

Tabela 11 - Componentes celulares significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.

ID ¹	Descrição	N ²	FDR ³	Log10 P-ajust ⁴	Genes ⁵
GO:0043209	Bainha de mielina	3	0,0023	-2,6383	CRYAB, PRDX1, MDH1
GO:0031674	Banda I	2	0,0219	-1,6596	CFL2, CRYAB
GO:0005856	Citoesqueleto	4	0,0219	-1,6596	MDH1, TPM2, CFL2, HSPB1
GO:0043292	Fibra contrátil	2	0,0479	-1,3197	CRYAB, CFL2
GO:0044421	Parte da região extracelular	7	0,0002	-3,6990	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
GO:0005576	Região extracelular	7	0,0007	-3,1549	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
GO:0065010	Restrito a membrana de organela extracelular	7	0,0001	-4,0000	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
GO:0043228	Restrito a organela não membranária	6	0,0032	-2,4949	MDH1, TPM2, CRYAB, PARK7, CFL2, HSPB1
GO:0043232	Restrito a organela não membranária intracelular	6	0,0032	-2,4949	MDH1, TPM2, CRYAB, PARK7, CFL2, HSPB1
GO:0031982	Vesícula	7	0,0002	-3,6990	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1

¹Identificação do termo *Gene Ontology*; ²N: número de genes identificados por termo; ³FDR: *False Discovery Rate*, valor do P ajustado com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995); ⁴Log10 do P ajustado; ⁵Genes correspondentes as proteínas (CRYAB: αβ-cristalina; PRDX1: peroxirredoxina 1; MDH1: malato desidrogenase; CFL2: cofilina 2; TPM2: tropomiosina cadeia beta; HSPB1: proteína do choque térmico 27; PARK7: proteína deglicase DJ-1; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; TPI1: Triosefosfato isomerase).

A distribuição (Figura 2) revela que os CC parte da região extracelular (GO:0044421), região extracelular (GO:0005576), restrito a membrana de organela extracelular (GO:0043228) e vesícula (GO:0031982) foram as mais frequentes (13,73%). A ontologia gênica do componente celular de um proteoma permite investigar a localização na qual a proteína irá agir e por consequência a ação desta. Zuo et al. (2016) verificaram frequência de 15,75% do CC região extracelular

(GO:0005576) no proteoma do músculo de bovinos, reforçando a importância dos resultados observados.

Figura 2 - Distribuição dos componentes celulares significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.

¹Identificação do termo *Gene Ontology* correspondentes as seguintes descrições: GO:004320 = bainha de mielina; GO:0031674 = banda I; GO:0005856 = citoesqueleto; GO:0043292 = fibra contrátil; GO:0044421 = parte da região extracelular; GO:0005576 = região extracelular; GO:0065010 = restrito a membrana de organela extracelular; GO:0043228 = restrito a organela não membranária; GO:0043232 = restrito a organela não membranária intracelular; GO:0031982 = vesícula.

Fonte: Própria autoria.

Foi observado apenas um termo para FM enriquecido (FDR<0,05), a atividade da peroxirredoxina (GO:0051920), a qual envolve duas proteínas a PARK7 e a PRDX1, ambas com função de defesa em resposta ao estresse. A maior expressão dessas proteínas foi observada em pH_f normal no tempo 1 de maturação, os resultados obtidos nos levam a inferir sobre efetiva ação de proteção dessas proteínas no músculo e evidencia a PARK7 como um potencial biomarcador dos atributos da qualidade da carne.

A análise de agrupamento pelo REVIGO para a categoria PB permitiu a redução de 61 para 27 (Figura 3, descritos no apêndice C) termos enriquecidos funcionalmente (FDR<0,05). As proteínas PKM2, TNNI2, TNNC2, CFL2, TPM2 e HSPB1 não estavam presentes em nenhum dos PB significativos.

Figura 3 - Processos biológicos significativos ($FDR < 0,05$) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.

Fonte: Própria autoria.

Os dez PB com os menores valores de FDR, mais significativos, estão descritos na tabela 12. Proteínas com duas funções distintas, metabólica (TPI1, PGAM1, AK1 e MDH1) e de defesa em resposta ao estresse (CRYAB, PARK7, PRDX1), estão presentes entre os PB mais significativos.

Tabela 12 – Dez processos biológicos significativos (FDR<0,05) com menores valores de FDR das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_f intermediário e pH_f normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.

ID ¹	Descrição	N ²	FDR ³	Log10 P-ajust ⁴	Genes ⁵
GO:0044712	Catabolismo de organismo único	4	0,0097	-2,013	PRDX1, PGAM2, PARK7, TPI1
GO:0046939	Fosforilação de nucleotídeos	3	0,0008	-3,097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0009132	Metabolismo de difosfato nucleosídeos	3	0,0008	-3,097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0044281	Metabolismo de pequenas moléculas	5	0,0097	-2,013	MDH1, PGAM2, PARK7, AK1, TPI1
GO:0009141	Metabolismo de trifosfato nucleosídeos	3	0,0099	-2,004	AK1, PGAM2, TPI1
GO:0046031	Metabolismo do ADP	3	0,0008	-3,097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0042743	Metabolismo do peróxido de hidrogênio	2	0,0097	-2,013	PARK7, PRDX1
GO:0000302	Resposta a espécies reativas de oxigênio	3	0,0008	-3,097	PRDX1, PARK7, CRYAB
GO:0010035	Resposta a substância inorgânica	3	0,0097	-2,013	CRYAB, PRDX1, PARK7
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	3	0,0097	-2,013	CRYAB, PRDX1, PARK7

¹Identificação do termo *Gene Ontology*; ² N: Número de genes identificados por termos; ³FDR: *False Discovery Rate*, valor do P ajustado com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995); ⁴Log10 do P ajustado; ⁵Genes correspondentes as proteínas (TPI1: Triosefosfato isomerase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PRDX1: peroxirredoxina 1; PARK7: proteína deglicase DJ-1; MDH1: malato desidrogenase; CRYAB: αβ-cristalina).

Proteínas com função metabólica e de defesa estão presentes nos processos biológicos catabolismo de organismo único (GO:0044712), fosforilação de nucleotídeos (GO:0046939), metabolismo de difosfato nucleosídeos (GO:0009132), metabolismo de pequenas moléculas (GO:0044281), metabolismo de trifosfato nucleosídeos (GO:0009141) e metabolismo do ADP (GO:0046031), que são diretamente relacionados a processo de geração de energia. A determinação do pH_f no músculo em bovinos está em função das reservas de ATP no músculo, a hidrólise deste pela enzima ATPase liberam íons de H⁺ que permitem o declínio do pH no *post mortem* (ENGLAND et al., 2015). A descoberta do envolvimento dessas proteínas na determinação do pH_f é de grande relevância para inferir sobre os biomarcadores para a qualidade da carne.

A atividade combinada de proteínas relacionadas somente à defesa ao estresse (PRDX1, PARK7 e CRYAB) é verificada nos seguintes processos biológicos: metabolismo do peróxido de hidrogênio (GO:0042743), resposta a espécies reativas de oxigênio (GO:0000302), resposta a substância inorgânica (GO:0010035) e reposta

ao estresse oxidativo (GO:0006979), o que vem a fortalecer os resultados já relatados anteriormente.

Foram observadas cinco vias metabólicas (Tabela 13) enriquecidas funcionalmente (FDR<0,05), incluindo o metabolismo do carbono (bta01200), a glicólise/gliconeogênese (bta00010) e o metabolismo de piruvato (bta00620). A presença dessas vias metabólicas já foi relatada anteriormente por Moncau (2017) e Zuo et al. (2016), relacionadas ao estudo proteômico da qualidade da carne para perfis de maciez e capacidade de retenção de água, respectivamente, corroborando com as descobertas observadas nesse estudo.

Tabela 13 – Vias metabólicas significativas (FDR<0,05) enriquecida funcionalmente pelo *String* v.10.5, das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

ID ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
bta01200	Metabolismo do carbono	4	>0,0001	0,0001	PGAM2, PKM, TPI1, MDH1
bta01120	Metabolismo microbiano em diversos ambientes	4	>0,0001	0,0003	PGAM2, PKM, TPI1, MDH1
bta00010	Glicólise/Gliconeogênese	3	>0,0001	0,0006	PGAM2, PKM, TPI1
bta01230	Biossíntese de aminoácidos	3	>0,0001	0,0008	PGAM2, PKM, TPI1
bta00620	Metabolismo do piruvato	2	0,0003	0,0162	PKM, MDH1
bta01100	Vias metabólicas	5	0,0006	0,0271	PGAM2, PKM, TPI1, MDH1, AK1

¹Identificação do termo *Gene Ontology*; ² N: Número de genes identificados por termos; ³FDR: *False Discovery Rate*, valor do P ajustado com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995); ⁴Genes correspondentes as proteínas (PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PKM: piruvato quinase; TPI1: Triosefosfato isomerase; MDH1: malato desidrogenase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1).

Dentre as vias metabólicas, a mais significativa foi a do carbono (Figura 4), que está relacionada com o processo biológico (Tabela 12) catabolismo de organismo único (GO:0044712), que por sua vez é responsável pela liberação de energia através da quebra de compostos, incluindo o carbono. A geração de energia é regulada pela via metabólica da glicólise/gliconeogênese (bta00010), a glicólise é a conversão bioquímica intracelular de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato com geração simultânea de duas moléculas de ATP (TESLAA; TEITELL, 2014), na qual as proteínas TPI1, PGAM2 e PKM estão envolvidas.

Fonte: Própria autoria.

As proteínas integram os complexos proteicos de forma que a ação destas não possui eficácia de forma independente, a rede de interações entre proteínas é um instrumento que permite a visualização da presença ou não de associação entre as proteínas possibilitando a identificação e validação de biomarcadores. Na rede de interações entre as proteínas diferencialmente expressas (Figura 5), em função da razão entre o pH_i intermediário e o pH_i normal, a interação entre todas as proteínas identificadas encontra-se no apêndice D, observa-se que algumas proteínas atuam

como principais entre as ligações de interação biológica, como a CFL2, a TPI1 e a PRDX1.

Figura 5 - Rede de interação das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

Os nódulos representam proteínas do banco de dados de *Bos taurus* e as linhas as associações entre proteínas. TPI1: Triosefosfato isomerase; PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PKM: piruvato quinase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; MDH1: malato desidrogenase; TNNI2: troponina I tipo 1; TNNC2: troponina C tipo 2; CFL2: cofilina 2; TPM2: tropomiosina cadeia beta; CRYAB: $\alpha\beta$ -cristalina; HSPB1: proteína do choque térmico 27; PARK7: proteína deglicase DJ-1; PRDX1: peroxirredoxina 1.

Fonte: Própria autoria.

É possível observar um grupo de proteínas relacionadas a estrutura celular (TNNC2, TNNI2, TPM2 e CFL2) que se ligam as proteínas metabólicas (AK1, PKM2, PGAM2, MDH1 e PKM2) através da TPI1, que também estabelece ligação com as proteínas antioxidativas PARK7 e PRDX1. Essas também compõem processos biológicos e vias metabólicas responsáveis pela produção de energia, juntamente com a PGAM2, MDH1 e PKM2. Duas proteínas exclusivamente ligadas a defesa a respostas ao estresse, a HSPB1 e a CRYAB, mantivera-se ligadas entre si, mas isoladas das demais.

Os resultados obtidos através do enriquecimento funcional evidenciam as observações encontradas entre as proteínas diferencialmente expressas e os atributos de qualidade de carne, revelando a atuação dessas proteínas na

determinação do pH_f e sua influência sobre a qualidade da carne, permitindo-se inferir que as proteínas TP1, PKM2, MDH1 e PARK7 são potenciais biomarcadores.

6. CONCLUSÕES

É possível concluir que o pH_f altera de maneira significativa os atributos cor e maciez da carne, evidenciando a importância deste na determinação da qualidade da carne durante o *post mortem*. As concentrações de HSP27 foram distintas em função do pH_f e do tempo de maturação. A correlação da HSP27 e HSP70 com os atributos de qualidade carne indica que essas HSPs estão envolvidas no processo de amaciamento da carne.

Foram identificadas treze proteínas diferencialmente expressas exercendo funções metabólica, estrutural e de defesa ao estresse.

A proteína malato desidrogenase, esteve associada a mecanismos de produção de energia, confirmando o potencial desta como um biomarcador para a determinação do pH_f assim como para a cor da carne, enquanto que a triosefosfato isomerase, enzima metabólica, e tropomiosina cadeia beta, proteína estrutural, foram relacionadas somente no estabelecimento do pH_f. Outras proteínas como, piruvato quinase, com função metabólica, e a proteína deglicase DJ-1, com função protetora, foram associadas aos atributos maciez e cor da carne, respectivamente.

Os resultados obtidos são de grande relevância no âmbito das ciências da carne e do melhoramento genético animal, por permitir a identificação de possíveis biomarcadores que poderão ser utilizados na seleção animal.

7. REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da pecuária no Brasil: Relatório anual 2016**. Disponível em:

<<http://www.abiec.com.br/Sumario.aspx>>. Acesso em: 02 set. 2017.

ABRIL, M.; CAMPO, M. M.; ONENÇ, A.; SANUDO, C.; ALBERTI, P.; NEGUERUELA, A. I. Beef colour evolution as a function of ultimate pH. **Meat Science**, v.58, p.69-78, 2001.

ADZITEY, F.; NURUL, H. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences – a mini review. **International Food Research Journal**, v.18, p.11-20, 2011.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass – spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v.537, p. 347-355, 2016.

ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHITE, M.; CECILIANI, F.; CRISTOBAL, S.; ECKERSALL, P. D.; HOLLUNG, K.; LISACEK, F.; MAZZUCHELLI, G.; McLAUGHLIN, M.; MILLER, I.; NALLY, J. E.; PLOWMAN, J.; RENAUT, J.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P.; STARIC, J.; TURK, R. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. **Animal**, v.9, p.1-17, 2015.

ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.135-149, 2005.

AMSA. American Meat Science Association. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat**. Champaign, p.1-33, 1995.

ANDRÉS, S.; SILVA, A.; SOARES-PEREIRA, A. L.; MARTINS, C.; BRUNO-SOARES, A. M.; MURRAY, I. The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef *M. longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. **Meat Science**, v.78, p.217–224, 2008.

ANDRIGHETTO, C.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O.; SARTORI, D. R.; RODRIGUES, E.; BIANCHINI, W. Maturação da carne bovina. **Revista Electrónica de Veterinária REDVET**, v.7, p.1-6, 2006.

ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, v.10, p.3566-3576, 2010.

AROEIRA, C. N.; TORRES FILHO, A.; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; GOMIDE, L. A. M.; LADEIRA, M. M.; RAMOS, E. M. Effect of freezing prior to aging on myoglobin redox forms and CIE color of beef from Nellore and Aberdeen Angus cattle. **Meat Science**, v.125, p.16-21, 2017.

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

BALDASSINI, W. A.; BRAGA, C. P.; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. V.; MALHEIROS, J. M.; ALBUQUERQUE, L. G.; FERNANDES, T. T.; PADILHA, P. M. Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*). **Food Chemistry**, v.169, p.65-72, 2015.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, v.71, p.138-149, 2005.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v.57, p.289-300, 1995.

BOWKER, B. C.; BOTREL, C.; SWARTZ, D. R.; GRANT, A. L.; GERRARD, D. E. Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers. **Meat Science**, v.68, p.587-594, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROPHY, C. M.; LAMB, S.; GRAHAM, A. The small heat shock-related protein-20 is an actin-associated protein. **Journal of Vascular Surgery**, v.29, p.326-333, 1999.

CAMON, E.; MAGRANE, M.; BARREL, D.; LEE, V.; DIMMER, E.; MASLEN, E.; BINNS, D.; HARTE, N.; LOPEZ, R.; APWEILLER, R. The gene ontology annotation (GOA) database: sharing knowledge in uniprot with gene ontology. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.D262-D266, 2004.

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

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top down proteomics: facts and perspectives. **Biochemical and biophysical Research Communications**, v.445, p.683-693, 2014.

CIE. **Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms**. Commission Internationale de l'Éclairage, Paris. Sup. 2 to CIE Publication n. 15 (E – 1 1.3.1) 1978, 1971/(TC – 1 – 1), 1976.

CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; LOMIWES, D.; WU, G.; FROST, D.; FAROUK, M. M. The effect of electrical stimulation on post mortem myofibrillar protein degradation

and small heat shock protein kinetics in bull beef. **Meat Science**, v.113, p.65-72, 2016.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.450, p.991–1000, 2007.

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

ECKERSALL, P. D.; ALMEIDA, A. M. Proteomics, a new tool for farm animal science. **Journal of Proteomics**, v.72, p.4187-4189, 2012.

EMIDIO, N. B.; CARPANEZ, A. G.; QUELLIS, L. R.; FARANI, P. S.; VASCONCELOS, E. G.; FARIA-PINTO, P. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v.41, p.101-111, 2015.

ENGLAND, E. M.; MATARNEH, S. K.; SCHEFFER, T. L.; WATCHET, C.; GERRARD, D. E. Altered AMP deaminase activity may extend post-mortem glycolysis. **Meat Science**, v.102, p.8-14, 2015.

ENGLAND, E. M.; MATARNEH, S. K.; SCHEFFER, T. L.; WATCHET, C.; GERRARD, D. E. pH inactivation of phosphofructokinase arrests post-mortem glycolysis. **Meat Science**, v.98, p.850-857, 2014.

ENGLISH, A. R.; WILLS, K. M.; HARSH, B. N.; MAFI, G. G.; VANOVERBEKE, D. L.; RAMANATHAN, R. Effects of aging on the fundamental color chemistry of dark-cutting beef. **Journal of Animal Science**, v.94, p.4040-4048, 2016.

FAROUK, M. M.; BEGGAN, M.; HURST, S.; STUART, A.; DOBBIE, P. M.; BEKHIT, A. E. D. Meat quality attributes of chilled venison and beef. **Journal of Food Quality**, v.30, p.1023-1039, 2007.

FINK, S.; MÖMKE, S.; WÖHLKE, A.; DISTL, O. Genes on bovine chromosome 18 associated with bilateral convergent strabismus with exophthalmos in German Brown cattle. **Molecular Vision**, v.14, p.1737-1751, 2008.

FRANCO, D.; MATO, A.; SALGADO, F. J.; LÓPEZ-PEDROUSO, M.; CARRERA, M.; BRAVO, S.; PARRADO, M.; GALLARDO, J. M.; ZAPATA, C. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. **Journal of Proteomics**, v.122, p.73-85, 2015.

GAGAOUA, M.; TERLOUW, E. M.; MICOL, D.; BOUDJELLAL, A.; HOCQUETTE, J-F.; PICARD, B. Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the *Longissimus thoracis* muscle of young blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.6799-6809, 2015.

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

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C.; ZERMATI, Y.; SCHIMITT, E.; KROEMER, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, v.5, p.2592-2601, 2006.

GEMPERLINE, E.; KELLER, C.; LI, L. Mass spectrometry in plant-omics. **Analytical Chemistry**, v.88, p.3422-3434, 2016.

GINGRAS, A. C.; GSTAIGER, M.; RAUGHT, B.; AEBERSOLD, R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.645–654, 2007.

GOLL, D. E.; NETI, G.; MARES, S. W.; THOMPSON, V. F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. **Journal Animal Science**, v.86, p.19-35, 2008.

GURSANSKY, B.; O'HALLORAN, J. M.; EGAN, A.; DEVINE, C. E. Tenderness enhancement of beef from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle following electrical stimulation. **Meat Science**, v.86, p.635-641, 2010.

HEIN, M. Y.; SHARMA, K.; COX, J.; MANN, M. **Chapter 1- Proteomic Analysis of Cellular Systems**. In: WALHOUT, A. J. M.; VIDAL, M.; DEKKER, J. Handbook of Systems Biology. San Diego: Academic Press, 2013, p.3-25.

HERRERA-MENDEZ, C. H.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; OUALI, A. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. **Trend in Food Science & Technology**, v.17, p.394-405, 2006.

HIGHFILL, C. M.; ESQUIVEL-FONT, O.; DIKEMAN, M. E.; KROPF, D. H. Tenderness profiles of ten muscle from F1 *Bos indicus* x *Bos taurus* and *Bos taurus* cattle cooked as steaks and roast. **Meat Science**, v.90, p.881-886, 2012.

HOLLUNG, K.; VEISETH, E.; JIA, X.; FAERGESTAD, E. M.; HILDRUM, K. L. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, v.77, p.97-104, 2007.

HONIKEL, K. O. Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. **Food Chemistry**, v.59, p.573-582, 1997.

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

HUGHES, J.; OISETH, S. K.; PURSLOW, P. P.; WARNER, R. D. A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. **Meat Science**, v.98, p.520-532, 2014.

HWANG, I. H.; PARK, B. Y.; KIM, J. H.; CHO, S. H.; LEE, J. M. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. **Meat Science**, v.69, p.79-91, 2005.

ISHII, T.; WARABI, E.; YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.50, p.91-105, 2012.

IWANOWSKA, A.; IWANSKA, E.; GRZÉS, B.; MIKOLAJCZAK, B.; POSPIECH, E.; ROSOCHACKI, S.; JUSZCZUK, K.; KUBIAK, E.; LYCZYNSKI, A. Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. **Animal Science Papers and Reports**, v.28, p.13-25, 2010.

JEONG, J. Y.; KWON, S. G.; HWANG, J. H.; PARK, D. H.; BANG, W. Y.; KIM, T. W.; CHO, H. R.; KO, M.; CHO, I.; JOO, Y. K.; JEONG, M.; KIM, S. W.; KIM, C. W. Differential expressions of HSP27 and HSP70 is induced in the longissimus dorsi muscle of fattening pigs fed a fermented carrot by-product. **Journal of Applied Animal Research**, v.42, p.321-326, 2014.

KARAMUCKI, T.; GARDZIELEWSKA, J.; RYBARCZYK, A.; JAKUBOWSKA, M.; NATALCZYK-SZYMKOWSKA. Usefulness of selected methods of colour change measurement for pork quality assessment. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, p.212-218, 2011.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K.; LCKI, J. Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of psoas major and minor and semitendinosus muscle from calves, heifers and cows during post mortem ageing. **Meat Science**, v.64, p.69-75, 2003.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, E. J. O.; DUARTE, M. S.; BENEDETI, P. D. B.; SOUZA, N. K.; COX, R. B. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, v.90, p.770-774, 2012.

LAGE, J. F.; OLIVEIRA, I. M.; PAULINO, P. V. R. Papel do sistema calpaína calpastatina sobre a proteólise muscular e sua relação com a maciez da carne de bovinos de corte. **Revista Eletrônica de Veterinária REDVET**, v.10, p.1-19, 2009.

LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6992-6997, 2003.

LANARI, M.; CASSENS, R. Mitochondrial activity and beef muscle color stability. **Journal of Food Science**, v.56, p.1476-1479, 1991.

LAVILLE, E.; SAYD, T.; MORZEL, M.; BLINET, S.; CHAMBON, C.; LEPETIT, J.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. Proteome change during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging

and tenderization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.10755-10764, 2009.

LEE, M. S.; APPLE, J. K.; YANCEY, J. W.; SAWYER, J. T.; JOHNSON, Z. B. Influence of vacuum-aging period on bloom development of the beef gluteus medius from top sirloin butts. **Meat Science**, v.80, p.592-598, 2008.

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

LOMIWES, D.; FAROUK, M. M.; WU, G.; YOUNG, O. A. The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. **Meat Science**, v.96, p.646-651, 2014a.

LOMIWES, D.; FAROUK, M. M.; WIKLUND, E.; YOUNG, O. A. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. **Meat Science**, v.96, p.26-40, 2014b.

LUCKETT, R. L.; BIDNER, T. D.; ICAZA, E. A.; TURNER, J. W. Tenderness studies in straightbred and crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v.40, p.468-475, 1975.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D.; GERSTEIN, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. **Methods of Information in Medicine**, v.40, p.346-358, 2001.

MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAY, M. Determinants of meat quality: Tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.337-347, 2003.

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

MANCINI, R. A.; RAMANATHAN, R. Effects of postmortem storage time on color and mitochondria in beef. **Meat Science**, v.98, p.65-70, 2014.

MARINO, R.; ALBENZIO, A.; DELLA MALVA, A.; CAROPRESE, M.; SANTILLO, A.; SEVI, A. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. **Meat Science**, v.98, p.178-186, 2014.

MCKENNA, D. R.; MIES, P. D.; BAIRD, B. E.; PFEIFFER, K. D.; ELLEBRACHT, J. W.; SAVELL, J. W. Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. **Meat Science**, v.70, p.665-682, 2005.

MILLER, M. F.; HOOVER, L. C.; COOK, K. D.; GUERRA, A. L.; HUFFMAN, K. L.; TINNEY, K. S.; RAMSEY, C. B.; BRITTIN, H. C.; HUFFMAN, L. M. Consumer acceptability of beef steak tenderness in the home and restaurant. **Journal of Food Science**, v.60, p.963- 965, 1995.

MINARIK, P.; TOMASKOVA, N.; KOLLAROVA, M.; ANTALIK, M. Malate dehydrogenases – Structure and function. **General Physiology and Biophysics**, v.21, p.257-265, 2002.

MOCZKOWSKA, M.; PÓLTORAK, A.; MONTOWSKA, M.; POSPIECH, E.; WIERZBICKA, A. The effect of the packaging system and storage time on myofibrillar protein degradation and oxidation process in relation to beef tenderness. **Meat Science**, v.130, p.7-15, 2017.

MOHAN, A.; MUTHUKRISHMAN, S.; HUNT, M. C.; BARSTOW, T. J.; HOUSER, T. Kinetics of myoglobin redox form stabilization by malate dehydrogenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6994-7000, 2010.

MONCAU, C. T. **Caracterização da qualidade da carne de bovinos cruzados terminados em confinamento: uma abordagem proteômica**. 2017. 78f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

MOORE, M. C.; GARY, G. D.; HALE, D. S.; KERTH, C. R.; GRIFFIN, D. B.; SAVELL, J. W.; RAINES, C. R.; BELK, K. E.; WOERNER, D. R.; TATUM, J. D.; IGO, J. L.; VANOVERBEKE, D. L.; MAFI, G. G.; LAWRENCE, T. E.; DELMORE, R. J.; CHRISTENSEN, L. M.; SHACKELFORD, S. D.; KING, D. A.; WHEELER, T. L.; MEADOWS, L. R.; O'CONNOR, M. E. National Beef Quality Audit–2011: In-plant survey of targeted carcass characteristics related to quality, quantity, value, and marketing of fed steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v.90, p.5143-5151, 2012.

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

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food Chemistry**, v.112, p.279-289, 2009.

MULLINS, C. R.; ZERBY, H. N.; FITZPATRICK, L. A.; PARKER, A. J. *Bos indicus* cattle possess greater basal concentrations of HSP27, alpha B-crystallin, and HSP70 in skeletal muscle in vivo compared with *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.94, p.424-429, 2016.

NASSU, R. T.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; TULLIO, R. R.; CRUZ, G. M. D.; ALENCAR, M. M. D. Qualidade e perfil sensorial descritivo da carne maturada proveniente de animais cruzados. **Atas de Saúde Ambiental – ASA**, v.1, 13-25, 2014.

NEWTON, K. G.; GILL, C. O. The microbiology of DFD fresh meats: A review. **Meat Science**, v.5, p.223–232, 1981.

OE, M.; OJIMA, K.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K.; SHIBATA, M.; MUROYA, S. Distribution of tropomyosin isoforms in different types of single fibers isolated from bovine skeletal muscle. **Meat Science**, v.118, p.129-132, 2016.

OLIETE, B.; CARBALLO, J. A.; VARELA, A.; MORENO, T.; MONSERRAT, L.; SÁNCHEZ, L. Effect of weaning status and storage time under vacuum upon physical characteristics of meat of the Rubia Gallega breed. **Meat Science**, v.73, p.102-108, 2006.

OLIVEIRA, A. L. Maciez da carne bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.33, p.7-18, 2000.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v.1, p.252–262, 2005.

OUALI, A.; GAGAOUA, M.; BOUDIDA, Y.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; SENTANDREU, M. A. Biomarkers of meat tenderness: presente knowledge and perspectives in regards to our current understading of the mechanisms involed. **Meat Science**, v.95, p.854-870, 2013.

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

PAPALOUKA, V.; ARVANITIS, D. A.; VAFIADAKI, E.; MARVOIDIS, M.; PAPADODIMA, S. A.; SPILIOPULOU, C. A.; KREMASTINOS, D. T.; KRANIAS, E. G.; SANOUDOU, D. Muscle lim protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biology**, v.29, p.6046-6058, 2009.

PAREDI, G.; RABOMI, S.; BENDIXEN, E.; ALMEIDA, A. M.; MOZZARELLI, A. “Muscle to meat” molecular events and technological transformation: The proteomics insight. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4275-4289, 2012.

PEREIRA, A. S. C.; BALDI, F.; SAINZ, R. D.; UTEMBERGUE, B. L.; CHIAIA, H. L. J.; MAGNABOSCO, C. U.; MANICARD, F. R.; ARAUJO, F. R. C.; GUEDES, C. F.; MARGARIDO, R. C.; LEME, P. R.; SOBRAL, P. J. A. Growth performance, and carcass and meat quality traits in progeny of Poll Nellore, Angus and Brahman sires under tropical conditions. **Animal Production Science**, v.55, p.1295-1302, 2015.

PICARD, B.; CASSAR-MALEK, I. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscle of Blonde d'Aquitaine bulls. **Meat Science**, v.82, p.30-36, 2009.

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

POLETI, M. D.; MONCAU, C. T.; SILVA, B.; ROSA, A. F.; SILVA, S. L.; BALIEIRO, J. C. C. A incidência de carne DFD (*dark, firm and dry*) e seu impacto nas

características de qualidade da carne. In: I Simpósio de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 1., 2012, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FZEA, 2009.

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

PULFORD, D. J.; DOBBIE, P.; FRAGA VASQUEZ, S.; FRASER-SMITH, E.; FROST, D. A.; MORRIS, C. A. Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. **Meat Science**, v.83, p.1-9, 2009.

PURCHAS, R. W.; AUNGSUPAKORN, R. Further Investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. **Meat Science**, v.34, p.163–178, 1993.

REMBOLD, C. M.; FOSTER, D. B.; STRAUSS, J. D.; WINGARD, C. J.; VAN EYK, J. E. cGMP-mediated phosphorylation of heat shock protein 20 may cause smooth muscle relaxation without myosin light chain dephosphorylation in swine carotid artery. **The Journal of Physiology**, v.524, p.865–878, 2000.

RENERRE, M. Variabilité entre muscles et entre animaux de la stabilité de la couleur des viandes bovines. **Sciences des Aliments**, v.4, p.567-584, 1984.

RENERRE, M.; LABAS, R. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. **Meat Science**, v.19, p.151-165, 1987.

RIOS-MERA, J. D.; PINTO, J. S. S.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Effect of ultimate pH and ageing thermal denaturation of bovine muscle. **Meat Science**, v.131, p.25-27, 2017.

ROÇA, R. O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, FCA, UNESP, 2000, 201p.

ROÇA, R. O.; PADOVANI, C. R.; FILIPI, M. C.; SCHWACH, E.; UEMI, A.; SHINKAI, R. T.; BIONDI, G. F. Efeitos dos métodos de abate de bovinos na eficiência da sangria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.244-248, 2001.

RODRIGUES, R. T. S.; CHIZZOTTI, M. L.; VITAL, C. E.; BARACT-PEREIRA, C.; BARROS, E.; BUSATO, K. C.; GOMES, R. A.; LADEIRA, M. M.; MARTINS, T. S. Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **Plos One**, v.12, p.1-21, 2017.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZI, L. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, v.75, p.4259-4274, 2012.

ROSA, A. F.; VENTURA, R. V.; OLIVEIRA JUNIOR, G. A.; PEREZ, B. C.; MATTOS, E. C.; CARVALHO, M. E.; BONIN, M.; REZENDE, F. M.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. E. Can genetics be associated with the high frequency of dark, firm and dry meat in Brazilian Nellore beef cattle?. In: 63rd International Congress of Meat Science and Technology, 63., 2017, Cork, Ireland. **Proceedings...** Cork: Wageningen Academic Publishers, p73-74, 2017.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v.40, p.727-734, 2010.

SASAKI, N.; NAKAMURA, M.; SOETA, S. Molecular analysis of cytosolic and mitochondrial malate dehydrogenases isolated from domestic cats (*Felis catus*). **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.6855-6864, 2014.

SAVELL, J.; SHACKELFORD, S. D. Significance of tenderness to the meat industry. In: 45th Reciprocal Meat Conference, 45., 1992, Collins. **Proceedings...** Collins: Colorado State University, p.43-46, 1992.

SAYD, T.; MORZEL, M.; CHAMBON, C.; FRANCK, M.; FIGWER, P.; LARZUL, C.; LE ROY, P.; MONIN, G.; CHÉREL, P.; LAVILLE, E. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: Implications on meat color development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2732–2737, 2006.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v.81, p.1810-1816, 2001.

SEIDMAN, S. C.; CROSS, H. R.; SMITH, G.C.; DURLAND, P. R. Factors associated with fresh meat color: A review. **Journal of Food Quality**, v.6, p.211-237, 1984.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, p.2856-2860, 2006.

SOJI, Z.; MUCHENJE, V. Effect of genotype and age on some carcass and meat quality traits of beef carcasses subjected to the South African classification system. **Meat Science**, v.117, p.205-211, 2016.

SOTI, C.; SREEDHAR, A. S.; CSERMELY, P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: Chaperone occupancy as a potential switch. **Aging Cell**, v.2, p.39-45, 2003.

SUN, Y.; MACRAE, T. H. The small heat shock proteins and their role in human disease. **The FEBS Journal**, v.272, p.2623-2627, 2005.

SWATLAND, H. J.; IRVING, T. C.; MILLMAN, B. M. Fluid distribution in pork, measured by X-ray diffraction, interference microscopy and centrifugation compared to paleness measured by fiber optics. **Journal of Animal Science**, v.67, p.1465-1470, 1989.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v.45, p.D362-D368, 2017.

TANG, J.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T. A.; MANCINI, R. A.; SEYFERT, M.; HUNT, M. C. Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1223-1230, 2005.

TESLAA, T.; TEITELL, M. A. Techniques to monitor glycolysis. **Methods in Enzymology**, v.542, p.91-114, 2014.

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

TROY, D. J.; KERRY, J. P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. **Meat Science**, v. 86, p.214–226, 2010.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, p.193-197, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and poultry: world markets and trade, October, 2017**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

VOLPELLI, L. A.; FAILLA, S.; SEPULCRI, A.; PIASENTIER, E. Calpain system in vitro activity and myofibrillar fragmentation index, in fallow deer (*Dama dama*) effects of age and supplementation. **Meat Science**. v.69, p. 579-582, 2005.

WANG, K.; SPECTOR, A. ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein. **European Journal of Biochemistry**, v.268, p-6335-6345, 2001.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHRSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v.14, p.61-65, 1996.

WITZE, E. S.; OLD, W. M.; RESING, K. A.; AHN, N. G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. **Nature Methods**, v.4, p.798–806, 2007.

WU, C. H.; YEH, L. L.; HUANG, H.; ARMINSKI, L.; CASTRO-ALVEAR, J.; CHEN, Y.; HU, Z.; KOURTESIS, P.; LEDLEY, R. S.; SUZEK, B. E.; VINSYSKS, C. R.; ZHANG,

J.; BARKER, W. C. The protein information resource. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.345-34, 2003.

WU, G.; FAROUK, M. M.; CLERENS, S.; ROSENVOLD, K. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. **Meat Science**, v.98, p.637-645, 2014.

WU, W.; GAO, X-G.; DAI, Y.; FU, Y.; LI, X-M.; DAI, R-T. Post-mortem changes in sarcoplasmic proteome and its relationship to meat color traits in *M. semitendinosus* of Chinese *Luxi* yellow cattle. **Food Research International**, v.752, p.98-105, 2015.

YANCEY, J. W. S.; APPLE, J. K.; MEULLENET, J. F.; SAWYER, J. T. Consumer responses for tenderness and overall impression can be predicted by visible and near-infrared spectroscopy, Meullenet-Owens razor shear, and Warner-Bratzler shear force. **Meat Science**, v.85, p.487-492, 2010.

YOUNG, O. A.; WEST, J.; HART, A. L.; VAN OTTERDIJK, F. F. H. A method for early determination of meat ultimate pH. **Meat Science**, v.66, p.493-498, 2004.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M-C.; YATES, J. R.; Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v.113, p.2343-2394, 2013.

ZUO, H.; HAN, L.; YU, Q.; NIU, K.; ZHAO, S.; SHI, H. Proteome changes on water-holding capacity of yak longissimus lumborum during postmortem aging. **Meat Science**, v.121, p.409-419, 2016.

8. APÊNDICES

Apêndice A - Proteínas totais identificadas por análise *GeLC-MC/MC* em função da relação entre o pH_f intermediário pH_f normal durante a maturação, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

(continua...)

Nome da proteína	Gene	PM ¹ (kDa)	ID <i>Uniprot</i> ²	N. Pept. Unic. ³ % Cob. ⁴
14 kDa phosphohistidine phosphatase	PHPT1	14	Q32PA4	2/28
14-3-3 protein gamma	YWHAG	28	P68252	2/9.72
Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	85	P20004	2/5.51
Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	42	P68138	27/80.6
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	42	P60712	2/30.1
Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	22	P00570	8/47.4
ADP/ATP translocase 1	SLC25A4	33	P02722	2/7.05
Alpha-1,4 glucan phosphorylase	PYGM	97	B0JYK6	33/46.1
Alpha-actinin-2	ACTN2	104	Q3ZC55	20/30.5
Alpha-actinin-3	ACTN3	103	Q0III9	15/26.9
Alpha-crystallin B chain	CRYAB	20	P02510	10/56.6
Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	GOT1	46	P33097	2/9.44
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	60	P19483	4/11.4
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	56	P00829	9/28.4
ATP synthase subunit e, mitochondrial	ATP5I	8	Q00361	2/32.4
ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5J2	10	Q28851	2/27.3
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	23	P13621	2/13.1
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM	85	Q0IIG5	5/8.86
Beta-enolase	ENO3	47	Q3ZC09	23/53
Calsequestrin	CASQ1	45	Q05JF3	15/38
Carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial	CPS1	165	F1ML89	2/1.73
Carbonic anhydrase 3	CA3	29	Q3SZX4	15/60
Cofilin-2	CFL2	19	Q148F1	2/18.7
Creatine kinase M-type	CKM	43	Q9XSC6	18/55.1
Creatine kinase S-type, mitochondrial	CKMT2	47	Q3ZBP1	4/16.9
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	COX5B	14	P00428	3/18.6

Apêndice A - Proteínas totais identificadas por análise *GeLC-MC/MC* em função da relação entre o pH_f intermediário pH_f normal durante a maturação, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

(continuação...)

Nome da proteína	Gene	PM ¹ (kDa)	ID <i>Unipro</i> ²	N. Pept. Unic. ³ / % Cob. ⁴
<i>Cytochrome c oxidase subunit</i> NDUFA4	NDUFA4	9	Q01321	3/36.6
<i>Desmin</i>	DES	54	O62654	4/16.2
<i>Filamin C, gamma</i>	FLNC	291	E1BE25	6/3.64
<i>Four and a half LIM domains 1 (FHL1)</i>	FHL1	34	F1MR86	7/29.7
<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	ALDOA	39	A6QLL8	16/66.5
<i>Galectin-1</i>	LGALS1	15	P11116	3/23.7
<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	GPI	63	Q3ZBD7	8/21.9
<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>	GSTM1	26	Q9N0V4	2/13.8
<i>Glutathione S-transferase P</i>	GSTP1	24	P28801	3/24.3
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	36	P10096	15/54.1
<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	HSPA1B	70	Q27965	5/11.4
<i>Heat shock protein</i>	HSPB6	17	A0A0U2YDA7	4/47.6
<i>Heat shock protein beta-1</i>	HSPB1	22	Q3T149	10/60.7
<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	HBA	15	P01966	8/68.3
<i>Hemoglobin subunit beta</i>	HBB	16	P02070	12/82.1
<i>Histone H2A type 2-C</i>	HIST2H2AC	14	A1A4R1	3/27.1
<i>Histone H2B type 1</i>	H2B	14	P62808	3/27.8
<i>Histone H4</i>	H4	11	P62803	3/29.1
<i>Isoform 2 of PDZ and LIM domain protein 7</i>	PDLIM7	24	Q3SX40-2	3/14
<i>Isoform 2 of Troponin T, slow skeletal muscle</i>	TNNT1	30	Q8MKH6-2	3/19.8
<i>Keratin 1</i>	KRT1	63	G3N0V2	3/5.45
<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	KRT5	63	Q5XQN5	2/3.66
<i>LIM domain binding 3</i>	LDB3	78	G3N3C9	5/7.53
<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	LDHA	37	P19858	14/51.8
<i>M1-type pyruvate kinase (Fragment)</i>	PKM	17	B3IVN4	3/43.6
<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	MDH1	36	Q3T145	4/19.2
<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	MDH2	36	Q32LG3	3/13
<i>Myoglobin</i>	MB	17	P02192	13/59.1

Apêndice A - Proteínas totais identificadas por análise *GeLC-MC/MC* em função da relação entre o pH_f intermediário pH_f normal durante a maturação, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

(continuação...)

Nome da proteína	Gene	PM ¹ (kDa)	ID <i>Uniprot</i> ²	N. Pept. Unic. ³ / % Cob. ⁴
<i>Myomesin 2</i>	MYOM2	165	E1BF23	5/6.2
<i>Myosin binding protein C, fast type</i>	MYBPC2	127	E1BNV1	8/10.7
<i>Myosin binding protein C, slow type</i>	MYBPC1	134	A6QP89	5/6.26
<i>Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform</i>	MYL1	21	A0JNJ5	19/70.3
<i>Myosin light chain 3</i>	MYL3	22	P85100	4/13.1
<i>Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform</i>	MYLPF	19	Q0P571	17/87.1
<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	MYL2	19	F1ME15	10/71.1
<i>Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle</i>	MYL6B	23	Q148H2	7/41.7
<i>Myosin-1</i>	MYH1	223	Q9BE40	100/54.5
<i>Myosin-2</i>	MYH2	223	F1MRC2	22/49.5
<i>Myosin-7</i>	MYH7	223	Q9BE39	2/38.8
<i>Myosin-7</i>	MYH7	223	F1MM07	46/39.8
<i>MYOZ1 protein</i>	MYOZ1	32	Q0IIE1	6/31.7
<i>Nebulin</i>	NEB	802	F1MQI3	11/2.34
<i>PDZ and LIM domain 5</i>	PDLIM5	26	Q3ZBU0	3/12
<i>PDZ and LIM domain protein 3</i>	PDLIM3	34	Q3SYZ8	3/15.2
<i>Peroxiredoxin-1</i>	PRDX1	22	Q5E947	3/15.6
<i>Peroxiredoxin-2</i>	PRDX2	22	Q9BGI3	2/14.1
<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	PEBP1	21	P13696	3/27.8
<i>Phosphoglucomutase-1</i>	PGM1	62	Q08DP0	17/41.1
<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	PGK1	45	Q3T0P6	8/27.3
<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	PGAM2	29	F1N2F2	9/37.9
<i>Polyubiquitin-B</i>	UBB	34	P0CG53	4/15.4
<i>Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2</i>	APOBEC2	26	Q3SYR3	2/12.9
<i>Protein deglycase DJ-1</i>	PARK7	20	Q5E946	3/27.5
<i>Pyruvate kinase</i>	PKM2	58	A5D984	21/49.5

Apêndice A - Proteínas totais identificadas por análise *GeLC-MC/MC* em função da relação entre o pH_f intermediário pH_f normal durante a maturação, no musculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore.

(conclusão)

Nome da proteína	Gene	PM ¹ (kDa)	ID <i>Uniprot</i> ²	N. Pept. Unic. ³ / % Cob. ⁴
<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	ATP2A1	109	Q0VCY0	8/12.1
<i>Serum albumin</i>	ALB	69	P02769	10/22.1
<i>Telethonin</i>	TCAP	19	Q6T8D8	2/13.3
<i>Titin</i>	TTN	3814	F1N757	49/2.32
<i>Triosephosphate isomerase</i>	TPI1	27	Q5E956	14/68.7
<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1	33	Q5KR49	10/25.4
<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	TPM3	33	Q5KR47	2/45.1
<i>Tropomyosin beta chain</i>	TPM2	33	Q5KR48	15/42.6
<i>Troponin C type 2 (Fast)</i>	TNNC2	18	Q148C2	6/48.4
<i>Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles</i>	TNNC1	18	P63315	6/31.1
<i>Troponin I type 1 (skeletal, slow)</i>	TNNI1	22	F8SWQ9	3/16
<i>Troponin I type 2 (skeletal, fast)</i>	TNNI2	23	A5PJM2	4/16
<i>Troponin T fast skeletal muscle type</i>	TNNT3	30	Q8MKH8	7/36

¹PM: peso molecular em kDa; ²ID *UNIPROT*: identificação da proteína no *UNIPROT*; ³N. Pept. Unic.: número de peptídeos únicos; ⁴% Cob.: porcentagem de cobertura.

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

(continua...)

Categoria	ID GO ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
CC	GO:0043292	Fibra contrátil	2	0.0007	0.0479	CRYAB, CFL2
CC	GO:0044449	Parte da fibra contrátil	2	0.0005	0.0394	CRYAB, CFL2
CC	GO:0005856	Citoesqueleto	4	0.0002	0.0219	MDH1, TPM2, CFL2, HSPB1
CC	GO:0070062	Exossomo extracelular	7	0.0000	0.0001	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0065010	Restrito a membrana de organela extracelular	7	0.0000	0.0001	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0043230	Organela extracelular	7	0.0000	0.0001	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0005576	Região extracelular	7	0.0000	0.0007	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0044421	Parte da região extracelular	7	0.0000	0.0002	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0005615	Região extracelular	4	0.0001	0.0066	MDH1, PRDX1, CFL2, TPI1
CC	GO:1903561	Vesícula extracelular	7	0.0000	0.0001	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0031674	Banda I	2	0.0003	0.0219	CRYAB, CFL2
CC	GO:0043232	Restrito a organela não membranária intracelular	6	0.0000	0.0032	MDH1, TPM2, CRYAB, PARK7, CFL2, HSPB1
CC	GO:0031988	Restrito a membrana de vesícula	7	0.0000	0.0002	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0043209	bainha de mielina	3	0.0000	0.0023	MDH1, PRDX1, CRYAB,
CC	GO:0030016	Miofibila	2	0.0007	0.0479	CRYAB, CFL2
CC	GO:0043228	Restrito a organela não membranária	6	0.0000	0.0032	MDH1, TPM2, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
CC	GO:0030017	Sarcômero	2	0.0005	0.0394	CRYAB, CFL2
CC	GO:0031982	Vesícula	7	0.0000	0.0002	MDH1, AK1, PRDX1, CRYAB, PARK7, CFL2, TPI1
MF	GO:0051920	Atividade da peroxiredoxina	2	0.0000	0.0209	PRDX1, PARK7
PB	GO:0046031	Processo metabólico do ADP	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

(continuação...)

Categoria	ID GO ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
PB	GO:0009185	Processo metabólico de difosfato ribonucleosídeos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0009179	Processo metabólico de difosfato de ribonucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0009135	Processo metabólico de difosfato nucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0006165	Fosforilação de difosfato nucleosídeos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0000302	Resposta a espécies reativas de oxigênio	3	0.0000	0.0008	PRDX1, PARK7, CRYAB
PB	GO:0009132	Processo metabólico de difosfato nucleosídeos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0046939	Fosforilação de nucleotídeos	3	0.0000	0.0008	TPI1, AK1, PGAM2
PB	GO:0010035	Resposta a substância inorgânica	3	0.0000	0.0097	PRDX1, PARK7, CRYAB
PB	GO:0044712	Processo catabólico de organismo único	4	0.0000	0.0097	PRDX1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0044281	Processo metabólico de pequenas moléculas	5	0.0000	0.0097	MDH1, PGAM2, PARK7, AK1, TPI1
PB	GO:0046034	Processo metabólico de ATP	3	0.0000	0.0097	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	3	0.0000	0.0097	CRYAB, PRDX1, PARK7
PB	GO:0009205	Processo metabólico de trifosfato de ribonucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0097	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0042743	Processo metabólico do peróxido de hidrogênio	2	0.0000	0.0097	PRDX1, PARK7
PB	GO:0019752	Processo metabólico do ácido carboxílico	4	0.0000	0.0097	MDH1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0009199	Processo metabólico de trifosfato ribonucleosídeos	3	0.0000	0.0097	PGAM2, AK1, TPI1

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_r intermediário e pH_r normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

(continuação...)

Categoria	ID GO ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
PB	GO:0009144	Processo metabólico de trifosfato nucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0097	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009141	Processo metabólico de trifosfato nucleosídeos	3	0.0000	0.0099	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0043436	Processo metabólico oxiácidos	4	0.0000	0.0099	MDH1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0009126	Processo metabólico de monofosfato nucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0099	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009167	Processo metabólico de monofosfato ribonucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0099	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0006082	Processo metabólico do ácido orgânico	4	0.0000	0.0099	MDH1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0009161	Processo metabólico de monofosfato ribonucleosídeos	3	0.0000	0.0106	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009123	Processo metabólico de monofosfato nucleosídeos	3	0.0000	0.0112	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0042542	Resposta ao peróxido de hidrogênio	2	0.0000	0.0140	PARK7, CRYAB
PB	GO:0046128	Processo metabólico de ribonucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	3	0.0000	0.0140	PGAM2, TPI1, MDH1
PB	GO:0042278	Processo metabólico de nucleosídeos purínicos	3	0.0000	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009119	Processo metabólico de ribonucleosídeos	3	0.0000	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009150	Processo metabólico de ribonucleotídeos purínicos	3	0.0000	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0034614	Resposta celular a espécies reativas de oxigênio	2	0.0001	0.0140	PARK7, PRDX1
PB	GO:0009259	Processo metabólico de ribonucleotídeos	3	0.0001	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0009116	Processo metabólico de nucleosídeos	3	0.0001	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0006163	Processo metabólico de nucleotídeos purínicos	3	0.0001	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:1901657	Processo metabólico do composto glicosil	3	0.0001	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

(continuação...)

Categoria	ID GO ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
PB	GO:0019693	Processo metabólico da ribose-fosfato	3	0.0001	0.0140	PGAM2, AK1, TPI1
PB	GO:0006757	ATP geração de ADP	2	0.0001	0.0140	AK1, TPI1
PB	GO:0006096	Processo glicolítico	2	0.0001	0.0140	AK1, TPI1
PB	GO:0006081	Processo metabólico do aldeído celular	2	0.0001	0.0140	PARK7, TPI1
PB	GO:0032787	Processo metabólico do ácido monocarboxílico	3	0.0001	0.0144	PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0044710	Processo metabólico de organismo único	6	0.0001	0.0144	MDH1, AK1, PRDX1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:0032386	Regulação do transporte intracelular	3	0.0001	0.0172	PRDX1, PARK7, CRYAB
PB	GO:0072521	Processo metabólico de composto contendo purina	3	0.0001	0.0192	AK1, PGAM2, TPI1
PB	GO:0080135	Regulação da resposta celular ao estresse	3	0.0001	0.0200	PRDX1, PARK7, MDH1
PB	GO:0006090	Processo metabólico do piruvato	2	0.0001	0.0201	TPI1, PGAM2
PB	GO:0043154	Regulação negativa da atividade da endopeptidase do tipo cisteína envolvida no processo apoptótico	2	0.0001	0.0252	PARK7, CRYAB
PB	GO:0009056	Processo catabólico	4	0.0001	0.0261	PRDX1, PGAM2, PARK7, TPI1
PB	GO:2000117	Regulação negativa da atividade da endopeptidase do tipo cisteína	2	0.0001	0.0261	PARK7, CRYAB
PB	GO:0009117	Processo metabólico de nucleotídeo	3	0.0001	0.0265	AK1, PGAM2, TPI1
PB	GO:0006753	Processo metabólico de fosfato nucleotídeo	3	0.0001	0.0265	AK1, PGAM2, TPI1

Apêndice B – Categorias otológicas gênicas, CC (componente celular), FM (função molecular) e PB (processo biológico), significativas (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_r intermediário e pH_r normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

(conclusão)						
Categoria	ID GO ¹	Descrição	N ²	P-valor	FDR ³	Genes ⁴
PB	GO:0072593	Processo metabólico de espécies reativas a oxigênio	2	0.0001	0.0265	PRDX1, PARK7
PB	GO:0044724	Processo metabólico do carboidrato de organismo único	2	0.0002	0.0341	TPI1, PGAM2
PB	GO:0055086	Processo metabólico de pequenas moléculas contendo nucleobase	3	0.0002	0.0347	AK1, PGAM2, TPI1
PB	GO:0005975	Processo metabólico do carboidrato	3	0.0002	0.0357	PGAM2, TPI1, MDH1
PB	GO:0046496	Processo metabólico do nucleotídeo nicotinamida	2	0.0002	0.0358	TPI1, PGAM2
PB	GO:0019362	Processo metabólico do nucleotídeo piridina	2	0.0002	0.0358	TPI1, PGAM2
PB	GO:0034599	Resposta celular ao estresse oxidativo	2	0.0002	0.0373	PRDX1, PARK7
PB	GO:0032387	Regulação negativa do transporte intracelular	2	0.0002	0.0388	PARK7, CRYAB
PB	GO:0016052	Processo catabólico do carboidrato	2	0.0003	0.0404	TPI1, PGAM2
PB	GO:0072524	Processo metabólico do composto contendo piridina	2	0.0003	0.0419	TPI1, PGAM2

¹Identificação do termo *Gene Ontology*; ² N: Número de genes identificados por termos; ³FDR: *False Discovery Rate*, valor do P ajustado com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995); ⁴Genes correspondentes as proteínas (TPI1: Triosefosfato isomerase; PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PKM2: piruvato quinase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; MDH1: malato desidrogenase; TTN12: troponina I tipo 1; TNNC2: troponina C tipo 2; CFL2: cofilina 2; TPM2: tropomiosina cadeia beta; CRYAB: αβ-cristalina; HSPB1: proteína do choque térmico 27; PARK7: proteína deglicase DJ-1; PRDX1: peroxirredoxina 1).

Apêndice C – Processos biológicos significativos (FDR<0,05) das proteínas diferencialmente expressas em função da razão entre pH_i intermediário e pH_i normal, no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, agrupados pelo REVIGO.

ID ¹	Descrição	N ²	FDR ³	Log10 P-ajust ⁴	Genes ⁵
GO:0046939	Fosforilação de nucleotídeos	3	0.0008	-3.097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0009132	Metabolismo de difosfato nucleosídeos	3	0.0008	-3.097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0046031	Metabolismo do ADP	3	0.0008	-3.097	TPI1, AK1, PGAM2
GO:0000302	Resposta a espécies reativas de oxigênio	3	0.0008	-3.097	PRDX1, PARK7, CRYAB
GO:0044712	Catabolismo de organismo único	4	0.0097	-2.013	PRDX1, PGAM2, PARK7, TPI1
GO:0044281	Metabolismo de pequenas moléculas	5	0.0097	-2.013	MDH1, PGAM2, PARK7, AK1, TPI1
GO:0042743	Metabolismo do peróxido de hidrogênio	2	0.0097	-2.013	PARK7, PRDX1
GO:0010035	Resposta a substância inorgânica	3	0.0097	-2.013	CRYAB, PRDX1, PARK7
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	3	0.0097	-2.013	CRYAB, PRDX1, PARK7
GO:0009141	Metabolismo de trifosfato nucleosídeos	3	0.0099	-2.004	AK1, PGAM2, TPI1
GO:0006082	Metabolismo do ácido orgânico	4	0.0099	-2.004	MDH1, PGAM2, PARK7, TPI1
GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	3	0.0140	-1.854	MDH1, PGAM2, TPI1
GO:0006081	Metabolismo do aldeído celular	2	0.0140	-1.854	PARK7, TPI1
GO:1901657	Metabolismo do composto glicosil	3	0.0140	-1.854	PGAM2, AK1, TPI1
GO:0044710	Metabolismo de organismo único	6	0.0144	-1.842	MDH1, PGAM2, PARK7, AK1, PRDX1, TPI1
GO:0032787	Metabolismo do ácido monocarboxílico	3	0.0144	-1.842	PGAM2, PARK7, TPI1
GO:0032386	Regulação do transporte intracelular	3	0.0172	-1.765	PRDX1, PARK7, CRYAB
GO:0072521	Metabolismo de composto contendo purina	3	0.0192	-1.717	PGAM2, AK1, TPI1
GO:0080135	Regulação da resposta celular ao estresse	3	0.0200	-1.699	MDH1, PARK7, PRDX1
GO:0006090	Metabolismo do piruvato	2	0.0201	-1.697	PGAM2, TPI1
GO:0043154	Regulação negativa da atividade da cisteína na apoptose	2	0.0252	-1.599	PARK7, CRYAB
GO:0009056	Processo catabólico	4	0.0261	-1.583	PGAM2, PARK7, PRDX1, TPI1
GO:0072593	Metabolismo de espécies reativas a oxigênio	2	0.0265	-1.577	PARK7, PRDX1
GO:0044724	Metabolismo do carboidrato de organismo único	2	0.0341	-1.467	PGAM2, TPI1
GO:0055086	Metabolismo de pequenas moléculas contendo nucleobase	3	0.0347	-1.460	PGAM2, AK1, TPI1
GO:0005975	Metabolismo do carboidrato	3	0.0357	-1.447	PGAM2, MDH1, TPI1
GO:0072524	Metabolismo do composto contendo piridina	2	0.0419	-1.378	PGAM2, TPI1

¹Identificação do termo *Gene Ontology*; ² N: Número de genes identificados por termos; ³FDR: *False Discovery Rate*, valor do P ajustado com a metodologia de Benjamini e Hochberg (1995); ⁴Log10 do P ajustado; ⁵Genes correspondentes as proteínas (TPI1: Triosefosfato isomerase; AK1: adenilato quinase isoenzima 1; PGAM2: fosfoglicerato mutase 2; PRDX1: peroxirredoxina 1; PARK7: proteína deglicase DJ-1; MDH1: malato desidrogenase; CRYAB: αβ-cristalina).

Apêndice D – Rede de interação proteínas totais identificadas por análise *GeLC-MC/MC* em relação ao pH final no músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Simental Sul Africano x Nelore, com base em análise realizada pelo *String* v10.5.

Os nós representam proteínas do banco de dados de *Bos taurus* e as linhas as associações entre proteínas.
Fonte: Própria autoria.