

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MARTA MARIA DOS SANTOS FONTES**

**COLÁGENO INTRAMUSCULAR DE VACAS E NOVILHAS ALIMENTADAS COM  
DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA**

**VIÇOSA- MINAS GERAIS  
2020**

**MARTA MARIA DOS SANTOS FONTES**

**COLÁGENO INTRAMUSCULAR DE VACAS E NOVILHAS ALIMENTADAS COM  
DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Márcio de Souza Duarte

Coorientador: Mário Luiz Chizzotti

**VIÇOSA- MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F683c  
2020

Fontes, Marta Maria dos Santos, 1990-  
Colágeno intramuscular de vacas e novilhas alimentadas  
com dieta de alta densidade energética / Marta Maria dos Santos  
Fontes. – Viçosa, MG, 2020.  
34 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Márcio de Souza Duarte.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Bovinos - Alimentação e rações. 2. Carne. 3. Colágeno.  
4. Novilhas. 5. Vacas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 636.20855


MARTA MARIA DOS SANTOS FONTES

**COLÁGENO INTRAMUSCULAR DE VACAS E NOVILHAS ALIMENTADAS COM  
DIETA DE ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

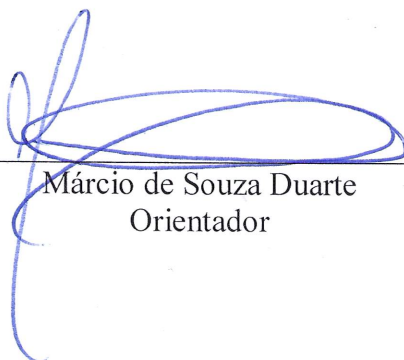
Assentimento:



---

Marta Maria dos Santos Fontes

Autora



---

Márcio de Souza Duarte  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelos dons que me concedeu e por ter me dado força para finalizar essa etapa.

Ao apoio financeiro do CNPq e FAPEMIG.

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

A minha família, em especial a minha mãe, Maria, por todas as orações feitas.

Ao meu marido, Daniel e aos meus filhos, Gabriel e Luísa, por todo companheirismo, amor e apoio durante toda minha vida acadêmica.

Ao professor Márcio Duarte pela orientação, confiança e paciência.

A todos integrantes do nosso grupo de pesquisa, Thaís, Mariana, Raniery e Lorena, pela ajuda para conduzir esse trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação, Thaís, Rizielly, Cris Luana e Andréia pelo auxílio nos estudos, experimentos, momentos de descontração e amizade.

Aos amigos do LABTEC, em especial ao Walmir pelos ensinamentos e paciência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho, meu muito OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

MARTA MARIA DOS SANTOS FONTES, filha de Francisco Paulo dos Santos e Maria da Conceição dos Santos, nasceu em 13 de agosto de 1990, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa em março de 2013 e graduou-se em 26 de janeiro de 2018. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq (PIBIC/CNPq) e FAPEMIG sob orientação dos professores Marcos Inácio Marcondes e Polyana Pizzi Rotta.

Em março de 2018 ingressou-se no mestrado em Zootecnia, no programa de pós graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa sob orientação do professor Márcio de Souza Duarte. Obteve o título de mestre em Zootecnia no dia 20 de fevereiro de 2020.

## RESUMO

FONTES, Marta Maria dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Colágeno intramuscular de vacas e novilhas alimentadas com dieta de alta densidade energética.** Orientador: Márcio de Souza Duarte. Coorientador: Mário Luiz Chizzotti.

O presente trabalho consiste em avaliar os efeitos do fornecimento de dieta de alta densidade energética sobre a solubilidade e *turnover* do colágeno em vacas de descarte em relação a novilhas. O tecido muscular esquelético é constituído por fibras musculares, tecido adiposo e tecido conjuntivo, sendo o colágeno o principal componente do tecido conjuntivo. O colágeno é uma proteína estrutural, responsável por manter a integridade do músculo esquelético. Além disso, ele é considerado uma proteína de meia-vida longa, logo o seu *turnover* é essencial para o crescimento animal, uma vez que uma de suas funções é a de sustentação. Tanto o colágeno quanto os outros componentes da matriz extracelular são degradados por metaloproteinases de matriz (MMPs), cuja inibição é realizada pelos inibidores das MMPs (TIMPs). As características do colágeno são ditas como uma das principais variáveis responsáveis pela maciez da carne. Estratégias dietéticas podem influenciar o *turnover* protéico do tecido conjuntivo intramuscular, reduzindo o *cross-linking* entre as moléculas do colágeno e consequentemente aumentando a solubilidade do mesmo. Apesar do conhecimento atual sobre os efeitos da dieta nas propriedades do colágeno, poucos trabalhos buscam estratégias para minimizar seu efeito com o avançar da idade do animal. Sendo assim, nós avaliamos os efeitos do fornecimento de dieta de alta densidade energética sobre a solubilidade e *turnover* do colágeno em vacas de descarte. Dez vacas de descarte, (idade de  $84 \pm 2,1$  meses e peso  $550 \pm 30,5$  kg) e dez novilhas (idade de  $24 \pm 1,8$  meses e peso de  $300 \pm 15,6$  kg) foram alimentadas com dieta de alta densidade energética, durante 150 dias. O ganho médio diário ( $P = 0,51$ ), o teor total de colágeno ( $P = 0,65$ ), a abundância de mRNA de *COL1A1* ( $P = 0,96$ ), atividade enzimática da lisil oxidase ( $P = 0,80$ ), a expressão de mRNA da *MMP9* ( $P = 0,41$ ) e *TIMP2* ( $P = 0,19$ ) não diferiram entre as idades. A solubilidade de colágeno ( $P < 0,01$ ) e a força de cisalhamento ( $P < 0,01$ ) foram maiores nas novilhas em relação às vacas de descarte. As vacas de descarte apresentaram maior abundância de mRNA de *COL3A1* ( $P = 0,04$ ), *TIMP 1* ( $P < 0,01$ ) e *TIMP3* ( $P < 0,01$ ). O teor de gordura intramuscular ( $P = 0,06$ ) bem como a abundância de mRNA da *MMP2* ( $P = 0,10$ ) tenderam a ser maior nas vacas de descarte em relação às novilhas. Os resultados sugerem alteração no remodelamento e aumento na renovação do colágeno intramuscular em vacas de descarte em relação á novilhas sob dieta de alta densidade

energética. Contudo, tais alterações não foram suficientes para causar equivalência da solubilidade do colágeno intramuscular entre vacas de descarte e novilhas.

Palavras-chave: Carne. Colágeno solúvel. Dieta altamente energética. Maciez. Novilha. Vaca de descarte.

## ABSTRACT

FONTES, Marta Maria dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Intramuscular collagen of cows and heifers fed a high energy density diet.** Adviser: Márcio de Souza Duarte. Co-adviser: Mario Luiz Chizzotti.

The present study aims to evaluate the effects of supplying a high energy density diet on collagen solubility and turnover in cull cows in relation to heifers. Skeletal muscle tissue is made up of muscle fibers, adipose tissue and connective tissue, in which the collagen is the main component of connective tissue. Collagen is a structural protein, responsible for maintaining the integrity of skeletal muscle. In addition, collagen is considered a protein with a long half-life, so its turnover is essential for animal growth since one of its functions is to provide support for the skeletal muscle. Both collagen and other components of the extracellular matrix are degraded by matrix metalloproteinases (MMPs), which are inhibited by MMP inhibitors (TIMPs). The characteristics of collagen are the main factors responsible for meat tenderness. Dietary strategies can influence the protein turnover of the intramuscular connective tissue, reducing the cross-linking between the collagen molecules and consequently increasing its solubility. Despite current knowledge about the effects of diet on the properties of collagen, few studies seek out strategies to minimize its effect with advancing age of the animal. Therefore, we evaluated the effects of providing a high energy density diet on solubility and turnover of collagen in cull cows. Ten cull cows, (age  $84 \pm 2.1$  months and weight  $550 \pm 30.5$  kg) and ten heifers (age  $24 \pm 1.8$  months and weight  $300 \pm 15.6$  kg) were fed a high energy density diet for 150 days. The average daily gain ( $P = 0.51$ ), the total collagen content ( $P = 0.65$ ), the mRNA abundance of COL1A1 ( $P = 0.96$ ), enzymatic activity of lysyl oxidase ( $P = 0.80$ ), mRNA expression of MMP9 ( $P = 0.41$ ) and TIMP2 ( $P = 0.19$ ) did not differ between ages. Collagen solubility ( $P < 0.01$ ) and shear force ( $P < 0.01$ ) were higher in heifers compared to cull cows. Cull cows showed higher mRNA abundance of COL3A1 ( $P = 0.04$ ), higher mRNA expression of TIMP 1 ( $P < 0.01$ ) and TIMP3 ( $P < 0.01$ ). Intramuscular fat ( $P = 0.06$ ) as well as mRNA expression of MMP2 ( $P = 0.10$ ) tended to be higher in cull cows compared to heifers. The data obtained suggest changes in remodeling and increasing in renewal of intramuscular collagen in cull cows compared to heifers under a high energy density diet. However, such changes were not sufficient to cause equivalence of the intramuscular collagen solubility between cull cows and heifers.

Keywords: Cull cow. Heifer. Highly energetic diet. Meat. Soluble collagen. Tenderness

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	11
	2.1 Fibrogênese.....	11
	2.2 Biossíntese do colágeno .....	12
	2.3 Turnover do colágeno.....	13
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	15
	3.1 Animais, dieta e área experimental .....	15
	3.2 Abate e coleta de amostras de tecido muscular esquelético e carne	16
	3.3 Análise de força de cisalhamento.....	16
	3.4 Análise do teor de colágeno.....	16
	3.5 Determinação do teor de gordura intramuscular.....	17
	3.6 Avaliação da expressão gênica por qPCR .....	17
	3.7 Atividade da lisil oxidase .....	18
	3.8 Análise estatística.....	19
4	RESULTADOS .....	20
	4.1 Parâmetros de desempenho animal .....	20
	4.2 Qualidade da carne .....	20
	4.3 Análises de expressão gênica.....	21
5	DISCUSSÃO .....	24
6	CONCLUSÃO .....	28
	REFERÊNCIAS .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

Vacas de descarte tem contribuição expressiva na produção de carne bovina em todo o mundo ao longo dos anos (COUVREUR *et al.*, 2019; EDWARDS-CALLAWAY; WALKER; TUCKER, 2019; GRAHAM; PRICE, 1982; WOOTEN *et al.*, 1979; WYTHES *et al.*, 1990). Contudo, em países em que a produção de bovinos se dá prioritariamente à pasto, a idade de vacas ao descarte é elevada, o que contribui negativamente com atributos qualitativos da carne, a exemplo da maciez (DUARTE *et al.*, 2011).

A maturidade animal está associada a estabilidade da matriz extracelular (BAILEY; LIGHT, 1989), cujo principal componente é o colágeno (PURSLOW, 2005). O colágeno é uma proteína estrutural (DU; MCCORMICK, 2009), cuja síntese é realizada por fibroblastos (MCCORMICK, 1994). Primeiramente ocorre a síntese do pre-procolágeno, contendo alguns peptídeos sinais que a direcionam para a correta biossíntese (MCCORMICK, 1994). Após a perda do primeiro peptídeo sinal forma-se o procolágeno, molécula mais longa formada por colágeno solúvel (MCCORMICK, 1994). Posteriormente o segundo peptídeo sinal é perdido dando origem ao tropocolágeno, esta pela ação da lisil oxidase se polimeriza, formando *cross-linking* entre as moléculas para formar as fibras de colágeno (MCCORMICK, 1994).

Sabe-se que a qualidade do tecido conectivo intramuscular é afetada principalmente pela abundância e *cross-linking* entre as moléculas de colágeno (MCCORMICK, 1994), tendo efeito direto na qualidade da carne (MIAO *et al.*, 2016). O *turnover* do tecido conectivo intramuscular é oriundo de dois processos: a síntese, com a formação de novas moléculas de colágeno, I e III principalmente, e a degradação onde moléculas de colágeno danificadas e/ou velhas são degradadas (KARSDAL *et al.*, 2016). Tanto o colágeno quanto os outros componentes da matriz extracelular são degradados pelas enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) (VISSE; NAGASE, 2003). A atividade das MMPs é regulada em três níveis (MANNELLO; MEDDA, 2012): a nível de transcrição, onde fatores de crescimento e citocinas acionam uma via de sinalização, ativando fatores de transcrição; ativação proteolítica, pela interação da molécula com proteinases, já que sua síntese é em forma proenzimas inativas (CLARK *et al.*, 2008) e por último pela inibição pelas TIMPs (inibidores das MMPs) (VISSE; NAGASE, 2003), onde as TIMPs interagem com as MMPs ainda inativas, impedindo a ativação (TROEBERG; NAGASE, 2007). No entanto as TIMPs exercem várias outras funções biológicas além da inibição das MMPs ativas, como crescimento celular, repressão da angiogênese e indução ou redução da apoptose (FASSINA *et al.*, 2000).

Estratégias dietéticas podem influenciar o *turnover* protéico do tecido conjuntivo intramuscular, reduzindo o *cross-linking* entre as moléculas do colágeno e consequentemente aumentando a solubilidade do mesmo (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2010). Apesar do conhecimento atual sobre os efeitos da dieta nas propriedades do colágeno (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2010; MODZELEWSKA-KAPITUŁA; NOGALSKI, 2016), poucos trabalhos buscam estratégias para minimizar seu efeito com o avançar da idade do animal.

A hipótese do presente estudo é que vacas de descarte submetidas à dieta de alta densidade energética apresentam maior solubilidade de colágeno intramuscular em relação a novilhas devido ao remodelamento do colágeno. Teve-se por objetivo com este trabalho comparar a deposição de colágeno intramuscular bem como a expressão de marcadores de remodelamento deste tecido, entre novilhas e vacas de descarte submetidas à dietas de alta densidade energética durante a terminação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fibrogênese

O tecido muscular esquelético é constituído por fibras musculares, adipócitos e fibroblastos (DU et al., 2013). Estas linhagens celulares são derivadas do mesmo *pool* de células mesenquimais multipotentes (DU et al., 2011). Sendo dependentes portanto, do estímulo externo para determinar a diferenciação em uma linhagem celular específica em detrimento de outra. A fibrogênese, processo responsável pela síntese do tecido conjuntivo, é mediada principalmente pela via de sinalização dos fatores de crescimento *TGFs* (SALVADORI et al., 2005), que promove a ativação da via de sinalização da *SMAD* (DECOLOGNE et al., 2007) resultando na transcrição de genes alvos da fibrogênese, como colágeno e fibronectina (KENNEDY et al., 2008).

O colágeno é o componente mais abundante da matriz extracelular do tecido muscular esquelético, apesar da existência de outros como proteoglicanos e glicoproteínas, com grande participação estrutural (DU; MCCORMICK, 2009). Sua função é manter a integridade estrutural do músculo esquelético, desempenhando função vital no desenvolvimento e crescimento muscular. O colágeno pertence à uma superfamília de proteínas com uma grande diversidade de isoformas. Contudo, no tecido muscular esquelético de mamíferos as mais abundantes isoformas de colágeno são o tipo I e o tipo III, que se diferenciam no tamanho e espessura das fibras musculares, constituindo o endomísio, perimísio e o epimísio (PURSLOW, 2005). O endomísio é o tecido conjuntivo que separa individualmente as fibras musculares, o perimísio por sua vez faz a partição de um conjunto de fibras musculares, com grande efeito na maciez da carne (PURSLOW, 2005) e por último o epimísio é responsável pelo delineamento entre os diferentes músculos (PURSLOW, 2005).

O colágeno sofre modificações à medida que o animal cresce, aumentando sua tenacidade devido ao aumento na estabilidade de interligações entre suas moléculas, proporcionando apoio ao músculo esquelético (MCCORMICK, 1994). Exerce grande participação na maciez da carne *post-mortem*, além influenciar a maciez da carne entre os músculos (EGGEN; HOCQUETTE, 2004; PURSLOW, 2005). Geralmente maiores frações de colágeno tipo III e colágeno solúvel são indicativos de animais mais jovens, cujas fibras musculares são menores (LIGHT et al., 1985). Com a maturidade do animal, o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I e causa aumento na estabilidade das interligações entre as

moléculas (KOVANEN; SUOMINEN, 1989), acarretando assim em carne mais dura (PURSLOW, 2005). No entanto, estudos com o intuito de correlacionar a proporção destes tipos de colágeno com a idade do animal se mostraram contraditórios (LEPETIT, 2008; LIGHT *et al.*, 1985).

Além da idade do animal, outros fatores podem determinar as características do colágeno, como por exemplo a taxa de crescimento. Assim, trabalhos demonstram a influência de dietas altamente energéticas nas propriedades do colágeno, porém com resultados contraditórios. Alguns trabalhos não encontraram diferenças na solubilidade do colágeno em animais de diferentes planos nutricionais (FRENCH *et al.*, 2001; MANDELL; BUCHANAN-SMITH; CAMPBELL, 1998), outros por sua vez relatam que dietas de alta energia podem aumentar a taxa de crescimento, desencadeando aumento do colágeno solúvel devido ao maior *turnover* do colágeno (ABERLE *et al.*, 1981; FISHELL *et al.*, 1985; MILLER *et al.*, 1987).

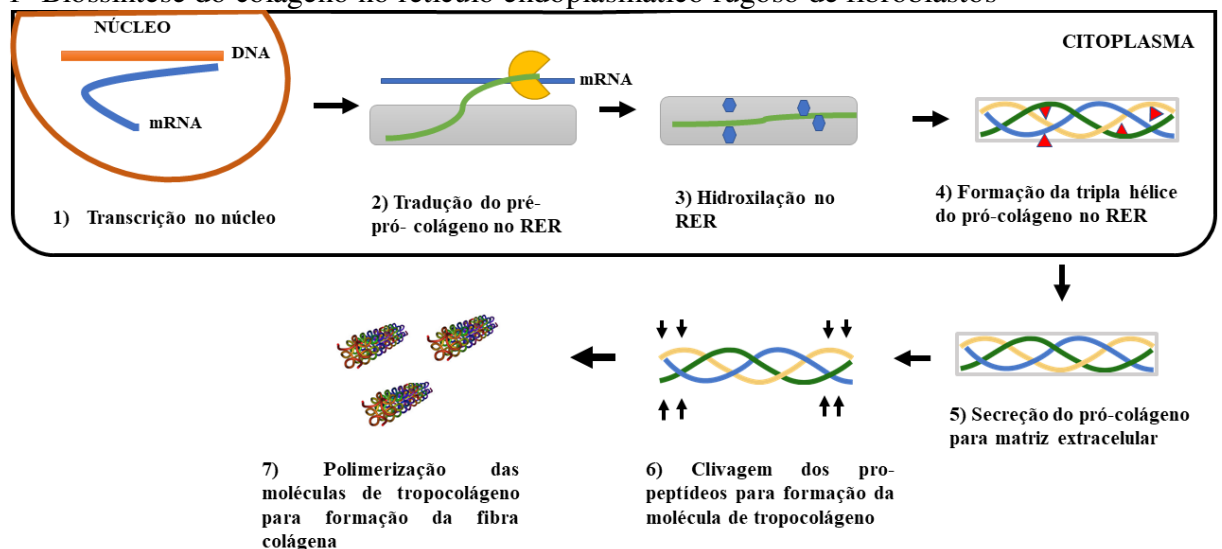
Sabe-se até então que a qualidade do colágeno envolve variáveis tais como; isoforma predominante, abundância de ligações cruzadas entre as moléculas, o tamanho das fibras e os danos sofridos pelo mesmo durante o condicionamento e cozimento (BAILEY; LIGHT, 1989). Estas características estão intimamente relacionadas a maciez da carne (PURSLOW, 2005). Portanto a manipulação da taxa de remodelação da matriz extracelular pode ser considerado um meio para melhorar a maciez da carne (PURSLOW; ARCHILE-CONTRERAS; CHA, 2012).

## **2.2 Biossíntese do colágeno**

No tecido muscular esquelético, o colágeno é produzido principalmente por fibroblastos e miócitos (DU; MCCORMICK, 2009). Sua síntese ocorre no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 1) e após a transcrição do mRNA, ocorre a tradução desse mRNA no citoplasma (DU; MCCORMICK, 2009). O mRNA do colágeno é traduzido em molécula de preprocógeno (DU; MCCORMICK, 2009), contendo alguns peptídeos sinais, cuja função é alinhar as cadeias peptídicas e direcionar a molécula. Em seguida a molécula de colágeno se reorganiza em hélice tripla e perde seu primeiro peptídeo sinal formando o procógeno, sendo esta, a molécula mais longa formada por colágeno solúvel (DU; MCCORMICK, 2009). Neste ponto as modificações pós-traducionais ocorrem, começando com a hidroxilação de prolinas específicas pela prolil-4-hidroxilase, formando as hidroxiprolinas (DU; MCCORMICK, 2009). Resíduos específicos de lisina são posteriormente hidroxilados pela lisil-hidroxilase, formando as hidroxilisininas (DU; MCCORMICK, 2009). O procógeno é então transportado para matriz

extracelular, onde posteriormente ele perde seu segundo peptídeo sinal, formando a molécula de tropocolágeno, sendo agora capaz de se polimerizar para formar fibras de colágeno (DU; MCCORMICK, 2009). Os resíduos de hidroxiprolina formam pontes de hidrogênio entre as cadeias, contribuindo para estabilizar a hélice tripla de tropocolágeno (DU; MCCORMICK, 2009). A estrutura fibrilar é reforçada pela formação de ligações covalentes entre as moléculas de tropocolágeno, processo que é catalisado pela enzima lisil oxidase (DU; MCCORMICK, 2009).

Figura 1- Biossíntese do colágeno no retículo endoplasmático rugoso de fibroblastos



Fonte: Adaptado DU; MCORMICK (2009)

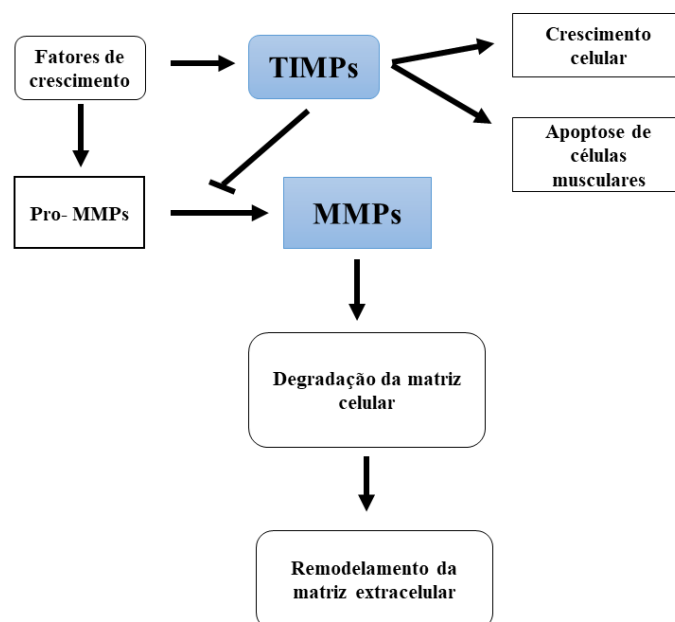
### 2.3 Turnover do colágeno

O colágeno é considerado uma proteína de meia-vida longa (DU; MCCORMICK, 2009), assim seu turnover é essencial para o crescimento animal, uma vez que uma de suas funções é a sustentação. Tanto o colágeno quanto os outros componentes da matriz extracelular são degradados por metaloproteínas de matriz (MMPs; VISSE; NAGASE, 2003), resultando em peptídeos e aminoácidos livres (KARSDAL *et al.*, 2016). As MMPs pertencem a uma superfamília de metalo-endopeptidases (VANDENBROUCKE; LIBERT, 2014). Além de atuarem como proteases, as MMPs desempenham função regulatória de proteínas relacionadas a matriz extracelular de indivíduos saudáveis, afetando a expressão gênica e consequentemente a síntese protéica (MANNELLO; MEDDA, 2012). A atividade das MMPs é regulada pelos inibidores das MMPs (TIMPs) (VISSE; NAGASE, 2003). Estudos no qual foi mensurada a

atividade tanto dessas proteinases quanto de seus inibidores no músculo esquelético bovino revelaram a presença de uma colagenase (MMP-1), duas gelatinases (MMP-2, MMP-9) juntamente com as TIMP 1, TIMP-2 e TIMP-3 (BALCERZAK *et al.*, 2001). Estas se diferenciam entre si pela especificidade do substrato, estrutura primária e localização celular (CLARK *et al.*, 2008).

No tecido muscular esquelético pós-natal, tanto as células musculares como os fibroblastos secretam MMPs e TIMPs (PURSLOW, 2002), mas a atividade dessas enzimas é influenciada por vários fatores como raça, idade, sexo, tipo de alimentação, exercício e tipo de fibra muscular (CHRISTENSEN; PURSLOW, 2016) (Fig. 2). Assim o equilíbrio entre a síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular é muito diferente entre animais de diferentes idades. Por exemplo, espera-se que animais mais jovens, que ainda estão em fase de crescimento bem como animais em confinamento por consumirem dieta mais energética, tenham turnover da matriz extracelular mais acentuado, já que o crescimento rápido requer rápida degradação e regeneração das camadas de tecido conjuntivo que separam as fibras musculares em crescimento. Esta rápida regeneração do tecido conjuntivo pode diminuir a formação de reticulação madura estável e insolúvel em comparação com a reticulação do músculo de animais de crescimento mais lento e/ou mais velhos que geralmente produzem carne menos macia.

Figura 2- Turnover de colágeno em fibroblastos



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais, dieta e área experimental

Todos os procedimentos de cuidado e manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizadas vinte fêmeas da raça Angus oriundas de rebanho comercial, sendo 10 fêmeas adultas (idade de  $84 \pm 2,1$  meses e peso  $550 \pm 30,5$  kg) e 10 fêmeas jovens (idade de  $24 \pm 1,8$  meses e peso de  $300 \pm 15,6$  kg). Inicialmente todos os animais foram pesados e em seguida alocados ao confinamento, em baias coletivas, sendo uma baia para as vacas e outra para as novilhas. As baias eram providas de comedouros e bebedouros coletivos e os animais tiveram livre acesso à água e à dieta. Os animais foram confinados por 150 dias, onde receberam dieta com alta densidade energética, composta de silagem de milho, milho moído, polpa cítrica e farelo de amendoim (Tabela 1).

Tabela 1- Ingredientes e composição química da dieta experimental

Ingredientes	MS (g/kg)
Silagem de milho	163
Milho fubá	469
Farelo de amendoim	75,1
Polpa cítrica	251
Ureia	10,7
Núcleo mineral <sup>1</sup>	29,3
Composição nutricional	g/kg
Matéria seca <sup>2</sup>	670
Proteína bruta <sup>3</sup>	135
Extrato etéreo <sup>3</sup>	32,1
Fibra em detergente neutro <sup>3</sup>	233
Carboidratos não fibrosos	570
Matéria orgânica	946

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

<sup>1</sup>Composição por Kg: 210g de cálcio, 18g de fósforo, 22g de enxofre, 17g de magnésio, 56g de sódio, 333mg de ferro, 500mg de cobre, 1500mg de manganês, 2000mg de zinco, 25mg de iodo, 10mg de cobalto, 6,70mg de selênio, 835mg de monensina, 83,39 KUI de Vit A, 13,30 KUI de Vit. D e 150 UI DE Vit. E.

<sup>2</sup>Teor de matéria seca/kg ração.

<sup>3</sup>Teor de nutrientes/kg de matéria seca.

### **3.2 Abate e coleta de amostras de tecido muscular esquelético e carne**

Ao término de 150 dias de confinamento os animais foram pesados e abatidos utilizando-se de insensibilização por contusão cerebral seguida de sangria total pela veia jugular. Imediatamente após a sangria, foi retirada uma amostra do músculo *Longissimus thoracis* (LT) à altura da 12<sup>o</sup> costela, imediatamente armazenada em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão gênica e atividade enzimática. As carcaças foram refrigeradas por 48 horas e posteriormente desossadas.

Após a desossa, foram retiradas 3 amostras de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus thoracis* de cada carcaça, entre a 12<sup>o</sup> - 16<sup>o</sup> costelas, os quais foram identificadas, embaladas a vácuo em sacos plásticos e armazenadas a -20°C. Das amostras coletadas durante a desossa, uma foi destinada à análise de força de cisalhamento e outra foi liofilizada e posteriormente moída no moinho tipo bola para posterior análise de matéria seca, extrato etéreo e quantificação do teor de colágeno.

### **3.3 Análise de força de cisalhamento**

Amostras de carne de 2,5 cm de espessura foram cozidas em banho-maria à temperatura de 70°C durante 40 minutos, em seguida foram resfriadas em banho de gelo durante 30 minutos, a fim de cessar o cozimento (BRUCE; STARK; BEILKEN, 2004). Posteriormente foram armazenadas à 4°C por 24 horas. Após esse período foi determinada a força de cisalhamento utilizando a metodologia descrita por Bruce *et al.* (2004). Resumidamente, de cada amostra foram retiradas oito amostras cilíndricas de 1,02 cm de diâmetro paralelamente à orientação das fibras musculares mediante amostrador específico de aço inox devidamente afiado. As amostras foram cisalhadas perpendicularmente à orientação das fibras musculares medindo-se a força, em Kgf, necessária para cisalhar as mesmas. Foi utilizado lâmina de corte em V, com angulação de 60°, espessura de 1,016 mm e velocidade fixa de 20 cm/min, acoplada a texturômetro Warner-Bratzler®/.

### **3.4 Análise do teor de colágeno**

Para a determinação do teor de colágeno utilizou-se 1,5g de amostras de carne liofilizada utilizando o método proposto por Woessner (1961) com modificações Latorre, Lifschitz, &

Purslow (2016). As amostras foram colocadas, em duplicatas, em tubos de centrífuga de 50 mL onde foram adicionados 12 mL de solução salina tamponada com fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 5,6). Os tubos foram colocados em banho-maria a 80°C por 60 minutos. Posteriormente as amostras foram submetidas ao banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas 2 vezes (6000 x g, a 2°C por 10 minutos) para separar o sobrenadante dos resíduos, os quais foram condicionados em recipientes distintos. Em seguida a fração solubilizada (sobrenadante) e não solubilizada (pellet) de cada uma das amostras foi submetida à hidrólise ácida em HCl 6N à 110°C por 16 h. Posteriormente, o pH das amostras hidrolisadas foi ajustado entre 6,5-7,0 com NaOH 2N. Para determinar o teor de hidroxiprolina, 1 mL do hidrolisado foi colocado em tubo de ensaio juntamente com 2 mL de isopropanol (solução 2-Propanol, Sigma Aldrich) e 1 mL de solução oxidante (1,41 g de cloramina T dissolvida em 100 ml de solução tampão, 30 g de mono-hidrato de ácido cítrico, 15 g de NaOH, 90g de acetato de sódio tri-hidratado, dissolvidos em 500 ml de água destilada). Os tubos permaneceram em repouso durante 4 minutos e em seguida foi adicionado 2 mL de reagente de Ehrlich (2 g de P-dimetilbenzaldeído, 2,5 ml de ácido perclórico). Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C por 25 minutos. Em seguida foram transferidos para banho de gelo por 4,5 minutos e, finalmente, as amostras foram colocadas em cubetas e lidas por espectrofotometria a 558 nm. O teor de colágeno foi determinado, em miligrama por grama de tecido liofilizado, multiplicando a quantidade de hidroxiprolina por 7,52 do sobrenadante e 7,25 do resíduo (CROSS; CARPENTER; SMITH, 1973).

### **3.5 Determinação do teor de gordura intramuscular**

As amostras da carne liofilizadas foram analisadas segundo os procedimentos analíticos padrão do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Zootecnia (INCT-CA; (DETMANN *et al.*, 2012) para matéria seca (MS; método INCT-CA G-003/1) e extrato etéreo (EE; método INCT-CA G-004/1).

### **3.6 Avaliação da expressão gênica por qPCR**

O RNA total foi extraído de 0,1 g de tecido das amostras utilizando-se Trizol® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific®, Oregon, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do RNA total e sua integridade foram obtidas através do kit Agilent

RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies, California, USA), utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, USA). Posteriormente o cDNA foi sintetizado utilizando-se o Sistema de Transcrição Reversa GoScript (Promega, Madison, WI). Os genes de interesse avaliados foram: *COL1A1*, *COL3A1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *TIMP3* (Thermo Fisher Scientific®, Oregon, USA) (Tabela 2). As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas em duplicatas utilizando o termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA), a partir do método de Quantificação Relativa, utilizando como detecção o sistema Sonda fluorescente de hidrólise (Kit Taqman, Thermo Fisher Scientific®®, Oregon, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados obtidos foram normalizados utilizando o gene endógeno, *RPS18*, de acordo com o método  $\Delta\Delta C_t$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2- Nomes dos genes, abreviação e identificação do ensaio

<b>Genes</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Código de acesso no NCBI</b>
<b>Metalopeptidase de matriz 2</b>	MMP2	NM_174745.2
<b>Metalopeptidase de matriz 9</b>	MMP9	NM_174744.2
<b>Colágeno tipo 1</b>	COL1A1	NM_001034039.2
<b>Colágeno tipo 3</b>	COL3A1	NM_001076831.1
<b>Inibidor de metalopeptidase 1</b>	TIMP1	NM_174471.3
<b>Inibidor de metalopeptidase 2</b>	TIMP2	NM_174472.4
<b>Inibidor de metalopeptidase 3</b>	TIMP3	NM_174473.4
<b>Proteína ribossomal</b>	RPS18	NM_001033614.2

Fonte: Elaborado pela autora, com dados extraídos do NCBI, 2020.

### 3.7 Atividade da lisil oxidase

A atividade da enzima lisil oxidase foi analisada através do kit Lysyl Oxidase Activity Assay (Fluorometric; Abcam, Canada), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Inicialmente as proteínas foram extraídas de 2 mg de tecido, utilizando tampão de extração (6M ureia, 10Mm Tris pH 7,4), onde a amostra juntamente com o tampão foram homogeneizadas por 90 segundos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C- 13000 x g e o sobrenadante armazenado. A concentração total de proteínas foi estimada pelo método

de Bradford protein assay, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Por fim, as amostras foram acondicionadas em duplicatas em placa escura, juntamente com mix preparado com os reagentes presentes no kit Lysyl Oxidase Activity Assay (Fluorometric), seguida de incubação a 37°C durante 40 minutos, sendo mensurado após esse período o aumento da fluorescência, em UF por miligrama de tecido fresco, pelo equipamento SpectraMax M5 (Molecular Devices, USA) na faixa 540/590nm. O aumento na intensidade da fluorescência está relacionado ao aumento da atividade da enzima. Com a quantificação da proteína feita anteriormente foi possível determinar a atividade da lisil oxidase em relação a quantidade total de proteína presente na amostra.

### 3.8 Análise estatística

O número de repetições por tratamento foi determinado segundo Ryan (2013). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) segundo o modelo descrito abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  = observação tomada na unidade experimental j submetida ao tratamento i;

$\mu$  = constante geral;

$T_i$  = efeito do tratamento (idade)i;

$\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório

Todas análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS 9.2 (Statistical Analysis System Institute, Inc, Cary, NC, USA). Os resultados foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$  e tendência quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros de desempenho animal

O ganho médio diário não diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,51$ ). Porém o ganho de peso total foi maior nas novilhas em comparação com as vacas de descarte ( $P < 0,02$ ), diferentemente do peso corporal final ( $P < 0,01$ ) e do peso da carcaça ( $P < 0,01$ ), o qual foram maiores nas vacas de descarte em comparação com as novilhas (Tabela 3).

Tabela 3- Média e erro padrão da média (EPM) do peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF), ganho de peso total (GPT), ganho médio diário (GMD) e peso de carcaça (PC) de vacas de descarte e novilhas alimentadas com dieta de alta densidade energética por 150 dias

Item	Tratamento		EPM	P-valor
	Novilhas	Vacas de descarte		
PCI, kg	300.0	550.0	30.4	< 0.01
PCF, kg	509.0	723.0	26.0	< 0.01
GPT, kg	206.0	166.0	9.2	0.02
GMD, kg/d	1.25	1.3	0.1	0.51
PC, kg	280.0	395.0	14.0	< 0.01

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

### 4.2 Qualidade da carne

O colágeno total ( $P = 0,65$ ), bem como a atividade da lisil oxidase ( $P = 0,80$ ) não diferiram entre os tratamentos (Fig. 3A; 3C). Todavia, observou-se diferença entre os tratamentos quanto à força de cisalhamento ( $P = 0,01$ ) e a solubilidade do colágeno ( $P < 0,01$ ), sendo maior em novilhas em comparação a vacas de descarte (Fig. 3C; 3D).

A gordura intramuscular tendeu a diferir entre os tratamentos ( $P = 0,06$ ), sendo maior em vacas de descarte em relação as novilhas (Fig. 3E).

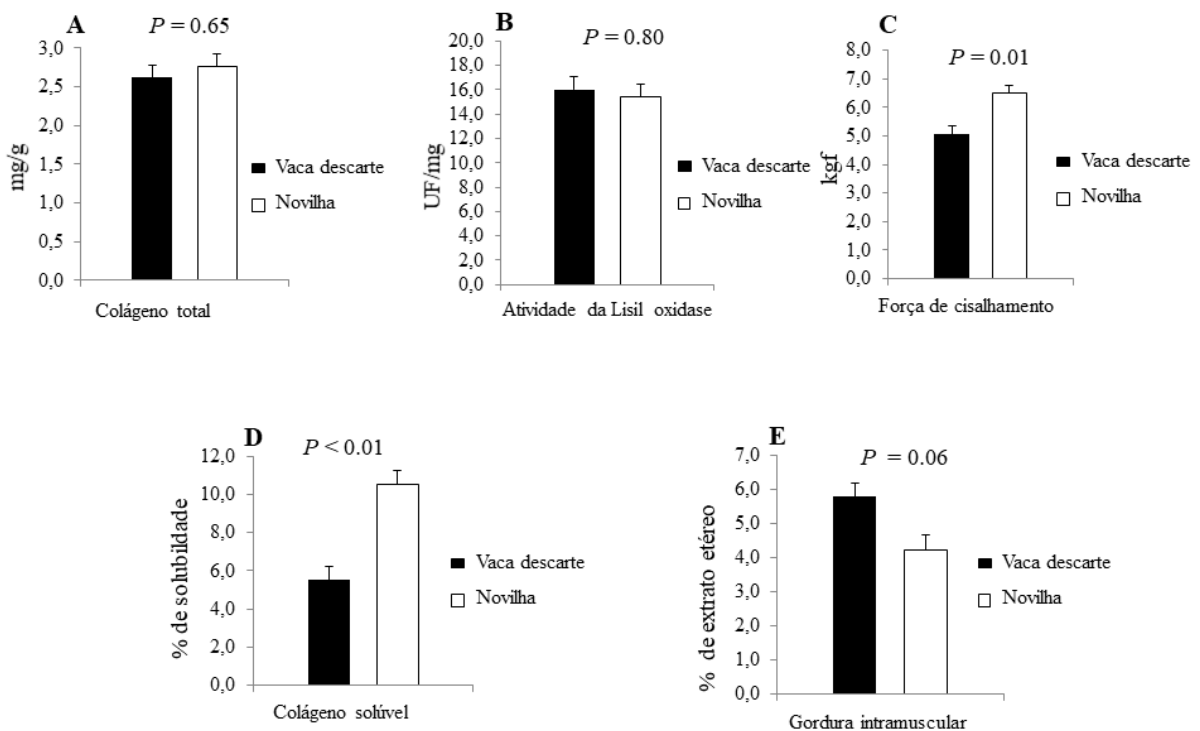
### 4.3 Análises de expressão gênica

Não foi observado diferença significativa na abundância de mRNA do marcador fibrogênico *COL1* ( $P = 0,96$ ). Entretanto, a abundância de mRNA do *COL3* foi maior em tecido muscular de vacas descarte em relação a novilhas ( $P = 0,04$ ; Fig. 4A; 4B).

A abundância de mRNA da metaloproteinase *MMP2* tendeu a aumentar no tratamento vaca descarte ( $P = 0,10$ ; Fig. 4C). Porém a abundância de mRNA da *MMP9* não diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,41$ ; Fig. 4D).

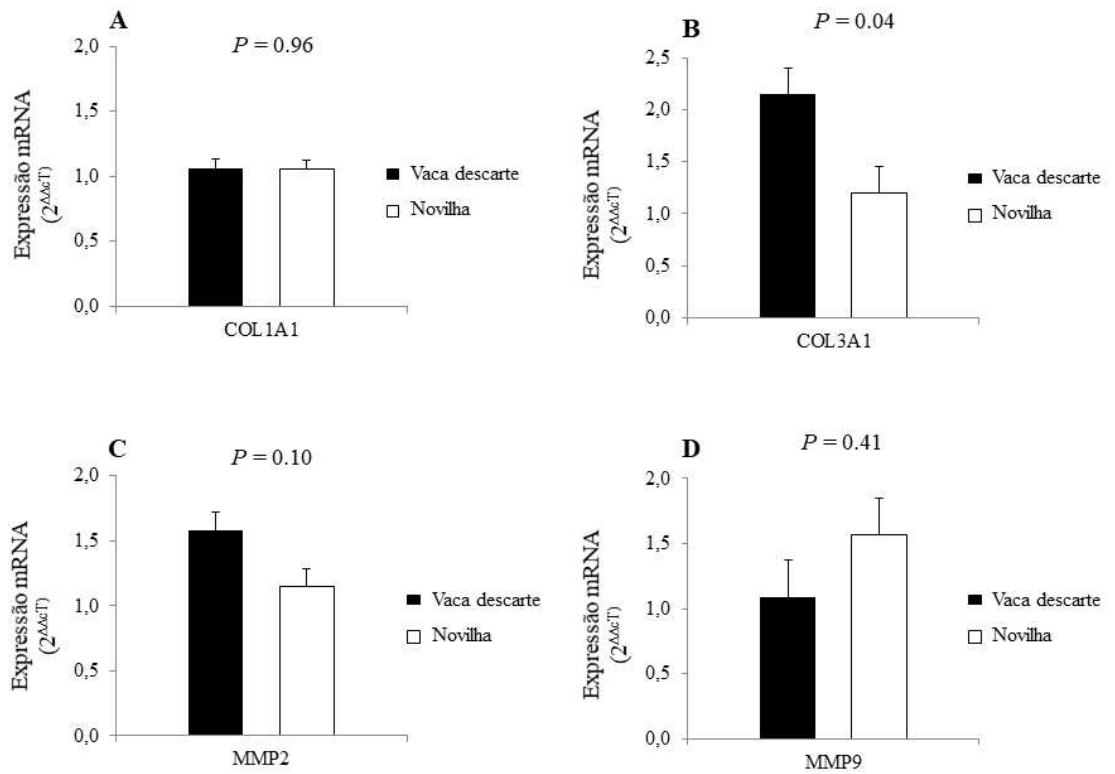
Diferenças na abundância de mRNA dos marcadores inibidores das metaloproteinases, *TIMP1* ( $P = 0,01$ ) e *TIMP3* ( $P = 0,01$ ) foram detectadas sendo observada maior expressão em vacas descarte em relação a novilhas (Fig. 5A; 5B). Contudo a abundância de mRNA da *TIMP2* não divergiu entre os tratamentos ( $P = 0,19$ ; Fig. 5C).

Figura 3: Teor total de colágeno intramuscular na carne fresca (A), atividade da lisil oxidase (B), força de cisalhamento (B), colágeno solúvel (B), gordura intramuscular (C) no *Longissimus thoracis* de vacas de descarte e novilhas alimentadas com dieta de alta densidade energética por 150 dias. A barra de erro representa EPM (erro padrão da média).



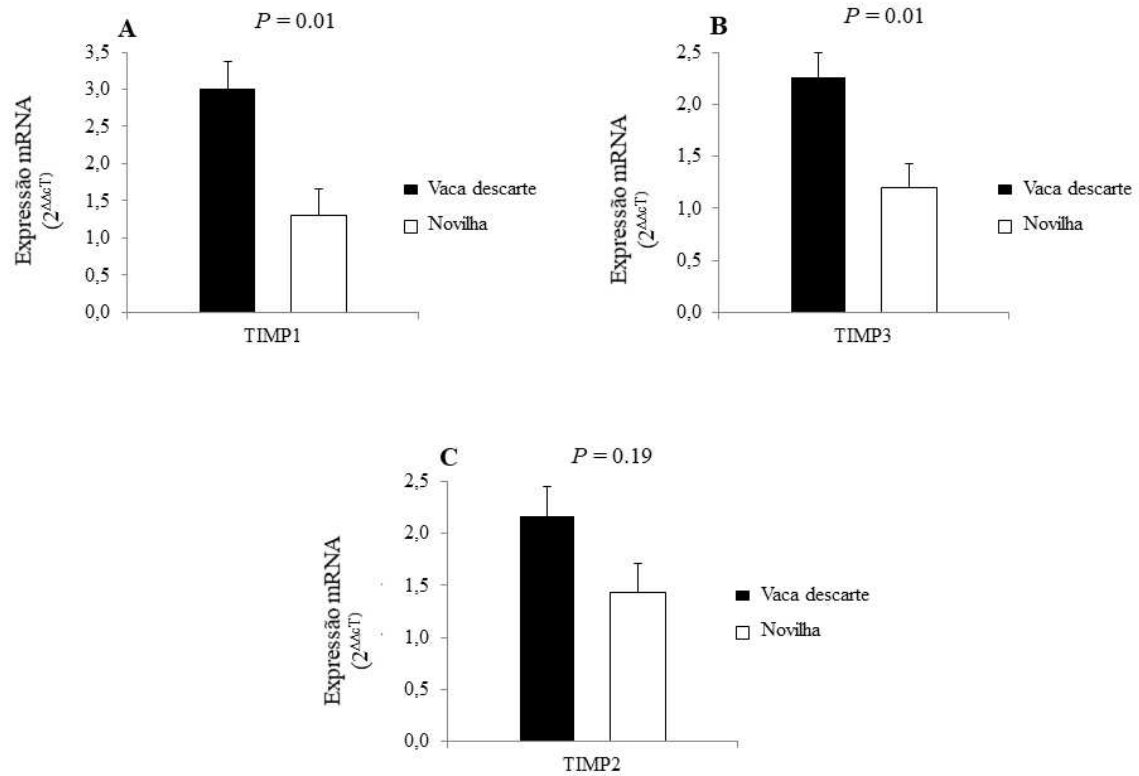
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 4: Expressão dos genes *COL1A1* (A), *COL3A1* (B), *MMP2* (C) e *MMP9* (D) no *Longissimus thoracis* de vacas descarte e novilhas alimentadas com dieta de alta densidade energética por 150 dias. A barra de erro representa EPM (erro padrão da média).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Figura 5: Expressão dos genes *TIMP1* (A), *TIMP3* (B) e *TIMP2* (C) no *Longissimus thoracis* de vacas descarte e novilhas alimentadas com dieta de alta densidade energética por 150 dias. A barra de erro representa EPM (erro padrão da média).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

## 5 DISCUSSÃO

O crescimento muscular durante a fase pós-natal em animais jovens é oriundo da hipertrofia de número fixo de fibras musculares (ZHAO *et al.*, 2015). Como consequência tem-se menor deposição de gordura intramuscular (HOCQUETTE, 2010), uma vez que o tecido muscular esquelético apresenta alta demanda por substrato para produção de energia. Contrariamente, em animais após atingirem a maturidade, há menor taxa de crescimento das fibras musculares, e conseqüentemente menor demanda energética pelo tecido muscular propriamente dito. Conseqüentemente, há maior taxa de deposição do tecido adiposo intramuscular (Du *et al.*, 2013; Hocquette, 2010) em animais de idade avançada, o que pôde ser observado no presente trabalho em que detectou-se tendência de aumento na deposição de tecido adiposo intramuscular em vacas de descarte comparado às novilhas.

A formação do tecido conjuntivo por sua vez é necessária para gerar estruturas de revestimento ao tecido muscular, como o epimísio e perimísio, a fim de não restringir o crescimento (Du *et al.*, 2010). O tecido conjuntivo é constituído principalmente por colágeno (DU; MCCORMICK, 2009), sendo este sintetizado na forma de procolágeno, onde há ligações fracas entre as moléculas e conseqüentemente maior solubilidade (DU; MCCORMICK, 2009). Com a maturidade ocorre a formação das moléculas de tropocolágeno, constituídas por ligações covalentes, formando o *cross-linking* entre as moléculas e tornando-as mais estáveis (DU; MCCORMICK, 2009). De modo geral, maiores concentrações de colágeno solúvel refletem na renovação da matriz extracelular (KARSDAL *et al.*, 2016).

Sabe-se que o turnover dos tecidos é oriundo tanto da síntese, em que há geração de novos tecidos pelo estímulo da expressão de genes e posteriormente pela síntese de novas proteínas, quanto pela degradação onde proteínas velhas e danificadas são continuamente degradadas (KARSDAL *et al.*, 2016). Tal processo é essencial para o adequado crescimento do animal (PURSLOW, 2005), devido a remodelação basal da matriz extracelular (KARSDAL *et al.*, 2016). Todavia, esse remodelamento pode ser alterado tanto pela idade do animal em que com o avançar da idade o *turnover* é reduzido (KARSDAL *et al.*, 2016), quanto por estratégias dietéticas no qual o aumento do valor energético da dieta afeta o *turnover* da matriz extracelular (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2010), para possibilitar o aumento no crescimento. Contudo, no presente trabalho observamos menor solubilidade de colágeno intramuscular em vacas de descarte comparados às novilhas quando submetidos à dieta de alta densidade energética, sugerindo que a renovação do tecido conectivo intramuscular de vacas descarte foi menor em comparação com novilhas.

Geralmente maiores frações de colágeno tipo III são indicativos de animais jovens, cujas fibras musculares são menores (LIGHT *et al.*, 1985). Estudos prévios mostraram níveis elevados de fragmentos de pro-colágeno tipo 3 na circulação sanguínea de ratos e humanos até atingirem a puberdade, ocorrendo posteriormente a estabilização da síntese (DANNE *et al.*, 1989; KARSDAL *et al.*, 2016). O fato de termos observado maior abundância de mRNA de *COL3A1* no tratamento vaca de descarte é indicativo de que houve aumento no *turnover* do tecido conectivo intramuscular em relação às novilhas.

Concomitantemente não foi observada diferença na atividade da enzima lisil oxidase entre os tratamentos. A lisil oxidase é responsável por realizar o *cross-linking* entre moléculas de tropocolágeno, tais ligações são responsáveis pela estabilização da fibra de colágeno (DU; MCCORMICK, 2009), resultando em menor teor de colágeno solúvel. De acordo com Duarte *et al.* (2011), a solubilidade do colágeno diminui notavelmente em bovino de corte após a maturidade. Essa solubilidade é negativamente relacionada ao *cross-linking* entre as moléculas de colágeno (ARCHILE-CONTRERAS; MANDELL; PURSLOW, 2010), sugerindo, portanto, maior atividade da lisil oxidase com o avançar da idade. O fato de não termos encontrado diferença na atividade da lisil oxidase entre as idades indica o aumento da solubilidade do colágeno nas vacas descarte em relação às novilhas, conseqüentemente maior renovação da matriz extracelular propiciado pelo aumento do valor energético da dieta. No entanto, o possível remodelamento do colágeno nas vacas de descarte, indicado pela alteração na expressão dos marcadores avaliados não foi suficiente para se igualar a solubilidade do colágeno das novilhas.

A degradação do colágeno no tecido conectivo intramuscular é realizada pelas metaloproteinases de matriz, as MMPs. As MMPs são sintetizadas na forma de proenzimas inativas (CLARK *et al.*, 2008) e são inibidas pelas TIMPs (inibidores das MMPs) (VISSE; NAGASE, 2003), onde as TIMPs interagem com as MMPs ainda inativas, impedindo a ativação (TROEBERG; NAGASE, 2007). Embora se acredite que a maioria dos efeitos biológicos celulares das TIMPs seja mediada indiretamente pela inibição das MMPs, já se conhece seus efeitos diretos na promoção do crescimento celular (FASSINA *et al.*, 2000; MURPHY; UNSWORTH; STETLER-STEVENSON, 1993). A TIMP1 estimula quinases de vias de sobrevivência e proliferação celular (LI; FRIDMAN; KIM, 1999) enquanto a TIMP3 aumenta a apoptose em células musculares (BAKER *et al.*, 1998).

Embora o presente trabalho não tenha avaliado a interação proteína-proteína, observamos maior expressão de mRNA das *TIMP1* e *TIMP3* no tratamento vaca de descarte. A expressão de mRNA das *TIMP1* e *TIMP3* são estimuladas por fatores de crescimento, diferentemente da *TIMP2*, no qual fatores de crescimento inibem sua expressão (FASSINA *et*

*al.*, 2000). Portanto, vacas de descarte podem ter apresentado maior abundância de fatores de crescimento na circulação sanguínea, uma vez que não observamos diferenças na expressão de mRNA da *TIMP2* e observamos aumento na abundância de mRNA das *TIMP1* e *TIMP3*, sugerindo que fatores de crescimento atuaram nesta via de sinalização. Consequentemente o aumento de fatores de crescimento na circulação de vacas descarte desencadeou a ativação de fatores de transcrição, aumentando a expressão de mRNA das *TIMPs* paralelamente a expressão de mRNA das *MMPs*, uma vez que a expressão de mRNA das *MMPs* e das *TIMPs* podem ser estimuladas por fatores de crescimento, como as VEGF, bFGF, TGFs (FASSINA *et al.*, 2000; SALVADORI *et al.*, 2005; VESSILLIER; ADAMS; CHERNAJOVSKY, 2004). Hayakawa *et al.*, (1992) demonstraram o efeito da *TIMP1* na proliferação celular no tecido pulmonar, o que nos leva a crer que no presente estudo a *TIMP1* acionou a via de sinalização de proliferação celular no tecido conjuntivo, desencadeando maior síntese de fibroblastos e consequentemente maior síntese de *COL3A1*, que compõe a matriz extracelular. Além disso, a maior expressão de *TIMP3* pode levar a maior abundância de proteínas que acionaram vias de apoptose para maior renovação do tecido conjuntivo (FASSINA *et al.*, 2000).

Paralelamente, observamos tendência de aumento na expressão de mRNA da *MMP2* no tratamento vaca de descarte e equivalência na expressão de mRNA da *MMP9* entre as idades. Sabe-se que as *MMPs* são expressas em nível baixo em tecido adulto (MANNELLO; MEDDA, 2012). Portanto esses resultados indicam aumento na degradação da matriz extracelular no tratamento vaca de descarte em relação á novilhas, aumentando o *turnover* (VISSE; NAGASE, 2003). Todavia a maior atividade enzimática das *MMPs* acionam sua inibição pelas *TIMPs* (TROEBERG; NAGASE, 2007). Assim, a inibição das *MMPs* pelas *TIMPs* pode ter ocasionado feedback negativo, aumentando a expressão de mRNA das *MMPs* como forma de compensar a inibição, além do estímulo direto a síntese de mRNA por fatores de crescimento (FASSINA *et al.*, 2000; VESSILLIER; ADAMS; CHERNAJOVSKY, 2004).

Em resumo, a maior expressão de mRNA das *TIMPs* e *COL3A1* aliada a tendência do aumento na expressão de mRNA da *MMP2* no tratamento vaca de descarte em relação á novilhas e níveis iguais tanto na expressão de mRNA da *MMP9* como na atividade da lisil oxidase entre as idades, leva à crer que houve alteração no *turnover* e na solubilidade do colágeno no tecido conectivo intramuscular das vacas de descarte. A alteração foi propiciada a nível de síntese do tecido conectivo intramuscular, com a formação de novas moléculas de colágeno, bem como pela remodelagem, propiciado pela menor atividade da lisil oxidase, maior abundância de mRNA das *TIMPs*, além da tendência de aumento na expressão de mRNA da

*MMP2* e níveis de expressão de mRNA da *MMP9* que aumentaram a ponto de se igualarem ao tratamento controle.

A maciez da carne é influenciada tanto pelo *cross-linking* do tecido conectivo intramuscular quanto pelo marmoreio (MIAO *et al.*, 2016). Portanto a melhora do *turnover* da matriz extracelular juntamente com maior deposição de gordura intramuscular pode ser responsável pela maior maciez da carne observada no tratamento vaca de descarte.

## **6 CONCLUSÃO**

Os dados obtidos sugerem alteração no remodelamento e aumento na renovação do colágeno intramuscular em vacas de descarte em comparação à novilhas sob dieta de alta densidade energética. Contudo, tais alterações não foram suficientes para causar equivalência da solubilidade do colágeno intramuscular entre vacas de descarte e novilhas.

## REFERÊNCIAS

ABERLE, E. D.; REEVES, E. S.; JUDGE, M. D.; HUNSLEY, R. E.; Perry, T. W. Palatability and Muscle Characteristics of Cattle with Controlled Weight Gain: Time on a High Energy Diet. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 4, p. 757–763, abr, 1981.

ARCHILE-CONTRERAS, A. C.; MANDELL, I. B.; PURSLOW, P. P. Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 491–497, mar, 2010.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N. D. **Connective tissue in meat and meat products**. London Elsevier Applied Science, 1989.

BAKER, A. H.; ZALTSMAN, A. B.; GEORGE, S. J.; NEWBY, A. C. . Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 6, p. 1478–1487, mar. 1998.

BALCERZAK, D.; QUERENGESSER, L.; DIXON, W. T.; BARACOS, V. E. . Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 94–107, jan. 2001.

BRUCE, H. L.; STARK, J. L.; BEILKEN, S. L. The effects of finishing diet and postmortem ageing on the eating quality of the M. longissimus thoracis of electrically stimulated Brahman steer carcasses. **Meat Science**, v. 67, p. 261-268, oct. 2004.

CHRISTENSEN, S.; PURSLOW, P. P. The role of matrix metalloproteinases in muscle and adipose tissue development and meat quality: A review. **Meat Science**, v. 119, p. 138–146, april 2016.

CLARK, I. M.; SWINGLER, T. E.; SAMPIERI, C. L.; EDWARDS, D. R. . The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, p. 1362-1378 jun. 2008.

COUVREUR, S.; BEC, G. L; MICOL, D.; PICARD, B Relationships Between Cull Beef Cow Characteristics, Finishing Practices and Meat Quality Traits of Longissimus thoracis and Rectus abdominis. **Foods**, v. 8, p. 141, April 2019.

CROSS, H. R.; CARPENTER, Z. L.; SMITH, G. C. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 6, p. 998–1003, 1973.

DANNE, T.; Gruters, A.; SCHUPPAN, D.; QUANTAS, N.; ENDERS, I.; WEBER, B. Relationship of procollagen type III propeptide-related antigens in serum to somatic growth in healthy children and patients with growth disorders. **The Journal of Pediatrics**, v. 114, n. 2, p. 257–260, 1989.

DECOLOGNE, N.; KOLB, M.; MARGETTS, P. J.; MENETRIER, F.; ARTUR, Y.; GARRIDO, C.; GAULDIE, J.; CAMUS, P.; BONNIAUD, P. TGF- $\beta$ 1 Induces Progressive Pleural Scarring and Subpleural Fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6043–

6051, nov. 2007.

DETMANN, E. *et al.* **Métodos para análise de alimentos** 1.ed. Inst. Nac. Ciência e Tecnol. Ciência Anim. p. 214 2012.

DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J.; UNDERWOOD, K. R.; ZHU, M.; FORD, S. P.; NATHANIELSZ, P. W. . Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal of animal science**, v. 88, p. E51-E60, 2009.

DU, M.; ZHAO, J. X.; YAN, X.; HUANG, Y.; NICODEMUS, L. V.; YUE, W.; MCCORMICK, R. J.; ZHU, M. J. Fetal muscle development, mesenchymal multipotent cell differentiation, and associated signaling pathways. **Journal Animal Science**, v. 89, p. 583–590, 2011.

DU, M.; HUANG, Y.; DAS, A. K.; YANG, Q.; DUARTE, M. S.; DODSON, M. V.; ZHU, M. J. Meat science and muscle Biology Symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1419–1427, mar. 2013.

DU, M.; MCCORMICK, R. J. **Applied muscle biology and meat science**. New York: CRC Press, 2009.

DUARTE, M. S.; PAULINO, P. V. R.; FONSECA, M. A.; DINIZ, L. L.; CAVALI, J.; SERÃO, N. V. L.; GOMIDE, L. A. M.; REIS, S. F.; COX, R. B. . Influence of dental carcass maturity on carcass traits and meat quality of Nelore bulls. **Meat Science**, v. 88, n. 3, p. 441–446, jul. 2011.

EDWARDS-CALLAWAY, L. N.; WALKER, J.; TUCKER, C. B. Culling decisions and dairy cattle welfare during transport to slaughter in the United States. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 1–5, jan. 2019.

EGGEN, A.; HOCQUETTE, J. F. Genomic approaches to economic trait loci and tissue expression profiling: Application to muscle biochemistry and beef quality. **Meat Science**, v.66, p. 1-9, 2003.

FASSINA, G. *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 18, p. 111–120, 2000.

FISHELL, V. K.; ABERLE, E. D.; JUDGE, M. D.; PERRY, T. W. Palatability and Muscle Properties of Beef as Influenced by Preslaughter Growth Rate. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 1, p. 151–157, jul. 1985.

FRENCH, P.; O'RIORDAN, E. G.; MONAHAN, F. J.; CAFFREY, P. J.; MOONEY, M. T.; TROY, D. J.; MOLONEY, A. P. The eating quality of meat of steers fed grass and/or concentrates. **Meat Science**, v. 57, p. 379–386, 2001.

GRAHAM, W. C.; PRICE, M. A. Feedlot performance and carcass composition of cull cows of different ages. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 62, n. 3, p. 845–854, set. 1982.

HAYAKAWA, T.; YAMASHITA, K.; TANZAWA, K.; UCHIJIMA, E.; IWATA, K. Growth-

promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells  
A possible new growth factor in serum. **FEBS Letters**, v. 298, n. 1, p. 29–32, fev. 1992.

HOCQUETTE, J. F. Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle. **Animal**, v. 4, n. 11, p. 1797–1809, 2010.

KARSDAL, M. A.; GENOVESE, F.; MADSEN, E. A.; MANON-JENSEN, T.; SCHUPPAN, D. Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 103–109, 2016.

KENNEDY, L.; SHI-WEN, X.; CARTER, D. E.; ABRAHAM, D. J.; LEASK, A. Fibroblast adhesion results in the induction of a matrix remodeling gene expression program. **Matrix Biology**, v.27, p. 274-281, jan 2008.

KOVANEN, V.; SUOMINEN, H. Age-and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. **Applied Journal of Physiology and Occupational Physiology**, v. 58, p. 765–771, 1989.

LATORRE, M. E.; LIFSCHITZ, A. L.; PURSLOW, P. P. New recommendations for measuring collagen solubility. **Meat Science**, v. 118, p. 78-81, mar 2016.

LEPETIT, J. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. **Meat Science**, v. 80, p. 960–967, 2008.

LI, G.; FRIDMAN, R.; KIM, H.-R. C. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Inhibits Apoptosis of Human Breast Epithelial Cells. **Cancer Res.**, v. 59, n. 3, p. 6267-6275 dez. 1999.

LIGHT, N.; CHAMPION, A. E.; VOYLE, C.; BAILEY, A. J. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. **Meat Science**, v. 13, p. 137–149, 1985.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, p.402-408, 2001.

MANDELL, I. B.; BUCHANAN-SMITH, J. G.; CAMPBELL, C. P. Effects of Forage vs Grain Feeding on Carcass Characteristics, Fatty Acid Composition, and Beef Quality in Limousin-Cross Steers When Time on Feed is Controlled. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 10, p. 2619–2630, 1998.

MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 27–58, mar. 2012.

MCCORMICK, R. J. The flexibility of the collagen compartment of muscle. **Meat Science**, v. 36, p. 79–91, 1994.

MIAO, Z. G.; ZHANG, L. P.; FU, X.; YANG, Q. Y.; ZHU, M. J.; DODSON, M. V.; DU, M. Invited review: Mesenchymal progenitor cells in intramuscular connective tissue development. **Animal**, v. 10, n. 1, p. 75–81, jul. 2016.

MILLER, M. F.; CROSS, H. R.; CROUSE, J. D.; JENKINS, T. G. . Effect of feed energy intake

on collagen characteristics and muscle quality of mature cows. **Meat Science**, v. 21, n. 4, p. 287–294, 1987.

MODZELEWSKA-KAPITUŁA, M.; NOGALSKI, Z. The influence of diet on collagen content and quality attributes of infraspinatus muscle from Holstein-Friesian young bulls. **Meat Science**, v. 117, p. 158–162, jul. 2016.

MURPHY, A. N.; UNSWORTH, E. J.; STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 157, n. 2, p. 351–358, 1993.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **Genes & Expression**. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 10 jan. 2020.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 947–966, dez. 2002.

PURSLOW, P. P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 435–447, 2005.

PURSLOW, P. P.; ARCHILE-CONTRERAS, A. C.; CHA, M. C. Meat science and muscle biology symposium: Manipulating meat tenderness by increasing the turnover of intramuscular connective tissue. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, p. 950–959, 2012.

RYAN, T. P. **Sample Size Determination and Power**. New Jersey: Wiley, 2013.

SALVADORI, C.; PETERS, I. R.; DAY, M. J.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Muscle regeneration, inflammation, and connective tissue expansion in canine inflammatory myopathy. **Muscle and Nerve**, v. 31, n. 2, p. 192–198, fev. 2005.

TROEBERG, L.; NAGASE, H. **Analysis of TIMP Expression and Activity in Arthritis Research: Methods and Protocols** ed by Cope A.P. London: Springer, p. 251-267, 2007.

VANDENBROUCKE, R. E.; LIBERT, C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 12, p. 904–927, dez. 2014.

VESSILLIER, S.; ADAMS, G.; CHERNAJOVSKY, Y. Latent cytokines: Development of novel cleavage sites and kinetic analysis of their differential sensitivity to MMP-1 and MMP-3. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 17, n. 12, p. 829–835, dez. 2004.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, may 2003.

WOESSNER, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 93, p. 440-447, jan 1961.

WOOTEN, R. A.; ROUBICEK, C. B.; MARCHELLO, J. A.; DRYDEN, F. D.; SWINGLE, R. S. Realimentation of cull range cows. 2. Changes in carcass traits. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 4, p. 823–830, 1979.

WYTHES, J. R.; SHORTHOSE, W. R.; FORDYCE, G.; UNDERWOOD, D. W. Pregnancy effects on carcass and meat quality attributes of cows. **Animal Production**, v. 51, n. 3, p. 461–468, 1990.

ZHAO, J. X.; LIU, X. D.; ZHANG, J. X. , Y, W.; LI, H. Q. Effect of different dietary energy on collagen accumulation in skeletal muscle of ram lambs. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 8, p. 4200–4210, ago. 2015.