

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROTEÔMICA EM TECIDO
RUMINAL DE BOVINOS NELORE (*Bos indicus*): IMPACTO DA
ALIMENTAÇÃO E RELAÇÃO COM A EMISSÃO DE METANO**

Mykaelli Andrade Santos*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA.

Orientadora: Ana Rita de Araujo Nogueira

*** bolsista (CAPES)**

**São Carlos - SP
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mykaelli Andrade Santos, realizada em 23/05/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Prof. Dr. Welder Angelo Baldassini (UNESP)

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso (IQSC/USP)

Profa. Dra. Gisele Simone Lopes (UFC)

Prof. Dr. Gian Paulo Giovanni Freschi (UNIFAL)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*"O sucesso nasce do querer, da determinação e
persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e
vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."*

José de Alencar

Aos meus pais Givanda e Valter e a minha irmã Mychelli por todo amor dedicado e por me ajudar a tornar esse sonho possível.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus, por todas as oportunidades que me foram concedidas, pela força e coragem ao longo desta longa caminhada.

À minha família, minha mãe, Givanda, meu pai, Valter, e minha irmã, Mychelli, agradeço pelo amor incondicional e apoio constante durante toda a minha jornada acadêmica. Sem vocês, nada disso seria possível. Estendo meu carinho aos meus avós, tios e primos, por todo incentivo e torcida ao longo do caminho.

Ao meu noivo, Carlos, sou grata pelo amor, paciência e por estar ao meu lado em cada etapa, tanto na vida quanto na pesquisa.

Minha sincera gratidão à minha orientadora, Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pelos seis anos de orientação. Obrigada por acreditar em mim desde o mestrado, pela confiança, pelas parcerias acadêmicas, pelas conversas e pelo carinho com que sempre me tratou. Sua postura é um verdadeiro exemplo de profissionalismo e humildade, foi mais que orientadora, foi família em São Carlos.

À Profa. Dra. Tamara García Barrera, agradeço pela valiosa experiência durante meu estágio na Espanha. Aos membros de seu grupo de pesquisa, Jesús, Rafael, Belén e Cristina, muito obrigada pelo acolhimento e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus grandes amigos de São Carlos, Ivero e Mikael, agradeço por estarem sempre dispostos a me ajudar, a ouvir minhas angústias e por me incentivarem em todos os momentos. A amizade e apoio de vocês foram, com certeza, fundamentais durante esse processo.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Análise Instrumental Aplicada (GAIA), obrigada pela convivência e experiências compartilhadas.

Agradeço ao Gabriel Alexander pela parceria no desenvolvimento deste trabalho e pelo suporte nas análises estatísticas e de bioinformática.

Sou grata ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de desenvolver este trabalho, com um reconhecimento especial às secretárias Luciani, Cristina e Thainá, pelo suporte sempre que necessário.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, agradeço pelo suporte e colaboração ao longo desses anos.

Agradeço ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela oportunidade de realizar análises de espectrometria de massas (processo nº 2022118, *Exploratory analysis of metalloproteomics in rumen tissue and muscle of Nelore cattle (Bos taurus indicus) aiming the association with rumen and intestine microbiomes*) e à Dra. Romênia Ramos Domingues por sua assistência técnica.

Agradeço também aos professores Paolo Di Mascio e Graziella E. Ronsein, pelas análises realizadas no Núcleo de Proteômica Redox do Recurso de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (processos FAPESP números 2012/12663-1, 2023/00995-4, CEPID Redoxoma 2013/07937-8), e à Dra. Mariana P. Massafera por sua assistência técnica.

Reconheço com gratidão o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado (Processo nº 88887.607120/2021-00) e de estágio de pesquisa no exterior (Processo nº 88887.936674/2024-00), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2019/04089-2) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Por fim, meu muito obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIACOES

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

AGVs – Ácidos graxos voláteis

ATP – Adenosina trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CID – Dissociação induzida por colisão (*Collision-induced Dissociation*)

Conv – Convencional

DAPs – Proteínas diferencialmente abundantes (*Differentially Abundant Proteins*)

DDA – Aquisição dependente de dados (*Data-dependent Acquisition*)

DTT – Ditioneitol

eFASP – FASP aprimorado (*Enhanced FASP*)

EM – Emissão de metano

ERM – Emissão residual de metano

ESI – Ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*)

FASP – Preparação de amostra auxiliada por filtro (*Filter-Assisted Sample Preparation*)

FDN – Fibra em detergente neutro

FDR – Taxa de descoberta falsa (*False Discovery Rate*)

GEE – Gases de efeito estufa

GO – Ontologia genética (*Gene Ontology*)

H – Alto (*High*)

HCD – Dissociação colisional de alta energia (*Higher-energy Collisional Dissociation*)

HG – *High Grain*

HPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (*High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*)

iTRAQ – Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (*Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*)

L – Baixo (*Low*)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*)

LFQ – Quantificação livre de rótulos (*Label Free Quantification*)

m/z – massa/carga

MED-FASP – Preparação de amostra auxiliada por filtro de digestão multienzimática (*Multi-enzyme Digestion Filter-Aided Sample Preparation*)

MS – Matéria seca

PIB – Produto interno bruto

PPI – Interação proteína-proteína (*Protein-Protein Interaction*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Subp – Subproduto

TMT – Marcação de massa em tandem (Tandem Mass Tag)

TOF – Analisador de tempo de voo (*Time of Flight*)

2D DIGE – Eletroforese em gel diferencial bidimensional (*Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis*)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Parâmetros instrumentais utilizados na análise de peptídeos por UHPLC-MS/MS.....	22
TABELA 1.2 - Lista de proteínas diferenciais abundantes (DAPs) identificadas no tecido ruminal dos grupos alimentados com dieta convencional (Conv) e com dieta composta por subprodutos (Subp).....	25
TABELA 2.1 - Parâmetros instrumentais utilizados na análise de peptídeos por nLC-MS/MS.....	40
TABELA 2.2 - Lista das proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) no tecido ruminal dos grupos de emissão residual de metano alta (H) e baixa (L).....	44

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas e quantificadas exclusivamente no tecido ruminal bovino dos animais alimentados com subproduto (lado esquerdo) e com dieta convencional (lado direito), bem como aqueles comuns a ambos os grupos (centro)..... 24
- FIGURA 1.2 - Gráfico de vulcão. Apresenta os valores de p ANOVA (eixo y) plotados em relação aos valores log₂ relacionado às mudanças nas dobras de proteínas (eixo x) para análise quantitativa da abundância de proteínas, comparando os grupos alimentados com dieta convencional e subprodutos. Os pontos vermelhos e azuis indicam, respectivamente, proteínas significativamente reguladas positivamente e negativamente ($p < 0,05$). (Os nomes completos das proteínas podem ser consultados na Tabela 1)..... 26
- FIGURA 1.3 - Representação dos termos significativamente enriquecidos na análise de ontologia gênica (GO) associados às proteínas identificadas exclusivamente nos grupos alimentados com subprodutos e com dieta convencional.....27
- FIGURA 1.4 - Redes de interação proteína-proteína preditas pelo software String 12.0 a partir da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos alimentados com dieta convencional e subprodutos (A); proteínas identificadas exclusivamente no grupo conv. (B); proteínas identificadas exclusivamente no grupo subp. (C) no tecido ruminal bovino. Os nós são proteínas do banco de dados *Bos taurus* e as bordas representam diferentes evidências das anotações funcionais previstas (linha vermelha - fusão; linha verde - vizinhança; linha azul - co-ocorrência; linha roxa - experimental; linha amarela - mineração de texto; linha azul clara - banco de dados; linha preta - co-expressão).....29
- FIGURA 2.1 - Componentes do sistema GreenFeed empregados na medição da produção de CH₄ em ruminantes. Fonte: HRISTOV et al., 2015.....39
- FIGURA 2.2 - Diagrama de Venn ilustrando o número de proteínas identificadas e quantificadas exclusivamente no tecido ruminal de bovinos com emissões residuais de metano altas (lado direito) e baixas (lado esquerdo), bem como as proteínas compartilhadas entre os dois grupos (área central)..... 43
- FIGURA 2.3 - Gráfico de vulcão representando os valores de p ANOVA (eixo y) em função dos valores log₂ das variações nas dobras de proteínas (eixo x), comparando quantitativamente a abundância proteica entre os grupos com baixa e alta emissão residual de metano. Os pontos vermelhos indicam proteínas significativamente reguladas positivamente, enquanto os pontos azuis representam aquelas reguladas negativamente ($p < 0,05$). (Os nomes completos das proteínas estão listados na TABELA 2.2.)..... 45
- FIGURA 2.4 - Termos significativamente enriquecidos na análise de ontologia gênica (GO) associados às proteínas diferencialmente abundantes e às proteínas exclusivas dos grupos com baixa (L) e alta (H) emissão residual de metano.....47

FIGURA 2.5 - Redes de interação proteína-proteína preditas pelo software STRING 12.0, construídas a partir das proteínas do tecido ruminal bovino: (A) Proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos de baixa e alta emissão residual de metano (ERM); (B) Proteínas exclusivas do grupo de alta ERM; (C) Proteínas exclusivas do grupo de baixa ERM. OEm cada rede, os nós representam proteínas de *Bos taurus* e as arestas indicam os tipos de evidência para a interação funcional (vermelha: fusão; verde: vizinhança; azul escuro: co-ocorrência; roxa: experimental; amarela: mineração de texto; azul claro: bancos de dados; preta: co-expressão)....48

RESUMO

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROTEÔMICA EM TECIDO RUMINAL DE BOVINOS NELORE (*Bos indicus*): IMPACTO DA ALIMENTAÇÃO E RELAÇÃO COM A EMISSÃO DE METANO. Com o emprego de abordagens proteômicas a presente tese explora os mecanismos moleculares adaptativos do tecido ruminal de bovinos Nelore (*Bos indicus*) em resposta a duas intervenções nutricionais e à variação nas emissões residuais de metano. No primeiro capítulo são comparados os perfis proteômicos de touros submetidos a uma dieta convencional, rica em milho em grão e a uma dieta formulada com subprodutos agroindustriais. Os resultados demonstraram que a composição proteica do rúmen é significativamente modulada pela dieta, evidenciando adaptações celulares específicas. Entre os achados, destacam-se 7 proteínas diferencialmente abundantes relacionadas à estrutura, remodelação da matriz extracelular, organização do citoesqueleto, regulação celular e homeostase do ferro, como a redução da expressão da FTH1 na dieta com subprodutos, sugerindo menor estresse oxidativo e inflamação, além da regulação positiva de 6 proteínas que indicam adaptações estruturais e metabólicas no tecido ruminal. No segundo capítulo foram investigados os mecanismos que regulam a emissão de metano, potente gás de efeito estufa, através da análise comparativa do perfil proteico do tecido ruminal em bovinos com diferentes níveis de emissão residual de metano (ERM). Utilizando uma abordagem proteômica “shotgun”, foram identificadas 37 proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos de alta e baixa emissão. Os dados revelaram que no grupo de baixa emissão, proteínas associadas à degradação proteica e ao metabolismo energético são mais abundantes, sugerindo fermentação mais eficiente e, conseqüentemente, menor produção de metano. Em contraste, o grupo de alta emissão apresentou maior regulação de proteínas ligadas à síntese proteica, biossíntese lipídica e respostas imunes, apontando para uma menor eficiência metabólica. Em conjunto, os resultados desta tese fornecem informações sobre os mecanismos moleculares que regulam tanto a adaptação do tecido ruminal a diferentes perfis nutricionais quanto a produção de metano. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias nutricionais que melhorem a eficiência alimentar e reduzam as emissões de gases de efeito estufa na pecuária de corte.

ABSTRACT

EXPLORATORY ANALYSIS OF PROTEOMIC IN RUMINAL TISSUE OF NELORE CATTLE (*Bos indicus*): IMPACT OF FEEDING AND RELATIONSHIP WITH METHANE EMISSIONS. Through proteomic approaches, this thesis explores the molecular adaptive mechanisms of the ruminal tissue in Nelore cattle (*Bos indicus*) in response to different nutritional interventions and variations in residual methane emissions. In the first chapter, the proteomic profiles of steers fed a conventional diet rich in corn grain were compared to those of steers receiving a diet formulated with agro-industrial by-products. The results demonstrated that the protein composition of the rumen is significantly modulated by the diet, reflecting specific cellular adaptations. The findings identified seven differentially abundant proteins related to structure, extracellular matrix remodeling, cytoskeletal organization, cellular regulation, and iron homeostasis. Notably, the reduced expression of FTH1 in the by-product diet suggests lower oxidative stress and inflammation. At the same time, the upregulation of six proteins indicates structural and metabolic adaptations within the ruminal tissue. In the second chapter, the thesis investigates the molecular mechanisms regulating methane emissions, a potent greenhouse gas, through a comparative analysis of the ruminal proteomic profile in cattle with differing residual methane emissions (RME) levels. Utilizing a shotgun proteomics approach, 37 differentially abundant proteins were identified between the high and low-emission groups. The data revealed that, in the low-emission group, proteins associated with protein degradation and energy metabolism were more abundant, suggesting more efficient fermentation and consequently reduced methane production. Conversely, the high-emission group exhibited upregulation of proteins involved in protein synthesis, lipid biosynthesis, and immune responses, which may indicate lower metabolic efficiency. Overall, the findings of this thesis provide new insights into the molecular mechanisms governing both the adaptive responses of ruminal tissue to varying nutritional profiles and methane production. These results may contribute to developing nutritional strategies to enhance feed efficiency and reduce greenhouse gas emissions in beef cattle production.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Pecuária no Brasil.....	3
Rúmen.....	4
Proteômica.....	5
Fluxo de trabalho para proteômica <i>bottom-up</i>	7
Preparação da amostra.....	7
Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).....	10
Análise de dados.....	11
Abordagem proteômica na produção animal.....	12
CAPÍTULO 1.....	15
<i>Impacto Nutricional na Proteômica do Tecido Ruminal de Bovinos Nelore: Uma Análise Comparativa entre Dieta Convencional e Dieta com Subprodutos Agroindustriais</i>	15
1.1 – INTRODUÇÃO.....	16
1.2 – OBJETIVOS.....	18
1.2.1 – Objetivo geral.....	18
1.2.1 – Objetivos específicos.....	18
1.3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	19
1.3.1 – Desenho experimental e coleta de amostras.....	19
1.3.2 – Extração das proteínas teciduais.....	20
1.3.3 – Determinação da concentração total das proteínas.....	20
1.3.4 – Preparação das amostras para análise LC-MS/MS.....	21
1.3.5 – Análise em espectrômetro de massas.....	22
1.3.6 – Parâmetros de processamento e pesquisa em banco de dados.....	23
1.3.7 – Análise estatística.....	24
1.3.8 – Análises de bioinformática.....	24
1.4 – RESULTADOS.....	25
1.4.1 – Dados proteômicos.....	25
1.4.2 – Análise de ontologia genética.....	27
1.4.3 – Análise de redes de interação proteína-proteína.....	29

1.5 – DISCUSSÃO.....	31
1.5.1 – Proteínas exclusivas.....	33
1.6 – CONCLUSÃO.....	34
CAPÍTULO 2.....	36
<i>Caracterização proteômica do tecido ruminal de bovinos Nelore divergentes para emissão residual de metano.....</i>	<i>36</i>
2.1 – INTRODUÇÃO.....	37
2.2 – OBJETIVOS.....	38
2.2.1 – Objetivo geral.....	38
2.2.1 – Objetivos específicos.....	38
2.3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	39
2.3.1 – Desenho experimental e coleta de amostras.....	39
2.3.2 – Extração das proteínas e preparação das amostras para espectrometria de massas.....	40
2.3.3 – Análise das amostras em nLC-MS/MS.....	41
2.3.4 – Análise de dados proteômicos.....	42
2.3.5 – Análise estatística e de bioinformática.....	42
2.3.6 – Emissão residual de metano.....	43
2.4 – RESULTADOS.....	43
2.4.1 – Dados proteômicos.....	43
2.4.2 – Análise de enriquecimento funcional.....	47
2.4.3 – Análise de redes de interação proteína-proteína.....	48
2.5 – DISCUSSÃO.....	51
2.5.1 – Proteínas diferencialmente abundantes.....	51
2.5.1 – Proteínas exclusivas para os grupos de baixa e alta ERM.....	53
2.6 – CONCLUSÕES.....	56
CONCLUSÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICES	

INTRODUÇÃO

A produção de carne e leite enfrenta desafios significativos, tanto em termos de produtividade quanto de sustentabilidade ambiental. Na pecuária de corte, a alimentação representa um dos maiores custos, estando intimamente ligada à eficiência na conversão de ração em carne e, conseqüentemente, à produtividade dos ruminantes (HUWS et al., 2018). Além do impacto direto na produtividade, a alimentação influencia a composição e a atividade microbiana do rúmen, o qual, por sua vez, determina os processos fermentativos e a eficiência na degradação de fibras. Essas adaptações estruturais e funcionais do epitélio ruminal, evidenciadas por rápidas respostas genômicas e morfológicas, têm sido amplamente estudadas, especialmente em dietas ricas em concentrado que modificam o pH e as características de absorção (GUO et al., 2019). Em paralelo, a utilização de subprodutos provenientes da agroindústria, que agregam valor a alimentos não destinados ao consumo humano, tem ganhado destaque como estratégia para reduzir custos e minimizar os impactos ambientais, aproveitando seu elevado valor nutricional (CORREDDU et al., 2020).

A mitigação das emissões de gases de efeito estufa, especialmente do metano, é essencial, uma vez que possui potencial de aquecimento global significativamente superior ao do dióxido de carbono (BICA et al., 2020). A fermentação entérica, principal fonte de metano em ruminantes, está diretamente associada aos processos metabólicos do rúmen (DUTHIE et al., 2015). Assim, compreender os mecanismos moleculares que regulam esses processos é crucial para desenvolver intervenções nutricionais que simultaneamente aumentem a eficiência alimentar e reduzam as emissões de metano.

Ferramentas bioquímicas, como a proteômica, têm se mostrado altamente aplicáveis à ciência animal ao possibilitar a compreensão aprofundada dos processos biológicos, bem como a identificação do perfil proteico e de suas funções, permitindo maior assertividade e inferência na nutrição e metabolismo animal (BENDIXEN et al., 2011). Conforme observado por LOOR et al. (2015), há uma tendência marcante de integrar ferramentas proteômicas à biologia de sistemas, nutrição, fisiologia e metabolismo, com o objetivo de elucidar como as proteínas

regulam vias metabólicas e como a síntese e degradação dessas macromoléculas impactam fenótipos complexos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pecuária no Brasil

A bovinocultura de corte no Brasil desempenha um papel fundamental na economia nacional e no cenário global de produção e exportação de carne bovina. O país consolidou-se como o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina do mundo (ABIEC, 2024), sendo um dos principais fornecedores para mercados exigentes como China, Estados Unidos e União Europeia.

De acordo com os dados publicados no relatório anual da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2024), o Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com uma estimativa de 197 milhões de cabeças, representando aproximadamente 12% da população bovina global. Em relação à produção de carne, o país manteve a segunda posição em 2023, alcançando um volume de 10,6 milhões de toneladas equivalentes de carcaça, o que corresponde a 13,8% da produção mundial. No cenário das exportações, o Brasil lidera o mercado global, sendo responsável pelo envio de 18,7% de toda a carne comercializada no mundo, seguido em volume pela Austrália, Estados Unidos e Argentina (ABIEC, 2024).

O rebanho brasileiro é predominantemente composto por animais zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzados. Essa predominância se deve a características adaptativas desses animais, como rusticidade, resistência a parasitas, eficiência na conversão alimentar e adaptação a sistemas extensivos de produção (CARVALHO, 2008; ACNB, 2014). Em contrapartida, uma das limitações frequentemente apontadas para a carne de *Bos indicus*, especialmente em comparação com *Bos taurus*, como a raça Angus, é sua menor maciez (LAGE et al., 2012; CARVALHO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

O setor agroindustrial da carne bovina apresenta uma participação expressiva no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, o setor movimentou em 2023 R\$895 bilhões, cerca de 8,2% do PIB brasileiro (ABIEC, 2024). Esse número reflete a relevância da pecuária para a segurança alimentar e o desenvolvimento do agronegócio nacional. Diante desse cenário, a busca por melhorias na qualidade da carne, aliada à manutenção da eficiência produtiva e sustentabilidade ambiental, é essencial para que o Brasil continue liderando o mercado mundial de carne bovina. O

aprimoramento das cadeias produtivas e a adoção de inovações tecnológicas são fatores-chave para garantir a competitividade e atender às demandas dos consumidores globais.

Rúmen

O rúmen bovino desempenha um papel essencial na digestão dos alimentos e na absorção de nutrientes, sendo o maior compartimento do estômago dos ruminantes e o principal local de fermentação microbiana (ANDERSEN et al., 2021). Essa fermentação permite a conversão de materiais vegetais complexos em nutrientes utilizáveis pelo animal, garantindo grande parte de suas necessidades energéticas. Estudos indicam que os ácidos graxos voláteis (AGVs) produzidos e absorvidos no rúmen podem suprir até 70% da demanda energética dos ruminantes (BERGMAN, 1990; PENNER et al., 2011), destacando a importância desse órgão na homeostase metabólica e na eficiência alimentar.

A microbiota ruminal é altamente diversificada, contendo bactérias, protozoários, fungos e arqueas que atuam sinergicamente na degradação da matéria orgânica. Esses microrganismos desempenham um papel crucial na conversão de carboidratos estruturais, como a celulose, em AGVs, os quais são absorvidos pelo epitélio ruminal e utilizados para síntese de ATP (PENNER et al., 2011). O ATP, por sua vez, é essencial para funções fisiológicas como a manutenção da barreira epitelial, proliferação celular, absorção de nutrientes e resposta imune do epitélio gastrointestinal (HU et al., 2024).

O epitélio ruminal é altamente adaptável e atua como a primeira linha de defesa contra fatores adversos, como variações no pH, pressão osmótica elevada e metabólitos potencialmente prejudiciais, incluindo lipopolissacarídeos e histamina (PENNER et al., 2011; GUO et al., 2019). A alimentação com dietas ricas em grãos tem sido amplamente estudada por seu impacto na morfologia (BANNINK et al., 2008) e função do epitélio ruminal (UPPAL et al., 2003). Pesquisas demonstram que dietas HG podem aumentar a superfície absorptiva do rúmen devido ao crescimento das papilas ruminais, além de influenciar a barreira epitelial e as respostas imunológicas.

A plasticidade do epitélio ruminal diante das variações dietéticas tem sido explorada por meio de abordagens ômicas, que possibilitam uma compreensão mais ampla das mudanças globais em suas funções fisiológicas (BONDZIO et al.,

2011; SUN et al., 2021). A aplicação de técnicas genômicas, proteômicas e metabolômicas tem permitido investigações detalhadas sobre os mecanismos biológicos que regulam a adaptação do rúmen, com implicações para o desempenho animal e para a mitigação de efeitos negativos associados à alimentação rica em grãos (GUO et al., 2019).

Além de seu papel na nutrição animal, o rúmen tem relevância ambiental, uma vez que a fermentação microbiana gera subprodutos como metano e nitrogênio residual, que impactam o meio ambiente (PFEFFER et al., 2007; MOSS et al., 2000). Compreender a composição e a funcionalidade do rúmen é fundamental não apenas para otimizar a produção animal, mas também para promover a sustentabilidade na pecuária. Pesquisas interdisciplinares sobre a microbiota ruminal e suas interações metabólicas são promissoras para a inovação em dietas e manejo alimentar, com o objetivo de equilibrar a produtividade e a saúde animal com a conservação ambiental (GRESSLEY et al., 2011; WANG et al., 2012; SNELLING et al., 2017).

Proteômica

A proteômica é uma área da biologia molecular dedicada ao estudo do proteoma, isto é, o conjunto completo de proteínas expressas por um organismo, célula ou tecido em um dado momento (WILKINS et al., 1996). Surgiu no final da década de 1970, quando pesquisadores passaram a criar bases de dados de proteínas utilizando a então moderna técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). Após o sucesso do sequenciamento dos genomas de diversos organismos, a comunidade científica concluiu que, para entender completamente a função dos genes, era necessário realizar estudos em larga escala das proteínas expressas. Foi constatado que, embora a análise das sequências de nucleotídeos seja importante, ela não reflete necessariamente os níveis de expressão proteica nem a atividade biológica associada (GYGI et al., 1999).

Ao complementar as informações oriundas de outras abordagens “ômicas”, como a genômica, os estudos proteômicos proporcionam uma visão holística dos processos biológicos dinâmicos, contribuindo para a compreensão de como fatores genéticos e ambientais regulam as funções celulares (SMIRNOVA et al., 2016). Dentro desse contexto, a proteômica se destaca por sua capacidade de explorar uma ampla gama de questões, desde a determinação de sequências

proteicas e níveis de abundância até a análise de interações, modificações pós-traducionais e estrutura tridimensional das proteínas (SHUKEN, 2023). Por ser o produto final da expressão gênica, as proteínas oferecem informações essenciais que vão além dos dados nucleotídicos, permitindo identificar biomarcadores e compreender mecanismos regulatórios complexos (PANDEY e MANN, 2000).

A realização de estudos proteômicos envolve técnicas capazes de analisar milhares de proteínas simultaneamente. Uma das abordagens mais utilizadas é a eletroforese bidimensional (2D), que separa as proteínas com base em suas propriedades de carga, tamanho e forma, possibilitando a visualização de um grande número de proteínas em uma única análise (RABILLOUD e LELONG, 2011; BARBOSA et al., 2012). Além disso, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) se destaca como uma das técnicas fundamentais para a separação e identificação de proteínas, proporcionando alta sensibilidade e precisão na quantificação do proteoma (ROCHA et al., 2005; AEBERSOLD e MANN, 2016).

Em geral, os fluxos de trabalho proteômicos baseados em LC-MS/MS podem ser divididos em duas abordagens principais: a de cima para baixo (*top-down*) e a de baixo para cima (*bottom-up*). Na abordagem *top-down*, proteínas intactas são separadas e analisadas diretamente, permitindo a identificação e caracterização de proteoformas, variantes geradas por splicing alternativo e modificações pós-traducionais (BRODBELT, 2022; LAI e WANG, 2022; MCCOOL et al., 2018). Em contraste, a estratégia *bottom-up* envolve a proteólise enzimática das proteínas, gerando peptídeos que são, posteriormente, separados e identificados, sendo essa abordagem amplamente utilizada devido à facilidade de separação e detecção dos peptídeos (MILLER e SMITH, 2023).

Em síntese, a proteômica é uma ferramenta indispensável para decifrar a dinâmica funcional dos sistemas biológicos. Ao investigar a expressão, estrutura, funções, interações e modificações das proteínas, essa área não só amplia nosso conhecimento sobre os mecanismos celulares, mas também contribui para o desenvolvimento de diagnósticos precoces, prognósticos, monitoramento de doenças e descoberta de novas moléculas bioativas para terapias inovadoras (ASLAM et al., 2016).

Fluxo de trabalho para proteômica *bottom-up*

Preparação da amostra

A preparação da amostra é uma etapa crítica em estudos proteômicos, fundamental para garantir a extração, digestão e enriquecimento eficientes das proteínas presentes em amostras biológicas complexas, sendo realizada justamente para superar a diversidade e complexidade inerentes a essas amostras, onde as proteínas se apresentam em diversas formas e concentrações.

Todo experimento proteômico começa com a preparação da amostra, que, independentemente da abordagem escolhida, representa o primeiro e, muitas vezes, o mais desafiador passo de um fluxo de trabalho proteômico. No caso da proteômica *bottom-up*, o processo geralmente compreende diversas etapas críticas: (1) extração e solubilização das proteínas, (2) desnaturação, (3) digestão enzimática, (4) limpeza dos peptídeos, que inclui a remoção de detergentes e a dessalinização, e (5) separação dos peptídeos, normalmente realizada por cromatografia líquida (KULAK et al., 2014; LEON et al., 2013). A utilização de detergentes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), é comum para solubilizar e desnaturar proteínas, especialmente aquelas associadas à membrana. Contudo, estes reagentes podem interferir com a digestão proteolítica e a análise por espectrometria de massa, exigindo protocolos eficazes para sua remoção (WANG et al., 2018).

Para superar os desafios impostos pela diversidade bioquímica das proteínas, foram desenvolvidos diversos protocolos de preparação que se dividem, basicamente, em métodos de processamento em solução e métodos de limpeza. Os métodos de processamento em solução empregam reagentes como caotrópicos (ex.: ureia, cloridrato de guanidina) e solventes (como o trifluoroetanol) para promover a lise celular e a solubilização das proteínas, sendo estes reagentes diluíveis antes da proteólise ou removíveis por dessalinização antes da análise por espectrometria de massa (LEÓN et al., 2013; GLLATTER et al., 2012). Por outro lado, os métodos de limpeza envolvem etapas adicionais para eliminar contaminantes químicos, como sais, detergentes e outros resíduos que possam comprometer a análise, ampliando a compatibilidade com uma variedade de reagentes utilizados durante a extração (HUGHES et al., 2019). Técnicas de limpeza como precipitação de proteínas, enriquecimento por filtro giratório e captura por afinidade têm sido amplamente

empregadas (JIANG et al., 2004; MANZA et al., 2005; WISNIEWSKI et al., 2009; STEPANOVA et al., 2018; ETHIER et al., 2006; CHEN et al., 2006; ZOUGMAN et al., 2014). No entanto, cada método de purificação tem problemas exclusivos associados à perda de amostras e interferências residuais.

A preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP – do inglês *Filter-Assisted Sample Preparation*) é uma técnica de processamento de proteínas amplamente empregada na proteômica do tipo "*bottom-up*". Sua ampla adoção deve-se à versatilidade do método, que pode ser aplicado a diferentes tipos de amostras, e à elevada qualidade dos peptídeos gerados (WISNIEWSKI, 2019). Desenvolvido inicialmente em 2005 por Manza et al. e refinado por Wisniewski et al. em 2009, o FASP utiliza unidades de ultrafiltração equipadas com membranas de corte molecular (geralmente 3.000 ou 10.000 Da) para separar proteínas de detergentes e outras impurezas de baixo peso molecular (WISNIEWSKI et al., 2009; MANZA et al., 2005). Esse método permite que todas as etapas da preparação desde a remoção de detergentes e impurezas até a redução, alquilação e digestão enzimática sejam realizadas em um único dispositivo, substituindo os protocolos tradicionais de digestão em fase aquosa ou orgânica por um procedimento baseado em reator em fase sólida (WISNIEWSKI et al., 2009).

No fluxo de trabalho FASP, amostras preparadas com SDS são diluídas com um volume elevado de ureia 8 M e, em seguida, passam por etapas sucessivas de troca de tampão em unidades de filtro centrífugo para remover completamente o detergente. As proteínas retidas no filtro são então submetidas a processos de alquilação, lavagem e digestão com tripsina ou outra enzima de clivagem. Os peptídeos eluídos ficam isentos de detergentes, redutores, agentes alquilantes e de outros contaminantes como sais, lipídios e ácidos nucleicos (WISNIEWSKI et al., 2009). A ureia desempenha um papel fundamental ao dissociar o SDS das proteínas e reduzir a concentração do detergente abaixo de sua concentração micelar crítica, permitindo uma troca de tampão em uma única etapa para removê-lo completamente. Além disso, as proteínas permanecem desnaturadas na ureia, permitindo o uso eficiente de membranas de ultrafiltração com poros até 30 kDa, o que reduz significativamente o tempo necessário para a troca de tampão (WISNIEWSKI et al., 2009 e 2011). Estudos demonstraram que o uso de tampões com ureia no FASP

permite a remoção de até 99,9% do SDS, distinguindo este método de protocolos anteriores baseados em filtros giratórios (FEIST e HUMMON, 2015).

Perdas amostrais foram observadas de forma variável com o uso do método (MANZA et al. 2005; WANG et al., 2013; EGGLER et al., 2007; LIEBLER e HAM, 2009) contudo, ainda não está claro se essas variações são provenientes da técnica ou falhas no protocolo. No entanto, o protocolo FASP foi aprimorado nos últimos anos e adaptado para diversas finalidades analíticas. Por exemplo, variantes como o *iFASP* combinam o método com técnicas de marcação isobárica, como a marcação de massa em tandem (*TMT*) e marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (*iTRAQ*) (MCDOWELL, et al. 2013), enquanto o *eFASP* aprimora a digestão de proteínas de membrana e citosólicas por meio da substituição de ácido desoxicólico por ureia (ERDE et al., 2014).

O método FASP já foi aplicado com sucesso em diversos estudos proteômicos. Em um exemplo, a variante *MED-FASP*, combinando tripsina e *LysC*, foi utilizada para analisar biópsias musculares humanas, resultando na identificação de mais de 4.000 proteínas e na detecção de alterações significativas na expressão proteica após um regime de treinamento de resistência (DESHMUKH et al., 2021). Em outro estudo, amostras de tecido esofágico tumoral e não tumoral foram preparadas via FASP e analisadas utilizando a marcação *TMT 11-plex*, permitindo a identificação de mais de 14.000 proteínas e revelando múltiplas proteínas diferencialmente reguladas em tumores (LIU et al., 2021).

Apesar de suas vantagens, o FASP também apresenta limitações, como o tempo considerável necessário para cada etapa centrífuga (geralmente entre 20 a 30 minutos) e a redução de desempenho quando se trabalha com quantidades muito pequenas de proteína (<20 µg) (SIELAFF et al., 2017). No entanto, comparações entre abordagens *bottom-up* demonstram que o FASP supera técnicas tradicionais de digestão em solução, apresentando taxas de identificação superiores (WESTON et al., 2013).

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*) se consolidou como uma ferramenta indispensável na proteômica moderna, possibilitando a separação e a identificação detalhada de proteínas e peptídeos em misturas biológicas complexas, e contribuindo significativamente para o avanço na compreensão dos processos biológicos em diversos sistemas (MIRZAEI e CARRASCO, 2016; CUPP-SUTTON e WU, 2020; CORBETT et al. 2021). O processo tem início com a injeção da amostra em uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos peptídeos. Em proteômica, a HPLC é quase sempre realizada no modo de fase reversa, no qual a coluna é preenchida com uma fase estacionária hidrofóbica (tipicamente C18) (ZHANG et al., 2014). As amostras são injetadas na coluna e separadas através de um gradiente de solventes, composto geralmente por uma fase móvel aquosa (por exemplo, 0,1% de ácido fórmico em água) e um solvente orgânico (como acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). Conforme o gradiente avança, os peptídeos são parcialmente separados com base em suas interações hidrofóbicas, eluindo em diferentes tempos de retenção, o que pode ser otimizado conforme a complexidade da amostra, instrumento e o objetivo do experimento (SHUKEN et al. 2023).

Após a separação, os peptídeos são continuamente ionizados, usualmente por eletrospray (ESI), quando são pulverizados na ponta da coluna sob uma alta voltagem, convertendo-os em íons na fase gasosa (FENN et al., 1989; LIUNI e WILSON, 2011). Esses íons entram no espectrômetro de massa, onde são primeiramente analisados em uma varredura MS1 para determinação das massas intactas dos peptídeos. Em seguida, os íons precursores de maior intensidade são selecionados para fragmentação, geralmente por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision-induced dissociation*), gerando fragmentos que são medidos em uma varredura MS2 (KREIMER et al., 2016; HUNT et al., 1986). A massa do peptídeo e as massas dos fragmentos são usadas para identificar o peptídeo, enquanto a intensidade é usada para quantificação. Os dados de massa e de fragmentação são então comparados com bancos de dados de sequências de aminoácidos por meio de algoritmos de busca, que atribuem pontuações aos

peptídeos identificados e montam listas de proteínas presentes na amostra. Este processo de fragmentação e análise, realizado de forma dependente dos dados (DDA, do inglês *Data-dependent acquisition*), fornece informações detalhadas sobre a sequência dos peptídeos, possibilitando sua identificação (SHUKEN et al., 2023).

A aquisição de qualquer espectro de massa requer um analisador de massa, que separa os íons de acordo com seus valores de massa/carga (m/z), e um detector, que mede o sinal elétrico resultante. Diversos tipos de analisadores são empregados para atender às exigências de sensibilidade, resolução e precisão de massa, sendo escolhidos conforme as especificidades do estudo (HAN et al., 2008; WOODS et al., 2019). Dois exemplos mais populares são os analisadores TOF (do inglês, *Time of Flight*) e orbitrap, no analisador orbitrap as massas peptídicas são determinadas pela frequência de oscilação dos íons em torno de um eletrodo central em forma de fuso e incorpora eletrodos que detectam os íons (MAKAROV, 2000). Por outro lado, o analisador TOF distingue as massas dos peptídeos com base nos seus tempos de chegada a um detector, normalmente um dispositivo baseado em emissão de elétrons secundários como uma placa multicanal (MEIER et al., 2015 e 2018).

Análise de dados

A análise de dados proteômicos envolve um fluxo de trabalho robusto que começa com o pré-processamento dos dados brutos obtidos por LC-MS/MS e se estende até a interpretação bioinformática dos resultados. Os dados brutos gerados pelo LC-MS/MS consistem em uma grande coleção de espectros, cada um contendo informações de tempo de retenção, valores de m/z , intensidades e diversos metadados. Softwares especializados, como *MaxQuant* ou *Proteome Discoverer*, processam esses espectros para gerar listas de peptídeos e/ou proteínas, por meio de uma busca em bancos de dados de referência conhecido como um arquivo de texto, geralmente em formato *FASTA*, na qual os espectros experimentais são comparados com os espectros teóricos previstos a partir da clivagem enzimática das proteínas (SHUKEN, 2023).

Após o controle rigoroso da “taxa de descoberta falsa” (FDR, do inglês *False Discovery Rate*), a identificação do peptídeo está completa. O próximo passo é a quantificação dos peptídeos, onde as intensidades dos íons precursores detectados no MS1 são combinadas por meio de soma, média, mediana ou pela área sob os picos

cromatográficos, a fim de estimar a abundância relativa entre as amostras (COX et al., 2014). Esses dados quantitativos são organizados em tabelas que, por sua vez, são submetidas a análises estatísticas para identificar alterações significativas na expressão proteica. Ferramentas como *Perseus* (TYANOVA e COX, 2018), *MSStats* (CHOI, 2014) ou linguagens de programação como R e *Python* são amplamente utilizadas para remover contaminantes, aplicar transformações logarítmicas, normalizar os dados para corrigir a variabilidade técnica entre execuções e realizar testes estatísticos, como teste t, ANOVA ou regressão linear (XU et al., 2020; SMAIL-TABBONE e RANCE, 2020; SHUKEN e MCNERNEY, 2023).

Por fim, a interpretação biológica dos resultados é realizada através de análises de enriquecimento funcional e construção de redes de interação. Bancos de dados e recursos como *Gene Ontology*, *KEGG*, *Ingenuity*, *Reactome* e *STRING* são usados para esse fim (CROFT et al., 2011; KANEHISA et al., 2012; SNEL et al., 2000). A ontologia genética (GO, do inglês Gene Ontology) é uma ferramenta de referência utilizada para identificar e analisar as vias biológicas que apresentam alterações em um experimento (SHUKEN, 2023). O banco de dados STRING, além de fornecer informações sobre interações entre proteínas, integra dados de diversos recursos e realiza mineração de literatura, ampliando significativamente a compreensão das redes moleculares envolvidas (SNEL et al., 2000). Dessa forma, a integração de técnicas de bioinformática com os dados proteômicos possibilita a geração de hipóteses sobre os mecanismos celulares, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento em biologia e medicina.

Abordagem proteômica na produção animal

A proteômica em animais de fazenda tem se destacado como uma ferramenta poderosa para aprofundar o conhecimento sobre os processos biológicos que regem a produção de alimentos e o bem-estar animal (BENDIXEN et al. 2011). Em espécies como bovinos, suínos, aves, ovinos e caprinos, o estudo dos proteomas permite a identificação de biomarcadores que podem ser utilizados para otimizar a produtividade, garantir a qualidade dos produtos (carne e leite) e monitorar a saúde dos animais (DANIELSEN et al., 2010; ALMEIDA et al., 2015; CECILIANI et al., 2014; GAGAOUA et al., 2017 e 2018; NAIR et al., 2018; PURSLOW et al., 2020).

Historicamente, os estudos proteômicos iniciaram-se em modelos de laboratório, com foco na compreensão do metabolismo proteico humano (BERGEN, 2007). Entretanto, nas últimas décadas a aplicação dessa abordagem se expandiu para os animais de produção, principalmente devido à necessidade de maximizar a eficiência em um mercado cada vez mais competitivo e à crescente demanda por alimentos de alta qualidade. Esse avanço possibilitou o desenvolvimento de protocolos específicos para a análise de diversos tipos de amostras, como leite, soro, plasma, urina e até mesmo a lã de ovinos, apesar dos desafios impostos pela predominância de queratina nesse último caso (BILIĆ et al., 2018).

A evolução das técnicas proteômicas, que passaram do uso tradicional da eletroforese bidimensional para abordagens mais robustas como a proteômica *shotgun* acoplada a espectrometria de massa, ampliou significativamente a capacidade de identificar e quantificar milhares de proteínas em uma única análise (ALMEIDA et al., 2021). Esse progresso não só facilita a compreensão de vias metabólicas e mecanismos patogênicos, mas também permite a descoberta de marcadores de estresse e indicadores de processos inflamatórios, essenciais para diagnosticar doenças como mastite, infecções respiratórias e problemas intestinais (MARCO-RAMELL et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018). Assim, a proteômica vem contribuindo para a elaboração de estratégias de intervenção que podem melhorar o manejo sanitário e, conseqüentemente, a eficiência produtiva.

Outro aspecto relevante é a utilização da proteômica comparativa, que possibilita a comparação entre os proteomas de diferentes espécies, oferecendo insights valiosos sobre a evolução dos mecanismos biológicos e a interação entre o fenótipo proteômico e a genética. Em animais domésticos, onde há registros reprodutivos extensos e uma vasta base de dados genômicos, essa interação pode auxiliar na seleção e no melhoramento genético, contribuindo para a criação de linhagens mais resistentes a doenças e mais eficientes na produção (BILIĆ et al., 2018).

Nas últimas duas décadas, diversas abordagens ômicas, especialmente as tecnologias proteômicas, foram empregadas para identificar biomarcadores relacionados à maciez da carne de bovinos e investigar os mecanismos que regem esse processo (PICARD e GAGAOUA, 2017; D'ALESSANDRO et al., 2012). O trabalho desenvolvido por CARVALHO et. al (2014) identificou proteínas

diferencialmente expressas associadas à maciez da carne em 12 bovinos com valores extremos de força de cisalhamento. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa, revelando 13 proteínas relacionadas à estrutura celular, metabolismo e organização celular. BOUDON e colaboradores (2020) aplicaram a proteômica *shotgun* no músculo *Longissimus* e plasma de 20 novilhas Charolais x Aubrac para identificar proteínas associadas à maciez da carne. Foram identificadas 268 proteínas no músculo e 136 no plasma, com 71 proteínas musculares e 21 plasmáticas discriminando carnes macias e duras. Vinte e sete proteínas musculares previamente associadas à maciez foram validadas, além de 38 novos candidatos. O proteoma plasmático revelou 8 biomarcadores putativos, com três deles mostrando potencial discriminativo da maciez.

Embora a proteômica tenha sido aplicada em diversas amostras animais, seu uso na análise de tecido ruminal ainda é raro. Um exemplo é o trabalho de BONDZIO et al. (2011), que utilizou a eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D DIGE) para analisar o proteoma de ovelhas. Os autores identificaram proteínas diferencialmente expressas associadas a mudanças morfológicas no epitélio ruminal durante a adaptação à alimentação com alto teor de grãos. YANG et al. (2013) realizaram análise proteômica do tecido epitelial ruminal bovino utilizando SDS-PAGE acoplado a LC-MS/MS, identificando 813 proteínas não redundantes. Essas proteínas estavam predominantemente associadas a atividades de ligação, desempenhando papéis fundamentais em funções moleculares e processos metabólicos. Um estudo realizado por HU e colaboradores (2024) investigou o perfil proteômico do epitélio ruminal para entender o retardo de crescimento em bovinos iaques. Foram identificadas diferenças no metabolismo energético, envolvendo corpos cetônicos, propanoato e piruvato, entre iaques com crescimento retardado e normal. Os resultados sugeriram que a obstrução do ATP celular no epitélio ruminal contribuiu para o retardo do crescimento dos iaques.

Considerando este cenário, o objetivo deste trabalho foi investigar a modulação do perfil proteômico do tecido ruminal de bovinos Nelore em resposta a diferentes intervenções nutricionais e a variações nos níveis de emissão residual de metano, com o intuito de elucidar os mecanismos moleculares e as adaptações celulares associadas a essas alterações.

CAPÍTULO 1

"Impacto Nutricional na Proteômica do Tecido Ruminal de Bovinos Nelore: Uma Análise Comparativa entre Dieta Convencional e Dieta com Subprodutos Agroindustriais"

1.1– INTRODUÇÃO

A alimentação representa um dos maiores custos na pecuária de corte, estando diretamente associada à eficiência alimentar e, conseqüentemente, à produtividade dos ruminantes. Uma melhoria substancial na produtividade e no desempenho dos ruminantes só pode ser alcançada com suplementação alimentar adequada (BONDZIO et al., 2011). A importância social dos ruminantes tem alimentado esforços globais para melhorar a função do rúmen, o que influencia tanto a saúde quanto a nutrição animal (HAGEN et al., 2021).

O rúmen é o principal compartimento do trato digestivo dos ruminantes e desempenha um papel crucial na digestão e absorção de nutrientes. Esse órgão abriga uma comunidade microbiana complexa, composta por microrganismos eucarióticos e procarióticos anaeróbios, responsáveis por fermentar os ingredientes indigeríveis da ração em ácidos graxos voláteis (AGVs), que fornecem até 70–80% das necessidades energéticas do hospedeiro (BERGMAN, 1990; SNELLING et al., 2017). A eficiência digestiva e a taxa de produção de produtos de fermentação estão intimamente relacionadas à composição microbiana do rúmen. Diversos fatores, incluindo pH, temperatura, espécie hospedeira, idade e localização geográfica (MALMUTHUGE, 2017), assim como a dieta e intervenções nutricionais, exercem influência significativa sobre essa composição e função, sendo estes últimos considerados os principais determinantes das variações observadas no ecossistema microbiano do rúmen (SONG et al., 2018; LI et al., 2019).

Evidências genômicas demonstram que o epitélio ruminal sofre adaptações estruturais rápidas em resposta a mudanças fisiológicas (TANIGUCHI et al., 2010; STEELE et al. 2011). Além disso, os efeitos fenotípicos das dietas, em especial da suplementação concentrada, na morfologia e na fisiologia do rúmen têm sido amplamente investigados e revisados (SHEN et al., 2004; BROWN et al., 2006), revelando que a oferta de rações altamente concentradas aumenta o número e/ou tamanho das papilas ruminais, alterando as propriedades de transporte do epitélio (GOODLAD et al., 1981; ETSCHMANN et al., 2009). Complementarmente, dietas ricas em concentrado promovem o aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a conseqüente redução do pH, o que pode afetar significativamente os processos fermentativos e a absorção de nutrientes no rúmen (PENNER et al., 2009). Portanto, para alcançar uma composição alimentar ideal para

ruminantes, é fundamental preservar as funções fisiológicas do estômago anterior, como uma fermentação eficiente e excelentes propriedades de absorção.

Atualmente, a mitigação do aquecimento global é um tema amplamente debatido. Cada aspecto relacionado à redução do impacto ambiental das atividades humanas tem ganhado crescente relevância. Nesse contexto, a gestão adequada dos resíduos surge como um elemento essencial para diminuir a poluição do ar e da água, as emissões de gases de efeito estufa e os problemas de saúde. As atividades agroindustriais geram grandes quantidades de subprodutos e resíduos que possuem valor nutricional para a alimentação animal (GOES et al., 2008). Assim, a utilização desses subprodutos como ingredientes para ração pode ser um componente crucial na estratégia global de redução do impacto ambiental da produção agroindustrial e da pecuária.

O uso de subprodutos provenientes dos processos agrícolas e agroindustriais na alimentação animal é uma prática antiga, que tem se consolidado ao longo dos anos. Essa estratégia permite aproveitar alimentos que não são destinados à alimentação humana, agregando valor a produtos que, de outra forma, seriam descartados pela agroindústria, além de promover a destinação adequada desses resíduos (JÚNIOR et al., 2008). Subprodutos como polpa de beterraba, glúten e gérmen de milho, cascas de soja, farelo de soja, farelo de linhaça, farelo de glúten de milho, farelo de semente de algodão e farelo de girassol são amplamente empregados na formulação de rações devido aos seus elevados valores nutricionais, fornecendo quantidades significativas de fibras e proteínas que contribuem para a qualidade da alimentação animal (CORREDDU et al., 2020).

A polpa cítrica, obtida da indústria de cítricos a partir de cascas, sementes e bagaço de laranja após a extração do suco, pode ser incorporada na alimentação de ruminantes. Ela fornece energia para animais em crescimento ou lactação e estimula o consumo devido à sua fração fibrosa de alta digestibilidade. Com uma elevada concentração de pectina (22,3% na MS) e um teor moderado de fibra em detergente neutro (FDN), sua inclusão na dieta ruminal favorece a produção de ácido acético em vez de ácido láctico e mantém pH ruminal (BAMPIDIS e ROBINSON, 2006). Além disso, a polpa cítrica é rica em açúcares (25% na MS), o que proporciona energia rapidamente aos microrganismos do rúmen, e apresenta baixo teor de amido aliado a fibras altamente digestíveis (NOCEK e TAMMINGA, 1991). Por sua vez, o

farelo de amendoim, co-produto do biodiesel com excelente composição centesimal, possui baixo teor de fibra (13%), similar ao farelo de soja, e é altamente degradável em termos proteicos no rúmen (GOES et al., 2000; TONISSI et al., 2004). Um estudo realizado por LEÃO e colaboradores (2007) mostrou que o farelo de amendoim pode substituir até 40% do farelo de soja em dietas para cordeiros em terminação, sem comprometer os parâmetros de qualidade da carcaça.

Diante deste cenário, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à adaptação do rúmen às diferentes intervenções nutricionais é fundamental para aprimorar o desempenho animal e reduzir os impactos ambientais associados à produção pecuária. A abordagem proteômica tem sido amplamente empregada para investigar diversas características biológicas com o intuito de otimizar a produção nas indústrias agrícolas (BENDIXEN et al., 2011). Essa técnica possibilita a identificação de todas as proteínas expressas em células, tecidos ou organismos em estados fisiológicos ou patológicos específicos. Em particular, a combinação de espectrometria de massa em tandem com cromatografia líquida (LC-MS/MS) representa uma ferramenta fundamental para a separação e análise detalhada do proteoma, permitindo a detecção rápida de diferenças na expressão proteica entre amostras. No entanto, embora essa tecnologia se destaque pela sua capacidade analítica, sua aplicação na análise do tecido ruminal de ruminantes ainda é rara, abrindo caminho para novas investigações que possam aprofundar a compreensão dos processos biológicos nesse contexto.

1.2– OBJETIVOS

1.2.1 – Objetivo geral

Investigar como diferentes intervenções nutricionais modulam o perfil proteômico do tecido ruminal de bovinos Nelore e elucidar os mecanismos adaptativos associados a essas mudanças.

1.2.2 – Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil proteico do rúmen de touros alimentados com uma dieta convencional e com uma dieta formulada com subprodutos agroindustriais, utilizando a metodologia de digestão das proteínas em solução

seguida de análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com análise em tandem (LC-MS/MS);

- Comparar o perfil proteico do rúmen entre os dois grupos, identificando as proteínas diferencialmente abundantes (DAPs, do inglês differentially abundant proteins);
- Caracterizar processos biológicos relacionados às proteínas diferencialmente abundantes e às proteínas exclusivas de cada grupo;
- Analisar as redes de interação proteína-proteína para compreender as possíveis adaptações celulares do tecido ruminal frente às diferentes composições dietéticas.

1.3 – PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 - Desenho experimental e coleta de amostras

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de Bem-estar Animal e Abate Humanitário e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da EMBRAPA, São Carlos, São Paulo (Protocolo nº 09/2016). Uma população de 52 bovinos Nelore (*Bos indicus*) contemporâneos foram mantidos em confinamento experimental na Embrapa Pecuária Sudeste.

Os bovinos foram divididos em dois grupos e submetidos a diferentes intervenções nutricionais. O primeiro grupo (grupo convencional - Conv, n = 26) foi alimentado com uma dieta convencional composta por 72,8% de silagem de milho, 21,4% de milho em grão, 3,06% de farelo de soja, 1,19% de gordura protegida, 0,59% de ureia concentrada e uma mistura de mineral (Confinato N235 Agrocerec Multimix®). O segundo grupo (grupo de subprodutos – Subp, n = 26) recebeu uma dieta contendo silagem de milho (57,3%), farinha de amendoim (4,7%), gérmen de milho gordo (22,59%), polpa cítrica (13,96%), ureia (0,30%) e a mesma mistura mineral (Confinato N235 Agrocerec Multimix®). Ambos os grupos receberam suplementos minerais, levedura seca ativa, virginiamicina e monensina.

Os animais dos grupos Conv e Subp apresentaram pesos corporais iniciais médios de $329,5 \pm 34,2$ kg e $321,3 \pm 36,3$ kg, respectivamente, e tinham entre 20 e 21 meses de idade. Os touros foram alocados em baias coletivas com capacidade para 13 animais por 105 dias, dos quais os primeiros 15 dias foram dedicados à

adaptação ao confinamento, seguidos de 30 dias para crescimento e 60 dias para terminação. Para garantir o consumo *ad libitum*, as dietas Conv e Subp foram fornecidas duas vezes ao dia durante a etapa de terminação. As baias foram equipadas com sistema de alimentação automática (GrowSafe® Ltda, Canadá) e bebedouros (Modelo AF-1000 Master, Intergado® Ltda), permitindo a coleta automática de dados, como peso vivo, consumo diário de ração e consumo de água.

Os animais de ambos os grupos (Conv e Subp) foram enviados para o abate aos 23-24 meses de idade, com pesos finais médios de $477,3 \pm 41,5$ kg e $484,7 \pm 37,2$ kg, respectivamente, seguindo as diretrizes do Abate Humanitário de Bovinos. Imediatamente após o abate, foi coletada uma amostra de 2–3 cm² da parede ruminal, incluindo epitélio estratificado, camada muscular e submucosa. Para padronizar a posição de coleta entre as amostras, utilizou-se como referência a abertura do esôfago e o retículo, definindo o ponto de coleta na parede lateral do rúmen aproximadamente 5 cm abaixo do esôfago e logo após a borda do retículo. Essas amostras foram imersas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C para análise proteômica.

1.3.2 - Extração das proteínas teciduais

As amostras de tecido ruminal previamente congeladas foram moídas manualmente sob nitrogênio líquido usando um almofariz e pistilo até obter um pó fino. As amostras em pó foram então transferidas para tubos de microcentrífuga e pesadas ainda congeladas. Para a extração das proteínas, 0,8 g de tecido ruminal congelado foi homogeneizado em 1,5 mL do tampão de lise gelado contendo 8 M de ureia, 2 M de tiourea, 1% de DTT, 2% de CHAPS e 1% de inibidor de protease em um vórtex, durante 1 min. Os extratos brutos foram agitados por 30 min em gelo e centrifugados a $10.000 \times g$ por 30 min a 4°C. Os sobrenadantes, que correspondem às proteínas totais foram coletados e armazenados a -80°C para análises posteriores.

1.3.3 - Determinação da concentração total das proteínas

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada pelo método de Bradford (1976) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para isso, o reagente colorimétrico concentrado foi diluído em água deionizada na proporção de 1:4 (v:v) e, em seguida, filtrado com papel filtro Whatman para a remoção de partículas.

O extrato proteico foi diluído com o próprio solvente de extração, garantindo que a concentração se mantivesse dentro da faixa linear de calibração. Em seguida, foram retirados 40 μL dessa diluição, os quais foram misturados a 2,00 mL do reagente de Bradford diluído. Após agitar e incubar a mistura por 5 min à temperatura ambiente (25°C), foi realizada a medição da absorbância a 595 nm utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific). O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras em triplicata.

A calibração do espectrofotômetro foi realizada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para isso, foram preparadas soluções de calibração a partir de uma solução estoque de BSA solubilizada em tampão lise, gerando uma curva de calibração na faixa de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada solução de calibração foi preparada em triplicata.

1.3.4 - Preparação das amostras para análise LC-MS/MS

Os extratos proteicos foram preparados usando um protocolo adaptado de preparação de amostra auxiliado por filtro (FASP) (Erde et al., 2014). No dia anterior à digestão, as unidades filtrantes Amicon® Ultra 10 kDa foram condicionadas com solução aquosa a 0,1% (v/v) de Tween® 20. Os filtros foram então lavados dez vezes com água ultrapura e incubados em água ultrapura por 10 min, repetindo-se esse processo uma vez. Em seguida, foram realizadas duas centrifugações de 15 min a $14.000 \times g$ com 500 μL de ddH₂O. Alíquotas proteicas (10 μg) foram ajustadas para um volume total de 500 μL com solução de ureia (8 mol L^{-1}) em bicarbonato de amônio ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$ - Ambic) e aplicadas na unidade filtrante, seguidas de centrifugação a $14.000 \times g$ por 20 min a 4°C . As amostras concentradas foram lavadas duas vezes com 450 μL da solução de ureia, cada lavagem seguida de centrifugação, conforme descrito anteriormente. As ligações dissulfeto foram reduzidas pela adição de 450 μL de uma solução de DTT a $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ em Ambic $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ e incubação a 30°C por 30 min sob agitação contínua (600 rpm), seguida de centrifugação. A alquilação dos grupos sulfidril foi realizada com 450 μL de iodoacetamida a $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ Ambic e incubação em temperatura ambiente por 45 min no escuro sob agitação contínua (600 rpm), seguida de centrifugação. As amostras concentradas resultantes foram lavadas três vezes com 450 μL de $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ Ambic seguido de centrifugação. Posteriormente, as proteínas foram digeridas pela adição de 4 μL de uma solução de tripsina $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ácido acético $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (proporção enzima-

proteína 1:25 m/m) e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação contínua a 300 rpm. Os digestos foram coletados por centrifugação, e as unidades filtrantes foram lavadas duas vezes com 150 µL de ddH₂O seguidas de centrifugação. Os filtrados (peptídeos) resultantes foram secos em um concentrador a vácuo a 25°C e reconstituídos em 100 µL de ácido fórmico a 0,1% para análise por espectrometria de massas.

1.3.5 - Análise em espectrômetro de massas

A separação dos peptídeos foi realizada utilizando um sistema Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), operando com um gradiente linear composto pelos solventes A (0,1% de ácido fórmico em água) e B (80% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico). As análises por espectrometria de massas foram conduzidas em um equipamento Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) usando uma fonte de ionização nanospray Flex NG. Os parâmetros instrumentais empregados para a análise por UHPLC acoplado à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) estão descritos na Tabela 1.1.

TABELA 1.1 – Parâmetros instrumentais utilizados na análise de peptídeos por UHPLC-MS/MS.

Easy-nLC 1200 UHPLC	
Parâmetros instrumentais	Condições de operação
Coluna de armadilha	Acclaim PepMap 100, C18, 3 µm, 75 µm × 2 cm, nanoViper
Volume e pressão de carregamento	20 µL de solvente A a 500 bar
Coluna analítica	Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 µm, 75 µm × 15 cm, nanoViper
Vazão	300 nL min ⁻¹
Gradiente de eluição	5–28% B por 80 min; 28–40% B por 10 min; aumento até 95% B em 2 min; lavagem por 15 min
Reequilíbrio	100% Solvente A
Orbitrap Fusion Lumos	
Fonte de íons	Nanospray Flex NG
Modo de operação	ESI positivo
Temperatura capilar	300 °C
RF S-Lens	30%
Varredura MS	Resolução 120.000 (m/z 200)
Intervalo de varredura	m/z 350–1550
AGC target (MS)	5 × 10 ⁵
Varredura MS2	Resolução 30.000 (m/z 200), tempo máx. preenchimento: 54 ms
Janela de isolamento MS2	1,2 m/z
Fragmentação	HCD, energia normalizada: 30%
Exclusão dinâmica	40 s
Calibração de massa	RunStart EASY-IC™ ativado antes de cada execução
Identificação de precursores	Algoritmo APD habilitado

1.3.6 - Parâmetros de processamento e pesquisa em banco de dados

A identificação das proteínas foi realizada com MaxQuant v.2.6.7 utilizando o banco de dados *Bostaurus*_Uniprot (59.264 entradas, janeiro de 2025). Os parâmetros para a pesquisa no banco de dados foram: enzima tripsina; máximo

de 1 sítio de clivagem perdida; carbamidometilação como modificação fixa; acetilação N-terminal e a oxidação da metionina como modificações variáveis; tolerância de massa de 10 ppm para peptídeo e de 1 Da para fragmentação (MS/MS). Foi usado filtro para uma taxa máxima de 1% de descoberta falsa nos níveis de peptídeos e proteínas, usando a estratégia de banco de dados de alvo-isca reverso (*reverse target-decoy*) com sequências de peptídeos reversas como entradas de isca.

1.3.7 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os valores de intensidade normalizados (*LFQintensity*). Antes das análises estatísticas as proteínas contaminantes, proteínas com sequências invertidas e as proteínas que foram identificadas apenas por um peptídeo modificado, foram eliminadas.

Visando minimizar a variabilidade individual, optou-se por realizar a análise de abundância diferencial com as proteínas presentes em pelo menos 50% das réplicas biológicas de ambos os grupos experimentais. O pacote proteoDA foi utilizado para transformação logarítmica dos dados (\log_2) e aplicação da análise estatística, empregando modelos lineares para dados de microarray (LIMMA, do inglês *Linear Models for Microarray Data*), que ajusta um modelo linear para cada proteína individualmente (RITCHIE et al., 2015; THURMAN et al., 2023). A estatística *t* foi calculada com uma abordagem bayesiana empírica para moderação dos erros-padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem R (R Core Team, 2020).

1.3.8 - Análises de bioinformática

A análise de enriquecimento de termos de ontologia gênica (GO) e de vias metabólicas (KEGG) a partir das listas das proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) e das proteínas exclusivas de cada grupo foi realizada utilizando a ferramenta DAVID v6.8 (do inglês, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (HUANG et al., 2009). Os termos GO enriquecidos (Processos biológicos - PB; Componente Celular - CC; Função Molecular - FM), bem como as vias KEGG, foram considerados significativos quando apresentaram p-valor $<0,05$ e taxa de descoberta falsa (FDR) inferior a 0,1 (BENJAMINI e HOCHBERG, 1995). As redes de interações proteína-proteína foram construídas pelo STRING versão 12

(<http://string-db.org>) comparando com o banco de dados *Bos taurus* e considerando um score de confiança médio de 0,4 para interações (SZKLARCZYK et al., 2015).

1.4 – RESULTADOS

1.4.1 – Dados proteômicos

Com base na análise de LC-MS/MS de alto rendimento, identificamos 2103 proteínas expressas no tecido ruminal. Foram consideradas para análise estatística apenas as proteínas presentes em pelo menos 50% das réplicas biológicas de cada grupo, resultando em 1.544 proteínas quantificadas. Dentre essas, 1.464 eram comuns a ambos os grupos alimentares, enquanto 30 estavam presentes exclusivamente no grupo alimentado com a dieta convencional e 50 no grupo com a dieta de subproduto (FIGURA 1.1, Tabela Apêndice A).

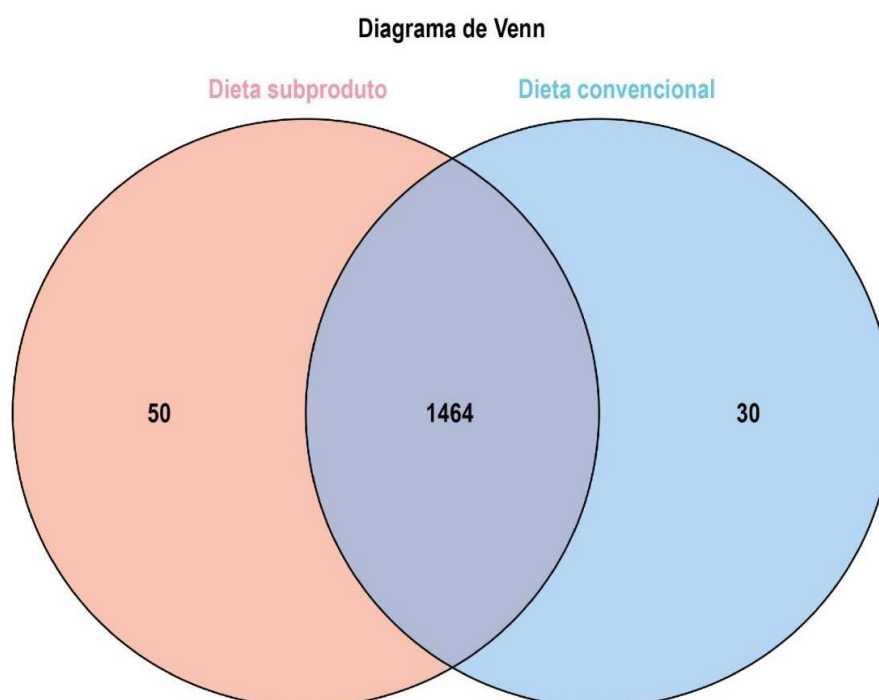


FIGURA 1.1 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas e quantificadas exclusivamente no tecido ruminal bovino dos animais alimentados com subproduto (lado esquerdo) e com dieta convencional (lado direito), bem como aqueles comuns a ambos os grupos (centro).

Das 1544 proteínas quantificadas, sete eram proteínas diferencialmente abundantes (DAPs, $p < 0,05$) no tecido ruminal entre os dois grupos (TABELA 1.1); seis proteínas foram reguladas positivamente e uma regulada negativamente no grupo de animais alimentados com dieta de subprodutos em comparação com o grupo que recebeu a alimentação convencional (FIGURA 1.2). As proteínas reguladas positivamente se relacionam principalmente a processos estruturais, remodelação da matriz extracelular, organização do citoesqueleto e regulação celular, enquanto a proteína regulada negativamente está relacionada principalmente à homeostase do ferro.

TABELA 1.2 - Lista de proteínas diferenciais abundantes (DAPs) identificadas no tecido ruminal dos grupos alimentados com dieta convencional (Conv) e com dieta composta por subprodutos (Subp).

Identificação Uniprot	Nome da proteína	Nome do gene	p-valor	log2FC (Conv/Subp)
O46414	Cadeia pesada de ferritina	FTH1	0,0190	-1,218
A0A3Q1MRJ0	Protease serina transmembrana	TMPRSS11BNL	0,0014	1,907
A0AAA9SPT2	Glicoproteína rica em histidina	HRG	0,0283	1,032
E1BA17	Colágeno tipo XIV cadeia alfa 1	COL14A1	0.0276	1,110
A5PK70	Nucleosídeo difosfato quinase	NME3	0,0065	1,831
P48616	Vimentina	VIM	0,0287	1,008
Q3ZC55	Alfa-actinina-2	ACTN2	0,0229	1,309

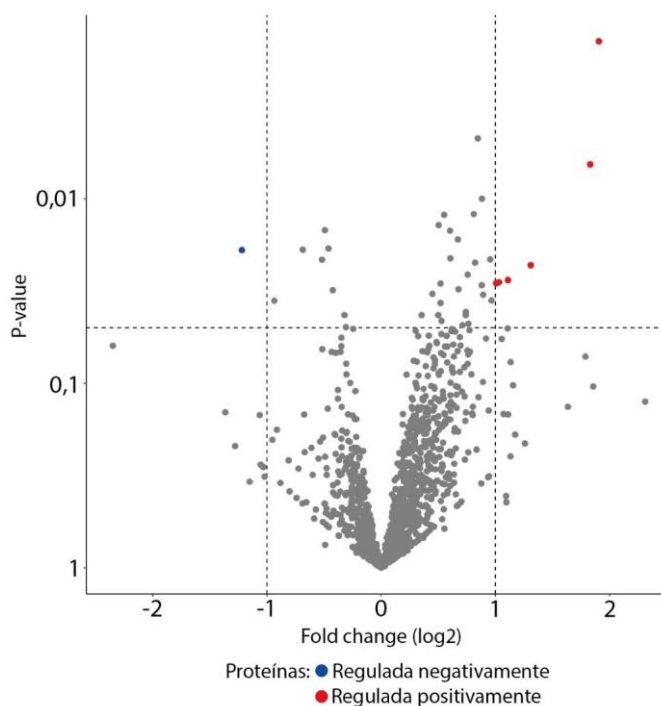


FIGURA 1.2 - Gráfico de vulcão. Apresenta os valores de p ANOVA (eixo y) plotados em relação aos valores log2 relacionado às mudanças nas dobras de proteínas (eixo x) para análise quantitativa da abundância de proteínas, comparando os grupos alimentados com dieta convencional e subprodutos. Os pontos vermelhos e azuis indicam, respectivamente, proteínas significativamente reguladas positivamente e negativamente ($p < 0,05$). (Os nomes completos das proteínas podem ser consultados na Tabela 1.2).

1.4.2 – Análise de ontologia genética

Para aprofundar o entendimento sobre as funções das 7 DAPs, foi realizada uma análise de ontologia genética (GO). Foram identificados apenas dois termos, um relacionado a componente celular e outro a processo biológico, mas nenhum atingiu enriquecimento estatístico significativo ($FDR < 0,1$). Adicionalmente, foram analisados o enriquecimento funcional dos termos GO para as 30 e 50 proteínas exclusivas dos grupos Conv e Subp, respectivamente. Esses resultados contribuem para esclarecer os potenciais papéis de atuação dessas proteínas em cada grupo.

A análise realizada identificou um termo significativamente enriquecido para o componente celular nas proteínas exclusivas do grupo Conv. Em relação às proteínas exclusivas do grupo Subp, foram anotados 20 termos para o componente celular (CC), com 9 termos apresentando enriquecimento significativo ($FDR < 0,1$).

Para a função molecular (FM), 6 termos foram anotados, dos quais 1 foi significativamente enriquecido (FDR < 0,1). Quanto ao processo biológico (PB), 14 termos foram anotados, incluindo 3 que apresentaram enriquecimento significativo (FDR < 0,1) (Tabela Apêndice B).

Como mostrado na FIGURA 1.3, os termos mais significativamente enriquecidos para o processo biológico incluíram a regulação do processo catabólico proteossomal, o “splicing” de mRNA e a resposta imune inata. Os termos enriquecidos para função molecular revelaram proteínas envolvidas na atividade ativadora da endopeptidase. Com relação ao componente celular, as proteínas identificadas estavam predominantemente associadas ao citoplasma e à região extracelular.

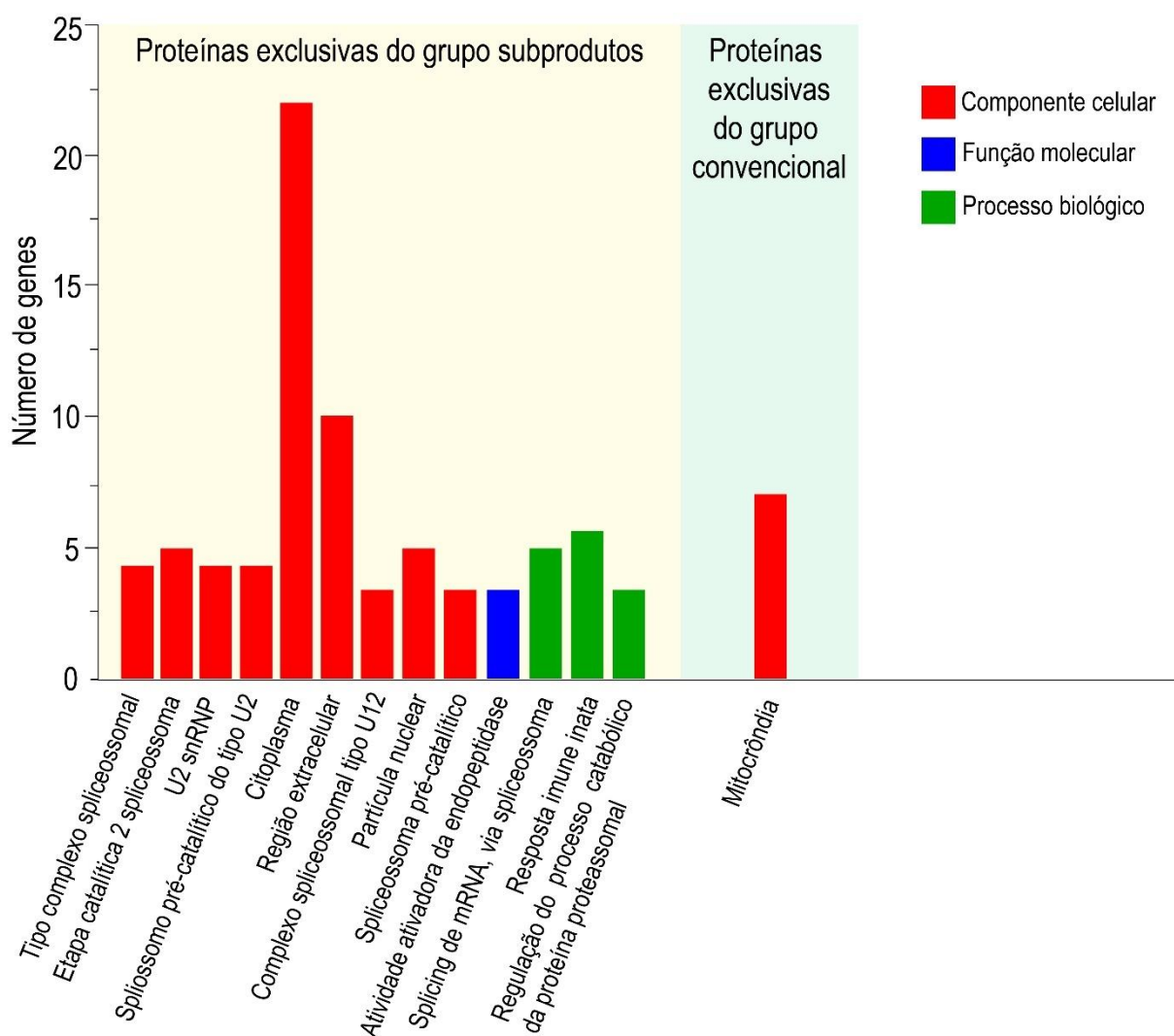


FIGURA 1.3 – Representação dos termos significativamente enriquecidos na análise de ontologia gênica (GO) associados às proteínas identificadas exclusivamente nos grupos alimentados com subprodutos e com dieta convencional.

1.4.3 – Análise de redes de interação proteína-proteína

As redes de interação proteína-proteína (PPI) das proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos alimentados com dieta convencional e subprodutos e as proteínas exclusivas identificadas em cada grupo foram construídas usando o software online STRING v. 12.0, com foco no banco de dados *Bos taurus* (FIGURA 1.3). Um cluster principal foi construído para as proteínas diferencialmente abundantes, com proteínas envolvidas na manutenção da estrutura celular (ACTN2 e VIM) (FIGURA 3A).

Para as proteínas exclusivas do grupo Conv (FIGURA 1.3B), a rede de interação-proteína revelou um cluster principal contendo as proteínas CLPP, NDUFA13, FIS1 e VAPB, possivelmente associado a processos mitocondriais e manutenção da homeostase celular. Três clusters menores foram apresentados: um agrupando as proteínas RPL31 e SBDS, outro envolvendo EIF2B5 e EIF3J, e o último com as proteínas AMACR e ECHDC2, envolvendo participação em processos de tradução, metabolismo de ácidos graxos e outras funções moleculares específicas.

Na análise de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas do grupo de Subp (FIGURA 1.3C), observou-se um cluster principal envolvendo subunidades reguladoras e moduladoras do proteassoma (PSME2 e PSMD14) em associação com NEDD8, sugerindo papel central em vias de proteólise e controle de qualidade proteica. Entre os outros clusters identificados, destacou-se a forte interação entre LAMB3 e LAMC2, ambas componentes das lamininas, proteínas essenciais para a formação e estabilidade da membrana basal.

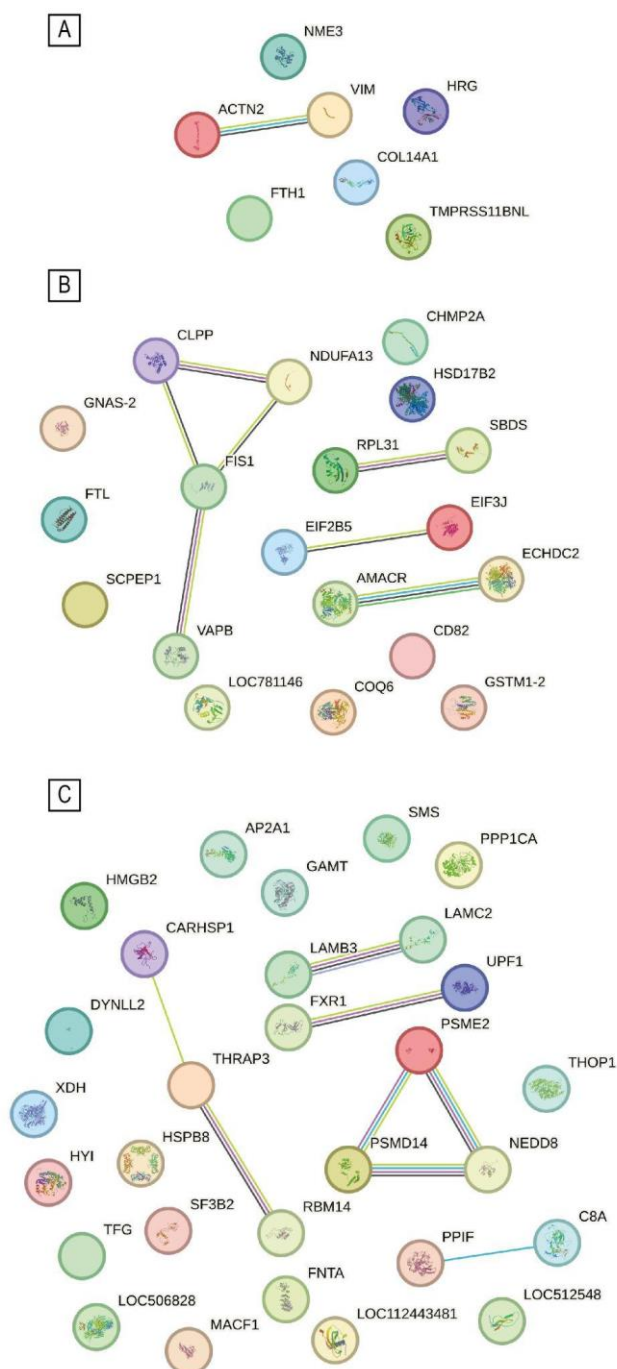


FIGURA 1.4 - Redes de interação proteína-proteína preditas pelo software String 12.0 a partir da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos alimentados com dieta convencional e subprodutos (A); proteínas identificadas exclusivamente no grupo conv (B); proteínas identificadas exclusivamente no grupo subp (C) no tecido ruminal bovino. Os nós são proteínas do banco de dados *Bos taurus* e as bordas representam diferentes evidências das anotações funcionais previstas (linha vermelha - fusão; linha verde - vizinhança; linha azul - co-ocorrência; linha roxa - experimental; linha amarela - mineração de texto; linha azul clara - banco de dados; linha preta - co-expressão).

1.5 – DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a composição do perfil de proteínas ruminais em touro Nelore alimentados com dietas convencional (Conv) e preparada com subprodutos agrícolas (Subp). Os resultados mostraram que o perfil proteômico é alterado em resposta às dietas. As diferenças na composição das dietas impuseram distintos perfis de substratos fermentáveis no rúmen de bovinos Nelore, exigindo adaptações no tecido ruminal. Embora ambos os grupos consumissem silagem de milho, o uso de polpa cítrica e fontes de gordura insaturada (farelo de amendoim e germen de milho) na dieta de subprodutos provavelmente modificou o perfil de ácidos graxos voláteis e a disponibilidade energética no rúmen. Por outro lado, a dieta convencional inclui milho em grão, com efeitos fermentativos distintos. Foi possível identificar sete proteínas diferencialmente abundantes relacionadas a processos estruturais, remodelação da matriz extracelular, organização do citoesqueleto, regulação celular e homeostase do ferro entre os dois grupos.

Seis das proteínas aumentadas no grupo de subprodutos estão associadas à matriz extracelular e ao citoesqueleto, indicando reestruturação tecidual. COL14A1 (colágeno tipo XIV) é um colágeno de associação fibrilar que liga fibras de colágeno e está relacionada à organização da matriz extracelular (HEMMAVANH et al., 2013; DUBOST et al., 2016). VIM (vimentina) é um filamento intermediário cuja função essencial é manter a forma celular, a integridade do citoplasma e estabilizar as interações do citoesqueleto (GOLDMAN et al. 1996, ERIKSSON et al., 2009). A ACTN2 (α -actinina-2) é uma proteína citoesquelética de ligação à actina e está envolvida na organização do citoesqueleto de actina (YOUNG & GAUTEL, 2000; SJÖBLOM et al, 2008). A expressão aumentada dessas proteínas estruturais aponta para um processo de remodelação tecidual, por exemplo, modulação do comprimento das papilas ruminais (SHEN et al., 2004, SHEN et al., 2005), possivelmente em resposta à mudança de fermentação induzida pela dieta. Apoiando essa hipótese, a análise de ontologia genética após comparação de perfis de expressão gênica em tecido ruminal de vacas alimentadas com dietas de baixo ou alto concentrado revelou que a regulação do citoesqueleto de actina é uma das vias mais afetadas (TANIGUCHI et al., 2010).

Entre as proteínas diferencialmente expressas, NME3 (nucleosídeo difosfato quinase 3) foi a única diretamente relacionada ao metabolismo energético,

ela localiza-se na membrana externa mitocondrial e participa da homeostase de nucleotídeos. NME3 habilita atividade de nucleosídeo difosfato quinase e está envolvido na fusão mitocondrial e no reparo de DNA, estando associado à síntese de nucleotídeos trifosfato (BOISSAN et al., 2009; CHEN et al., 2018; SU et al., 2023). A regulação positiva de NME3 sugere que o tecido ruminal dos animais alimentados com subprodutos pode estar ajustando sua dinâmica mitocondrial para otimizar a produção de ATP. Isso é consistente com a necessidade de aproveitar eficientemente os ácidos graxos voláteis, cuja maior disponibilidade na dieta de subprodutos foi demonstrada em um estudo paralelo com os mesmos animais, no qual o tratamento com subprodutos elevou significativamente as concentrações de propionato e butirato no fluido ruminal (MALHEIROS et al. 2023).

A única proteína regulada negativamente foi FTH1 (cadeia pesada da ferritina), elemento-chave na homeostase do ferro intracelular. FTH1 codifica a subunidade pesada da ferritina, que é a principal proteína de armazenamento de ferro intracelular em procariotos e eucariotos (MOREIRA et al., 2021; MESQUITA et al., 2020). A ferritina forma complexos que sequestram ferro de forma solúvel e não-tóxica, protegendo as células de reações de Fenton que geram radicais livres. A redução de FTH1 no grupo de subprodutos sugere um menor estoque de ferro na forma armazenada, o que pode significar alterações no metabolismo do ferro ruminal ou na demanda por armazenamento de ferro no epitélio. Essa redução provavelmente reflete uma menor necessidade de sequestrar ferro livre, consequência de um possível menor dano oxidativo promovido pelos compostos fenólicos e pela vitamina C da polpa cítrica, que atuam como antioxidantes e reforçam a defesa contra radicais livres. Isso é consistente com o artigo de GOU et al. (2019), onde seis proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e na desintoxicação foram reguladas positivamente em resposta a uma dieta com alto teor de grãos.

Na rede de PPI, ACTN2 e VIM aparecem como nós centrais de um mesmo cluster funcional ligado à estrutura do citoesqueleto, o que reforça a ideia de alterações estruturais no epitélio ruminal associadas à mudança para a dieta com subprodutos. Esse conjunto reduzido de DAPs sugere ajustes no metabolismo e na estrutura celular do tecido ruminal em resposta à dieta, consistentes com a ideia de que o epitélio ruminal é capaz de ajustar seu metabolismo e estrutura às

características da dieta, mantendo a integridade funcional sem prejuízo no desempenho (BONDZIO et al., 2011).

1.5.1 – Proteínas exclusivas

No grupo Conv, as proteínas exclusivas enriqueceram termos relacionados à mitocôndria, indicando maior atividade metabólica mitocondrial no rúmem sob essa dieta. A mitocôndria é uma organela complexa que desempenha papéis essenciais na transdução de energia, produção de ATP e eventos de sinalização celular (ZHENG et al., 2022). No epitélio ruminal, considera-se que as mitocôndrias desempenham um papel crucial no metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta, produzindo corpos cetônicos, uma importante fonte circulante de energia (LEIGHTON et al., 1983). Em contraste, o grupo Subp exibiu enriquecimento em processos de catabolismo proteossomal, splicing de mRNA e resposta imune inata, sugerindo maior renovação proteica e ativação de mecanismos de defesa. De fato, o sistema ubiquitina-proteassoma é a via principal de degradação proteica, crucial para a homeostase celular, e sua ativação costuma estar associada à remoção de proteínas danificadas e até indução de apoptose epitelial (GALLI et al., 2010; ELOLIMY et al., 2019). A presença de proteínas do spliceossomo no Subp indica intensificação do processamento transcricional, semelhante ao observado em epitélios em rápido desenvolvimento (ZHENG et al., 2022).

Em suma, a dieta convencional, rica em carboidratos de rápida fermentação, favoreceu adaptações associadas a maior geração de energia mitocondrial, enquanto a dieta com subprodutos induziu adaptações de remodelamento proteico e resposta imunológica. Por exemplo, ácidos graxos voláteis derivados da fermentação, como propionato, podem modular fortemente genes inflamatórios no epitélio ruminal (ZHAN et al., 2019), explicando o perfil de resposta imune observado no grupo Subp.

O perfil das redes PPI corrobora adaptações ruminais específicas a cada dieta. No grupo Conv, o cluster central (CLPP, NDUFA13, FIS1, VAPB) envolve componentes mitocondriais de respiração e fissão, indicando maior atividade metabólica e homeostase energética (NOURI et al., 2020; WANG et al., 2012; WIRTH et al., 2016). Os pequenos clusters RPL31/SBDS e EIF2B5/EIF3J apontam para biogênese ribossomal e iniciação da tradução (BLOCK et al., 1998; ZAMBETTI et al.,

2015), enquanto AMACR/ECHDC2 sinalizam β -oxidação de ácidos graxos (KONG et al., 2020). Em conjunto, reforçam GO previamente observado (enriquecimento em vias mitocondriais) e sugerem que a dieta Conv estimula o gasto energético e a produção proteica pelo rúmen. Já no grupo Subp, o cluster principal (PSME2, PSMD14, NEDD8) destaca a via ubiquitina-proteassoma, indicando regulação proteolítica intensa (KLEIGER & MAYOR, 2014; ZHANG et al., 2024). O segundo cluster de forte interação (LAMB3, LAMC2) está ligado à laminina-332, componente-chave da membrana basal epitelial, indicando reforço da matriz de sustentação celular (HARTWIG et al., 2007). Assim, essa arquitetura PPI apoia a interpretação de que a dieta Subp induz maior turnover proteico e adaptações estruturais, alinhada às alterações das DAPs e GO observadas anteriormente.

1.6 – CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível demonstrar que a composição proteômica do tecido ruminal de bovinos Nelore é fortemente modulada pela dieta, refletindo adaptações celulares específicas aos desafios nutricionais. As proteínas diferencialmente expressas apontam para adaptações estruturais e metabólicas no rúmen. Tais respostas proteômicas refletem provavelmente uma adaptação benéfica às novas condições alimentares, assegurando a absorção de nutrientes e a barreira fisiológica do rúmen. Além disso, o grupo alimentado com dieta convencional apresentou enriquecimento de proteínas exclusivas associadas a processos mitocondriais e de síntese proteica, conforme evidenciado por análises de redes de interação proteína-proteína (PPI) e ontologia genética (GO). Esse perfil proteico específico indica maior ênfase em funções energéticas no rúmen dos bovinos da dieta Conv, possivelmente refletindo a maior oferta de nutrientes energéticos presentes nessa ração tradicional. Em contrapartida, o grupo alimentado com subprodutos vegetais exibiu enriquecimento de proteínas exclusivas envolvidas em vias de catabolismo proteassomal, processamento de mRNA (*splicing*), resposta imune inata e composição da membrana basal do epitélio. Essa assinatura proteica sugere maior renovação proteica e ajustes defensivos do rúmen. Em especial, a ativação de mecanismos de degradação proteica (via proteassoma) e de processamento de RNA mensageiro indica intenso remodelamento celular e possivelmente maior atividade do sistema imune local, refletindo a necessidade de o epitélio se adequar a essa condição

alimentar. As redes de interação proteína-proteína corroboram esses achados, ao mostrar clusters funcionais distintos: um, central, ligado à respiração mitocondrial e fissão em animais convencionais; outro, focado em remodelamento proteossomal e reforço da matriz basal em animais de subprodutos. Em conjunto, esses ajustes no metabolismo e na arquitetura do tecido indicam que o rúmen é capaz de reprogramar suas funções e estruturas em resposta ao perfil nutricional, garantindo integridade funcional e possivelmente contribuindo para eficiência produtiva.

CAPÍTULO 2

“Caracterização proteômica do tecido ruminal de bovinos Nelore divergentes para emissão residual de metano”

2.1 – INTRODUÇÃO

Atualmente é crescente o interesse em reduzir o potencial de aquecimento global por meio da redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera. A pecuária, uma valiosa fonte de proteína animal, está sob pressão contínua para reduzir suas emissões de GEE. Estima-se que as emissões globais totais de GEE da pecuária representam 14,5% do total de emissões antropogênicas (Gerber et al., 2013; Negussie et al., 2016; Zeng et al., 2024; Duthie et al., 2017).

Os ruminantes são capazes de digerir e converter componentes não comestíveis da parede celular vegetal em produtos para consumo humano por meio da fermentação entérica de carboidratos celulósicos que ocorre no rúmen (Duthie et al., 2017; Ripple et al., 2014; Zeng et al., 2024). No entanto, a fermentação entérica é a principal fonte de emissões de ruminantes (85 a 95%). O metano (CH₄), um potente gás de efeito estufa com potencial de aquecimento global 28 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) (IPCC, 2014; Auffret, 2018), é o principal produto da fermentação entérica dos alimentos consumidos por esses animais. Do total de metano gerado pela fermentação entérica no rúmen, 95% são eliminados por eructação. Dos 5% restantes, produzidos no trato digestivo posterior, 89% são excretados pela respiração e apenas 11% pelo ânus (MURRAY et al., 1976). Segundo resultados do IV Inventário Nacional de Emissões de GEE (MCTI, 2020), em 2016 os bovinos foram responsáveis pela maior parte das emissões de CH₄ pela fermentação entérica, representando 97,2% do total. Dentro dessa categoria, os bovinos de corte contribuíram com 84,3% das emissões, enquanto os bovinos leiteiros corresponderam a 12,9%. Os outros animais ruminantes e não ruminantes, responderam por apenas 2,8% das emissões totais.

Um dos desafios atuais é desenvolver abordagens sustentáveis para reduzir o impacto ambiental dos sistemas de produção de gado e, ao mesmo tempo, melhorar a eficiência alimentar. No entanto, os mecanismos para isso ainda não são totalmente compreendidos (Flay et al., 2019; Caldas et al., 2019). Nos últimos anos, as tecnologias ômicas têm sido usadas na compreensão dos mecanismos biológicos dos ruminantes para otimizar a produção em indústrias agrícolas (Bondzio et al., 2011; Gou et al., 2019; Bendixen et al., 2011; Yang et al., 2013). As tecnologias ômicas abrangem várias metodologias, como genômica, transcriptômica, proteômica e

metabolômica, que, em conjunto, possibilitam análises abrangentes de genes, RNA, proteínas e metabólitos. A proteômica, que envolve a análise extensiva de todas as proteínas expressas em células, tecidos ou organismos sob condições específicas, é uma ferramenta poderosa para caracterizar milhares de perfis de proteínas e suas correlações, funções gênicas e interações (Sun et al., 2021; Carvalho et al., 2014).

Estudos recentes têm explorado a relação entre proteômica e emissões de metano em ruminantes, com foco em como proteínas e interações microbianas no rúmen influenciam essa produção. A análise de proteínas microbianas revelou quais microrganismos são mais relevantes para a fermentação e emissão de metano (John et al., 2015; Andersen et al., 2021). Além disso, investigações em diferentes dietas mostraram como várias fontes de proteínas e carboidratos afetam o perfil proteômico da microbiota, fornecendo informações sobre como otimizar as dietas de ruminantes (Li et al., 2021; Mulaka et al., 2022; Deusch et al., 2017). Esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de redução das emissões de metano da pecuária, contribuindo para a sustentabilidade ambiental.

2.2 – OBJETIVOS

2.2.1 – Objetivo geral

Investigar as variações no perfil proteômico do tecido ruminal de bovinos com diferentes níveis de emissão residual de metano (alto e baixo) utilizando uma abordagem de proteômica quantitativa "*label-free*".

2.2.2 – Objetivos específicos

- Caracterizar e quantificar o perfil proteico do tecido ruminal de animais com emissões residuais altas e baixas de metano por meio da técnica "*label-free*";
- Comparar o perfil proteico do tecido ruminal entre os grupos H (alto) e L (baixo), identificando as proteínas diferencialmente abundantes (DAPs);
- Realizar análise de redes de interação proteína-proteína e de enriquecimento funcional (ontologia genética) para elucidar os mecanismos moleculares associados às diferenças nas emissões de metano.

2.3 – PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 – Desenho experimental e coleta de amostras

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em conformidade com as diretrizes de bem-estar animal e abate humanitário, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da EMBRAPA, São Carlos, São Paulo (Protocolo nº 09/2016). Dezesesseis animais foram selecionados para este estudo com base no parâmetro de emissão residual de metano (ERM) descrito na seção 2.3.7. Destes, oito representam os extremos de alta emissão, sendo quatro submetidos à dieta convencional e quatro à dieta com subproduto, e outros oito correspondem aos extremos de baixa emissão, igualmente divididos entre as dietas. Esses animais fizeram parte de um experimento com 52 bovinos Nelore (*Bos indicus*) contemporâneos, criados em confinamento experimental, conforme descrito no Capítulo 1, Seção 1.3.1.

As emissões de metano entérico foram monitoradas por meio do sistema automatizado GreenFeed (C-lock Inc., Rapid City, South Dakota, EUA). O sistema GreenFeed (Figura 2.1) integra identificação por radiofrequência de animais, fornecimento de isca, tratamento e medição de ar, rastreamento de gases, módulos eletrônicos e de comunicação e tratamento de dados. Ao se aproximar do cocho, o bovino é atraído por pequenas porções de ração liberadas automaticamente segundo programação ajustável para cada animal; nesse momento, o brinco eletrônico é lido para identificação. Simultaneamente, um ventilador suga o ar exalado pelas narinas e boca, e sensores internos determinam em tempo real as concentrações de gases, o volume expirado e demais parâmetros ambientais. A concentração de CH₄, CO₂, O₂ presente nas amostras é determinada através de um analisador de espectro infravermelho não dispersivo. Essas informações são registradas em um computador local e, via tecnologia sem fio, podem ser enviadas a estações remotas para posterior processamento (HRISTOV et al., 2015).

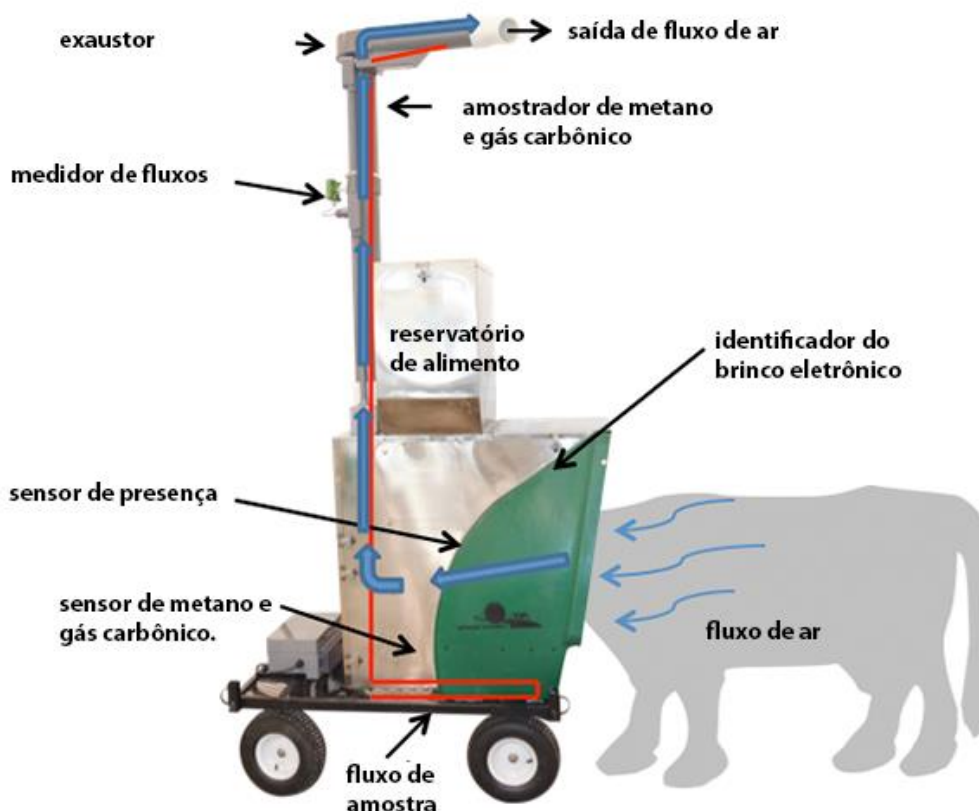


FIGURA 2.1 - Componentes do sistema GreenFeed empregados na medição da produção de CH_4 em ruminantes. Fonte: HRISTOV et al., 2015.

Os animais foram encaminhados para abate nas idades entre 23 e 24 meses, seguindo as diretrizes do Abate Humanitário de Bovinos. Imediatamente após o abate, as amostras de tecido ruminal foram coletadas, imersas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C para a análise proteômica.

2.3.2 – Extração das proteínas e preparação das amostras para espectrometria de massas

As etapas de extração das proteínas e de preparação das amostras para LC-MS/MS seguiram os procedimentos estabelecidos nas Seções 1.3.2 - 1.3.4 do Capítulo 1.

Resumidamente, as proteínas foram extraídas de 0,8 g de tecido congelado em tampão de lise (8 M ureia, 2 M tiourea, 1 % DTT, 2 % CHAPS e 1 % inibidor de protease) por homogeneização em vortex, seguida de agitação por 30 min no gelo e centrifugação a $10\ 000\times g$ por 30 min a 4°C . Os sobrenadantes foram quantificados pelo método de Bradford (1976), usando BSA como padrão, e

armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Para análise por LC-MS/MS, os extratos proteicos foram processados utilizando uma versão adaptada do protocolo FASP.

2.3.3 – Análise das amostras em LC-MS/MS

Alíquotas contendo $1\text{ }\mu\text{g}$ de peptídeos foram analisadas em um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), acoplado ao sistema de cromatografia líquida nano EASY-nLC II (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, EUA) por meio de uma fonte de ionização nanoeletrospray Proxeon. Os parâmetros instrumentais utilizados para a análise por nLC-MS/MS estão apresentados na Tabela 2.1.

TABELA 2.1 – Parâmetros instrumentais utilizados na análise de peptídeos por nLC-MS/MS.

Parâmetros instrumentais	Condições de operação
EASY-nLC II	
Coluna analítica	PicoFrit, 20 cm \times 75 μm ID, 5 μm
Vazão	300 nL min^{-1}
Gradiente de eluição	2–90% acetonitrila em 0,1% ácido fórmico, por 170 min
Eluição parcial	35% acetonitrila em 125 min
LTQ Orbitrap Velos	
Fonte de íons	Nanoeletrospray Proxeon
Modo de operação	ESI positivo
Tensão de ionização	2,2 kV
Temperatura da fonte	275 $^{\circ}\text{C}$
Modo de aquisição	Dependente de dados (DDA)
Intervalo de varredura	m/z 300–1600
Resolução MS	60.000
AGC target MS	1×10^6
Fragmentação	CID, energia normalizada: 35%
Seleção de íons para MS/MS	20 mais intensos, com carga ≥ 2
AGC target MS/MS	5.000
Limiar de ativação para MS/MS	1.000 contagens
Exclusão dinâmica	Lista: 500 íons; duração: 60 s; repetição: 1 vez
Parâmetros de ativação	$q = 0,25$; tempo = 10 ms

2.3.4 – Análise de dados proteômicos

A identificação das proteínas foi realizada com MaxQuant v.1.5.8 contra o proteoma Uniprot KB UP000009136 *Database* (lançamento em outubro de 2023; 37.872 sequências; 22.677.732 resíduos). A carbamidometilação foi definida como modificação fixa e a acetilação N-terminal e a oxidação da metionina como modificações variáveis, a clivagem perdida de no máximo 1 tripsina e uma tolerância de 10 ppm para massa precursora e 1 Da para íons fragmento foram definidas para identificação de proteínas. Foi utilizado um filtro para uma taxa máxima de descoberta falsa de 1% em níveis de peptídeos e proteínas. Antes das análises estatísticas as proteínas contaminantes, proteínas com sequências invertidas e as proteínas que foram identificadas apenas por um peptídeo modificado, foram eliminadas.

2.3.5 – Análise estatística e de bioinformática

Para minimizar a variabilidade individual, a análise de abundância diferencial foi realizada com as proteínas presentes em pelo menos quatro das oito réplicas biológicas de cada grupo. O pacote proteoDA foi utilizado para normalização dos dados e aplicação da análise estatística, empregando modelos lineares para dados de *microarray* (LIMMA, do inglês Linear Models for Microarray Data), ajustando-se um modelo linear para cada proteína individualmente (RITCHIE et al., 2015; THURMAN et al., 2023). A estatística t foi calculada por meio de abordagem bayesiana empírica para moderação dos erros-padrão.

Além disso, foi realizada uma análise de regressão linear entre os níveis de expressão proteica e os grupos classificados pela emissão de metano, considerando como significativas as associações com $\log_2(\text{fold change}) > 1$ e valor de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a linguagem R (R Core Team, 2020).

A análise de enriquecimento de termos de ontologia gênica (GO) usando a lista de DAPs e proteínas exclusivas de cada grupo foi realizada com o Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) ferramenta v6.8 (HUANG et al., 2009). Os termos GO enriquecidos (Processo Biológico- PB; Componente Celular - CC; Função Molecular -MF) e as vias KEGG foram consideradas significativas quando $FDR < 0,1$ (BENJAMINI & HOCHBERG, 1995). As

redes de interações proteína-proteína foram construídas pelo STRING versão 12 (<http://string-db.org>) contra o banco de dados *Bos taurus* e considerando um escore de confiança médio de 0,4 para interações (SZKLARCZYK et al., 2015).

2.3.6 – Emissão residual de metano

A emissão de metano (EM) foi observada durante a etapa de terminação no confinamento usando o sistema GreenFeed (C-lock Inc., Rapid City, SD, EUA). A emissão residual de metano (ERM) foi estimada pela diferença entre o metano emitido e o consumo individual de matéria seca (CMS, kg/d) (DONOGHUE et al., 2016). O grupo contemporâneo (GC) foi incluído no modelo como efeito fixo. O procedimento MIXED do programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, EUA, 2011) foi utilizado de acordo com a seguinte equação:

$$EM_i = \beta_0 + \beta_1 (CMS_i) + ERM_i$$

Em que EM_i é a emissão de metano observada para o animal i ; CMS_i é o consumo de matéria seca previsto para o animal i ; β_0 é o intercepto de regressão; β_1 é o coeficiente de regressão parcial do CMS; e ERM_i é a emissão residual de metano do animal i proposta por DONOGHUE et al. (2016).

2.4 – RESULTADOS

2.4.1 – Dados proteômicos

Oito animais com valores de emissão de metano residual extremamente altos (H) e oito com valores de emissão de metano residual extremamente baixos (L) foram selecionados para análise proteômica. A proteômica quantitativa “*label free*” foi aplicada para investigar o perfil proteômico do tecido ruminal de bovinos Nelore. Um total de 1.470 proteínas foram identificadas. Apenas as proteínas presentes em pelo menos quatro das oito repetições biológicas de cada grupo de ERM foram consideradas para análise estatística, resultando em 1.277 proteínas quantificadas. Destas, 1.206 (94,4%) eram comuns a ambos os grupos de ERM, destacando uma base proteômica compartilhada significativa. Em comparação, 28 (2,2%) estavam presentes apenas no grupo H e 43 (3,4%) apenas no grupo L (FIGURA 2.2, Tabela Apêndice C).

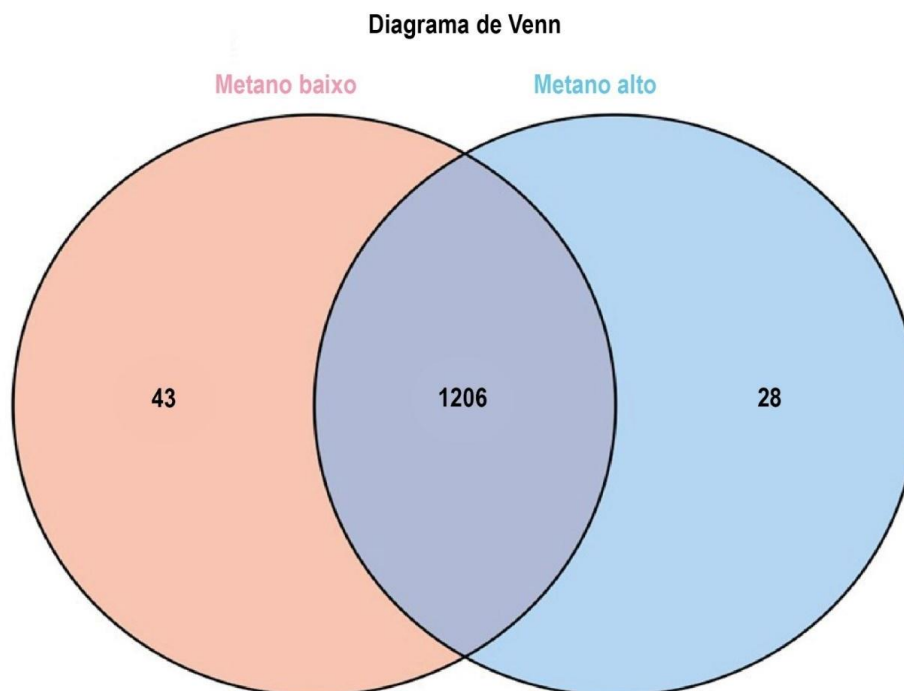


FIGURA 2.2 - Diagrama de Venn ilustrando o número de proteínas identificadas e quantificadas exclusivamente no tecido ruminal de bovinos com emissões residuais de metano altas (lado direito) e baixas (lado esquerdo), bem como as proteínas compartilhadas entre os dois grupos (área central).

Das 1.206 proteínas submetidas à análise de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs), 37 apresentaram níveis de abundância significativamente diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$, TABELA 2.1). A maioria dessas proteínas estava em maior abundância no grupo L (70,27%). O gráfico de vulcão apresentado na FIGURA 2.3 ilustra claramente a relação entre os grupos H e L para todas as proteínas, permitindo uma rápida visualização dos níveis de expressão. Os resultados mostraram que 28 DAPs foram regulados positivamente e 9 regulados negativamente no tecido ruminal do grupo L em comparação com o grupo H. As DAPs mais fortemente reguladas positivamente incluíram catepsina Z (CTSZ), Subunidade NDUFA4 do citocromo c oxidase (NDUFA4), smootelina (SMTN), proteína RAC3 (RAC3) e legumina (LGMN). Em contraste, as DAPs mais reguladas negativamente foram a fosfatase alcalina, isoenzima não específica de tecido (ALPL), lactaderina (MFGE8) e queratina 36 (KRT36).

TABELA 2.2 - Lista das proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) no tecido ruminal dos grupos de emissão residual de metano alta (H) e baixa (L).

Identificação Uniprot	Nome da proteína	Nome do gene	p-valor	log2FC (L/H)
A0JNC0	Tropomodulina-1	TMOD1	0,0102	2,358
A6QQJ3	Periferina	PRPH	0,0491	1,869
P05689	Catepsina Z	CTSZ	0,0059	4,642
P09487	Fosfatase alcalina, isoenzima inespecífica de tecido	ALPL	0,0016	-3,237
Q3ZBX9	Histona H2A.J	H2AJ	0,0403	1,588
P62833	Proteína Rap-1A relacionada a Ras	RAP1A	0,0096	2,449
A5PK69	Proteína RAC3	RAC3	0,0037	3,409
P68530	Subunidade 2 do citocromo c oxidase	MT-CO2	0,0465	2,606
Q01321	Subunidade NDUFA4 do citocromo c oxidase	NDUFA4	0,0416	4,520
Q09430	Profilina-2	PFN2	0,0260	1,871
A0A3Q1MNP9	6-Fosfofrutoquinase dependente de ATP	PFKM	0,0168	2,459
A0A3Q1NIK5	Componente 1 do receptor de progesterona associado à membrana	PGRMC1	0,0446	1,672
Q3SYS6	Proteína homóloga à calcineurina B 1	CHP1	0,0276	-2,229
Q3SYU6	Calponina-2	CNN2	0,0249	1,634
Q3T0Z8	Ribonucleoproteína nuclear pequena F	SNRPF	0,0364	-1,730
Q3ZBD4	Proteína muscular pequena	SMPX	0,0024	3,219
Q56JV9	Proteína de subunidade ribossômica pequena eS1	RPS3A	0,0493	-2,243
Q58DS9	Proteína Rab-5C relacionada a Ras	RAB5C	0,0286	1,735
A0A3Q1M698	Subunidade alfa da proteína de capeamento de F-actina	CAPZA2	0,0227	1,993
F1MI47	Proteína 14 do motivo de ligação ao RNA	RBM14	0,0458	2,234
Q95114	Lactaderina	MFGE8	0,0359	-2,919
A0A140T8D4	Legumaína	LGMN	0,0089	3,327
G3N0F6	Distrofina	DMD	0,0213	2,493
A0A3Q1LY87	Regulador de actina ENAH	ENAH	0,0126	2,229
A0A3Q1NKS0	Proteína associada ao sarcolema	SLMAP	0,0024	2,863
A0A3Q1MDT7	Histona H4	LOC132344729	0,0398	1,515
E1B8J6	Família com similaridade de sequência 83 membro H	FAM83H	0,0483	-2,038
A0A3Q1MUW6	Proteína contendo domínio semelhante a Ig	-	0,0099	2,831
A0A3S5ZPQ3	Smootelina	SMTN	0,0076	3,805
F1MM32	Sulfidril oxidase	QSOX1	0,0325	-1,940

E1BDX8	Cadeia pesada citoplasmática 1 da dineína 1	DYNC1H1	0,0404	1,402
A4FUC6	Proteína SFRS9	SRSF9	0,0498	1,794
E1BGA0	Subunidade alfa 7 da integrina	ITGA7	0,0202	2,358
E1BP42	Descarboxilase do ácido cisteína sulfínico	CSAD	0,0454	2,200
E1BPX9	Repetição de pentatricopeptídeo rica em leucina	LRPPRC	0,0073	-2,110
F1MI98	Queratina 36	KRT36	0,0290	-2,618
Q24JZ7	Succinil-CoA:3-cetoácido-coenzima A transferase	OXCT1	0,0218	2,568

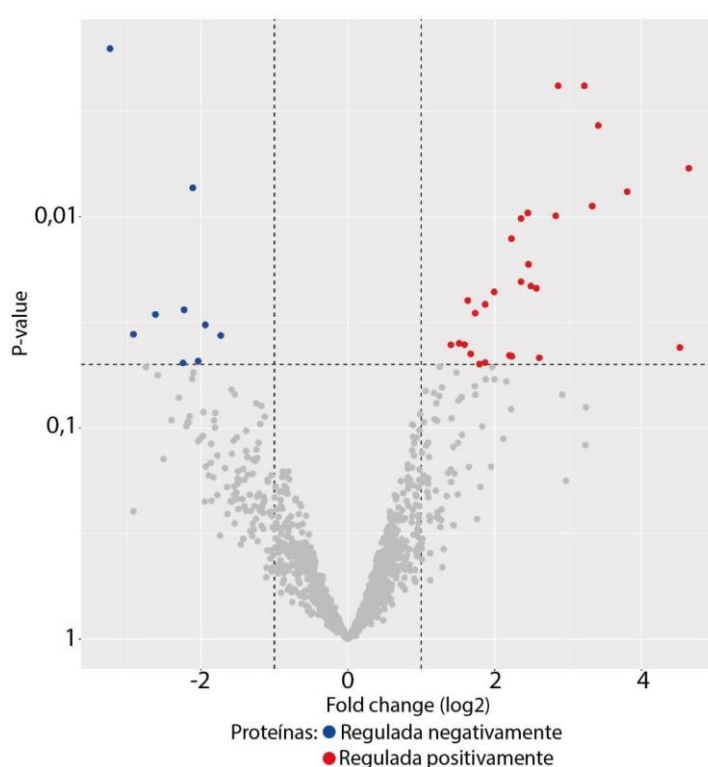


FIGURA 2.3 - Gráfico de vulcão representando os valores de p ANOVA (eixo y) em função dos valores log₂ das variações nas dobras de proteínas (eixo x), comparando quantitativamente a abundância proteica entre os grupos com baixa e alta emissão residual de metano. Os pontos vermelhos indicam proteínas significativamente reguladas positivamente, enquanto os pontos azuis representam aquelas reguladas negativamente ($p < 0,05$). (Os nomes completos das proteínas estão listados na TABELA 2.2.)

2.4.2 – Análise de enriquecimento funcional

Para entender melhor as funções biológicas das DAPs, foi realizada análise de enriquecimento funcional, usando termos de ontologia gênica (GO) (Tabela Apêndice D). O software DAVID categorizou as proteínas em três grupos funcionais: funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. A análise GO revelou que quatro termos significativamente enriquecidos ($FDR < 0,1$) foram associados a componentes celulares, enquanto um termo foi relacionado a processos biológicos. No grupo de componentes celulares, as proteínas diferencialmente expressas foram associadas principalmente ao citoesqueleto, projeção celular, actina filamentosa e sistema endomembranar. Em relação aos processos biológicos, foram identificadas proteínas relacionadas à organização do citoesqueleto de actina (FIGURA 2.4).

A análise de enriquecimento funcional foi realizada separadamente para as 43 e 28 proteínas apresentadas exclusivamente nos grupos L e H ERM, respectivamente, para entender melhor os possíveis papéis dessas proteínas em cada grupo (Tabela Apêndice D). Esta análise identificou três termos significativamente enriquecidos para as proteínas exclusivas do grupo L, com um termo relacionado ao componente celular e dois termos associados à função molecular (FIGURA 2.4). Os termos de função molecular enriquecidos revelaram proteínas envolvidas na ligação do íon zinco e do mRNA. Com relação ao componente celular, identificamos proteínas relacionadas ao tipo de spliceossomo da etapa catalítica 1. Em contraste, doze termos significativamente enriquecidos foram identificados para as proteínas exclusivas do grupo H (FIGURA 2.4). Cinco termos foram significativamente enriquecidos para componentes celulares, um foi significativamente enriquecido em função molecular e seis foram significativamente enriquecidos em processos biológicos. No componente celular, os termos significativamente enriquecidos foram citoesqueleto de actina cortical, junção celular, disco Z, complexo inibidor de serina protease e projeção celular. Na função molecular, as proteínas exclusivas do grupo H funcionam como proteínas de atividade lisozima. Na categoria processos biológicos, as proteínas foram relacionadas ao processo metabólico, morte de células de outro organismo, resposta de defesa a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e regulação do processo do sistema muscular.

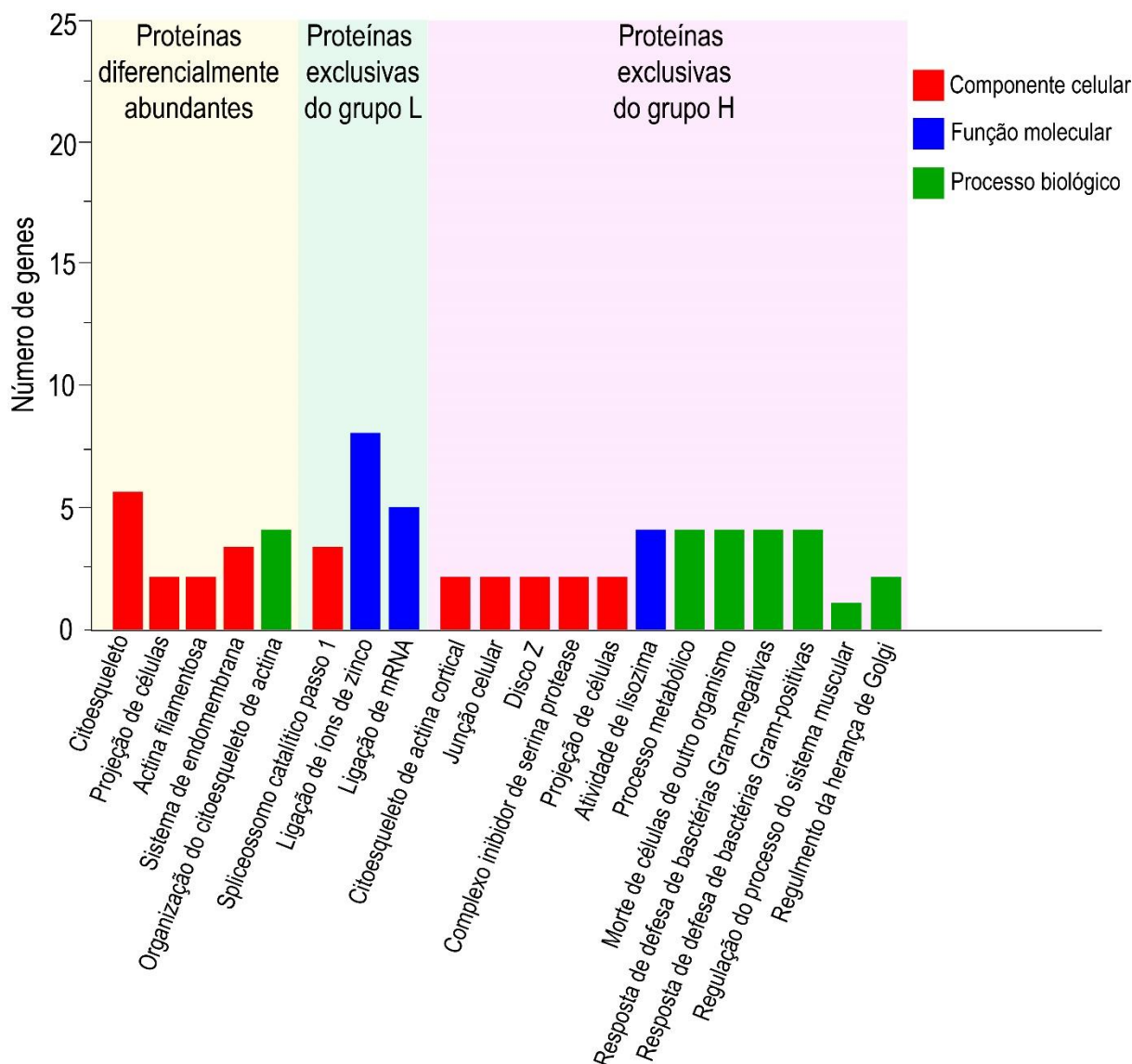


FIGURA 2.4 – Termos significativamente enriquecidos na análise de ontologia gênica (GO) associados às proteínas diferencialmente abundantes e às proteínas exclusivas dos grupos com baixa (L) e alta (H) emissão residual de metano.

2.4.3 – Análise de redes de interação proteína-proteína

As redes de interação proteína-proteína (PPI) das proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos de ERM e das proteínas exclusivas identificadas em cada grupo foram construídas usando o software online STRING v. 12.0, com foco no banco de dados *Bos taurus* (Figura 2.5). Um cluster principal foi construído para as proteínas diferencialmente abundantes, com proteínas envolvidas em processos celulares essenciais relacionados às mitocôndrias, transporte celular, metabolismo energético e sinalização celular (LRPPRC, COX2, NDUFA4, RAB5C)

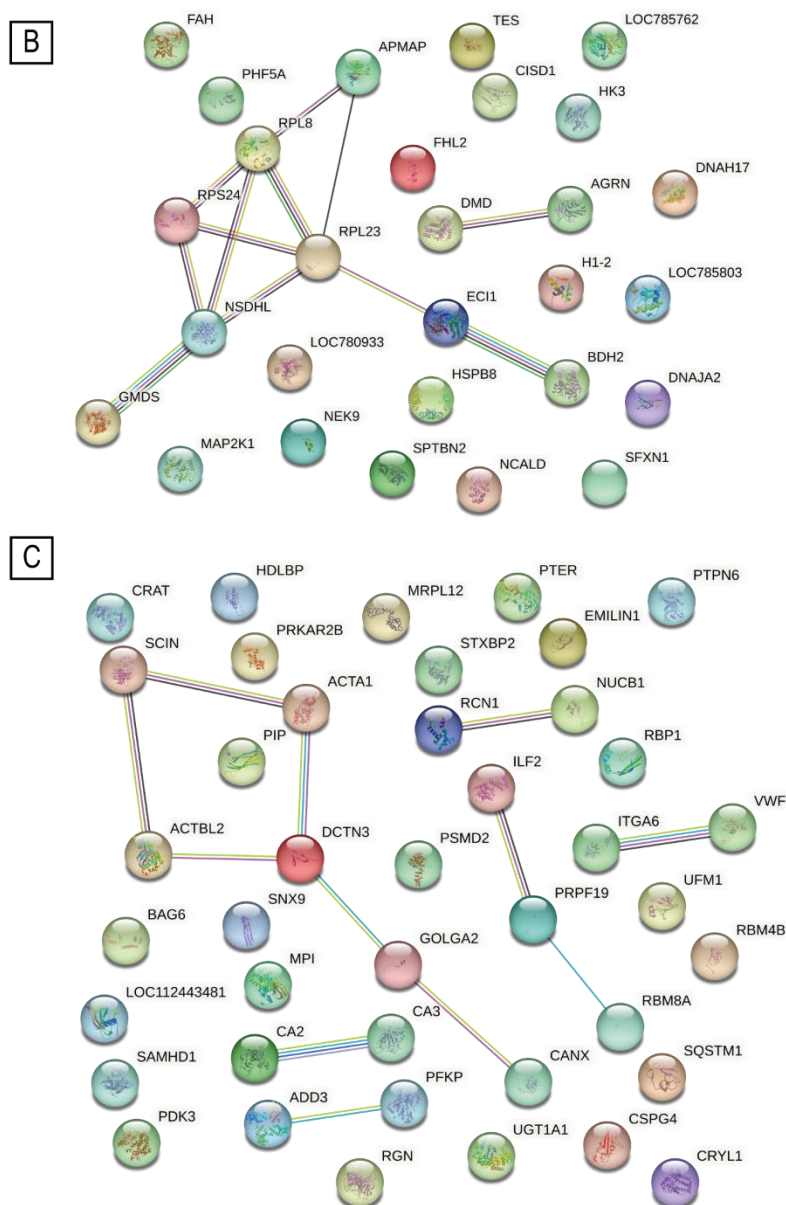


FIGURA 2.5 - Redes de interação proteína-proteína preditas pelo software STRING 12.0 a partir da lista de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos de baixa e alta ERM (A); proteínas identificadas exclusivamente nos grupos de alta ERM (B); proteínas identificadas exclusivamente nos grupos de baixa ERM (C) no tecido ruminal bovino. Os nós são proteínas do banco de dados *Bos taurus*, e as bordas representam diferentes evidências das anotações funcionais previstas (linha vermelha - fusão; linha verde - vizinhança; linha azul - co-ocorrência; linha roxa - experimental; linha amarela - mineração de texto; linha azul clara - banco de dados; linha preta - co-expressão).

2.5 – DISCUSSÃO

Investigar as proteínas associadas à emissão de metano em ruminantes é fundamental, pois elas desempenham papéis essenciais nos mecanismos que levam à produção de metano. Compreender esses processos é crucial para desenvolver estratégias eficazes na mitigação das emissões de gases de efeito estufa, além de fornecer informações valiosas sobre a fisiologia do rúmen e a saúde animal. Estudos aprofundados nessa área podem contribuir para a formulação de dietas otimizadas e uma maior eficiência alimentar, beneficiando tanto a sustentabilidade ambiental quanto a produtividade agrícola. Ademais, os avanços recentes em metodologias proteômicas ampliaram significativamente a cobertura do proteoma e aumentaram a confiabilidade na identificação de proteínas e peptídeos em amostras biológicas complexas, como o tecido ruminal (SUN et al., 2011; GUO et al., 2019; HU et al., 2024).

O presente estudo teve como objetivo investigar as diferenças no perfil proteômico do tecido ruminal em bovinos da raça Nelore com diferentes níveis de emissão residual de metano (ERM). Usando a técnica de proteômica quantitativa sem marcação de alta resolução, 1282 proteínas foram quantificadas, sendo 1211 comuns a ambos os grupos de ERM, 23 exclusivas ao grupo de alta emissão (H) e 43 exclusivas ao grupo de baixa emissão (L). A análise de proteínas diferencialmente abundantes revelou que 37 proteínas apresentaram diferenças significativas na abundância entre os grupos de alta (H) e baixa (L) emissão de metano. Essas diferenças no perfil proteômico fornecem informações sobre os processos biológicos que podem regular a produção de metano no rúmen.

2.5.1 – Proteínas diferencialmente abundantes

As proteínas mais fortemente reguladas positivamente no grupo L (Tabela 1), como catepsina Z (CTSZ), subunidade NDUFA4 do citocromo c oxidase (NDUFA4) e legumaina (LGMN), estão envolvidas em processos celulares relacionados à degradação de proteínas e metabolismo energético. A catepsina Z e a legumaina, ambas cisteína proteases lisossômicas, desempenham papéis cruciais na degradação de proteínas (TURK et al., 2000; SHIM et al., 2013; TALUKDER et al., 2018; ZHAO et al. 2018; CHOI et al. 2019), processo que pode afetar a eficiência da fermentação ruminal e possivelmente a produção de metano. Subunidade NDUFA4

do citocromo c oxidase, por sua vez, está envolvida na cadeia respiratória mitocondrial (BALSA et al., 2012; CASAL et al., 2018), que podem influenciar a eficiência do metabolismo energético e do balanço redox no rúmen, fatores que podem alterar a atividade microbiana e, conseqüentemente, a emissão de metano (HARPER et al., 2002; CASAL et al., 2018).

Por outro lado, as proteínas fosfatase alcalina (ALPL) e lactaderina (MFGE8), mais abundantes no grupo H, estão envolvidas em processos que podem estar associados a respostas inflamatórias e regulação imunológica (HETTINGA et al., 2011; KAMIŃSKA et al., 2018). A ALPL é uma enzima envolvida no metabolismo ósseo (MCDOUGALL et al., 2002; LIU et al., 2018) e também está associada a processos inflamatórios, o que pode indicar aumento da inflamação ruminal em animais com alta emissão de metano. A MFGE8 tem sido associada à fagocitose de células apoptóticas (KINUGAWA et al., 2013) e à modulação da resposta imune (KAMIŃSKA et al., 2018), e sua expressão aumentada no grupo H também pode sugerir um ambiente ruminal menos eficiente no controle da microbiota ruminal, levando a uma maior produção de metano como subproduto da fermentação (MAGAÇO e DUARTE, 2019).

A análise GO revelou um enriquecimento significativo de proteínas associadas ao citoesqueleto, projeções celulares, actina filamentosa e sistema endomembranar. A associação com o citoesqueleto e os filamentos de actina sugere que as proteínas diferencialmente expressas estão envolvidas em processos de remodelação celular (BONDZIO et al., 2011; MURALI e MACDONALD, 2018), o que pode impactar a função celular e a interação com a microbiota ruminal (DEMAIS et al., 2014). Apoiando esses achados, o termo "organização do citoesqueleto de actina" também foi significativamente enriquecido entre as DAPs. Uma maior eficiência na organização do citoesqueleto pode facilitar a absorção de nutrientes no rúmen (PERRIN e VIGNJEVIC, 2023) e a atividade microbiana, o que pode contribuir para a redução da produção de metano, promovendo uma fermentação mais eficiente.

Foram identificadas quatro proteínas diferencialmente reguladas associadas à organização do citoesqueleto: a subunidade alfa da proteína de capeamento da F-actina (CAPZA2), a profilina-2 (PFN2), a proteína RAC3 e a smoothelina (SMTN). Dentre elas, RAC3 e SMTN apresentaram uma regulação positiva mais forte no grupo L. RAC3 está envolvida em processos de remodelação

celular e sinalização (DONG et al., 2014; De CURTIS, 2019; SCALA et al., 2022), enquanto SMTN desempenha um papel fundamental na regulação da contração muscular (NEISSEN et al., 2004; BORMAN et al., 2004; MURALI et al., 2018). Essas diferenças na expressão, relacionadas à função celular e à homeostase energética, podem influenciar a atividade dos microrganismos ruminais. Em particular, a eficiência da degradação de fibras e produção de ácidos graxos voláteis pode ser afetada, reduzindo a necessidade da produção de metano como subproduto da fermentação (JOHNSON e JOHNSON, 1995; GOULARTE et al., 2011).

O principal cluster das proteínas diferencialmente abundantes (Figura 2.4A), identificado a partir da construção da rede de interação proteína-proteína, destacou proteínas como LRPPRC, COX2, NDUFA4 e RAB5C, que desempenham papéis fundamentais no equilíbrio metabólico do tecido ruminal e na produção de energia. A interação entre essas proteínas indica que os bovinos com baixas emissões de metano podem apresentar uma eficiência superior no metabolismo energético celular, corroborando os resultados descritos acima. Em particular, a maior abundância de COX2, um componente chave da cadeia respiratória mitocondrial, e de NDUFA4, integrado ao complexo NADH desidrogenase, no grupo de baixa emissão sugere uma utilização mais eficiente da energia. Esse aumento na atividade mitocondrial pode contribuir para uma maior produção de ATP, minimizando a produção de metano como subproduto da fermentação ruminal.

2.5.2 – Proteínas exclusivas para os grupos de baixa e alta ERM

A análise do enriquecimento funcional foi realizada separadamente para as 43 e 28 proteínas exclusivas dos grupos RME L e H. Para as proteínas identificadas exclusivamente no grupo L, foram encontrados 3 termos GO, enquanto 12 termos GO foram definidos para o grupo H (Tabela 2). Focando nos termos mais relevantes, observamos que as proteínas exclusivas do grupo L estão predominantemente associadas à ligação ao íon zinco e à ligação do mRNA. Em contraste, as proteínas exclusivas do grupo H estão fortemente relacionadas à atividade da lisozima.

A proteína de motivo de ligação de RNA 4B (RBM4B) e 8A (RBM8A) foram identificadas entre os termos GO do grupo L, sendo ambas proteínas de ligação ao RNA. A proteína RBM4B desempenha papéis cruciais em vários processos celulares, incluindo a regulação do splicing de RNA, tradução e silenciamento de RNA

(MARKUS e MORRIS, 2009; OLIVEIRA et. al., 2017). De maneira similar, o gene RBM8A regula vários processos biológicos, como a transcrição do RNA, o ciclo celular e a apoptose (ZOU et al., 2015; LIN et al., 2021), destacando sua importância na regulação da expressão gênica e na manutenção da homeostase celular. Esses achados indicam que as proteínas exclusivas desse grupo podem estar envolvidas em processos de regulação transcricional e tradução (MARKUS e MORRIS, 2009; WANG et al., 2014), possivelmente relacionados à síntese proteica e processamento de RNA (ALVES e GOLDENBERG, 2016). A associação com íons de zinco também é relevante, uma vez que o zinco é um cofator essencial em várias enzimas, incluindo aquelas envolvidas em processos antioxidantes e sinalização celular (GUMULEC et al., 2011). Isso sugere que as proteínas exclusivas do grupo L podem estar favorecendo a estabilidade estrutural e a funcionalidade das enzimas, o que poderia contribuir para maior eficiência energética e menor desperdício de energia no metabolismo ruminal.

Além disso, para as proteínas exclusivas do grupo L, a análise do PPI revelou um agrupamento principal envolvendo proteínas relacionadas à organização celular e dinâmica do citoesqueleto (SCIN, ACTBL2, ACTA1, DCTN3, GOLGA2, CANX) (Figura 2.4B). Como mencionado anteriormente, a eficiência na organização do citoesqueleto pode facilitar a absorção de nutrientes e a interação com a microbiota ruminal, o que poderia contribuir para uma fermentação mais eficiente e, conseqüentemente, para uma menor produção de metano.

Em relação às proteínas exclusivas do grupo H, a lisozima (LOC785803, LOC781146, LOC112446693 ou LOC617219) está presente em cinco dos termos GO mais significativos, sugerindo que as proteínas deste grupo podem estar envolvidas em mecanismos de defesa, possivelmente desempenhando um papel no combate a infecções bacterianas no rúmen.

A lisozima é membro de uma família bem caracterizada de proteínas de defesa do hospedeiro nativas e altamente conservadas chamadas defensivas, que existem em várias isoformas e desempenham várias funções, desde a digestão dos alimentos até a resposta imune (DOBSON et al., 1984; LIU et al., 2005; LEE et al., 2009). Essas proteínas exibem atividade bacteriolítica, sendo particularmente eficientes na destruição de bactérias Gram-positivas devido à sua capacidade de hidrolisar a ligação β -1,4-glicosídica presente nas paredes celulares dessas bactérias,

levando à morte celular. Em contraste, o efeito contra bactérias Gram-negativas é significativamente mais fraco, pois a membrana externa dessas bactérias contém uma camada protetora de lipopolissacarídeos (LEŚNIEWSKI & YANG, 2021; MARINO et al., 2024). Além disso, a lisozima também exerce atividade enzimática no processo de digestão. De acordo com SAHOO et al. (2012), a lisozima foi recrutada como enzima digestiva em alguns animais, destacando seu papel não apenas na defesa do hospedeiro, mas também na digestão de substâncias alimentares.

O estudo de BISWAS et al. (2016) forneceu importantes evidências sobre o potencial da lisozima para reduzir as emissões de metano (CH₄) durante a fermentação ruminal *in vitro*. Os resultados mostraram que o aumento da quantidade de lisozima adicionada ao substrato alimentar diminuiu a concentração de metano, sugerindo que a lisozima pode melhorar a fermentação ruminal *in vitro* e reduzir as emissões de CH₄. Curiosamente, no presente estudo a lisozima foi identificada no grupo de animais com maiores emissões residuais de metano. Esse achado sugere que, embora a lisozima tenha sido associada à redução das emissões de metano em outros estudos *in vitro*, seu comportamento em animais com maiores emissões de metano pode ser distinto. Essa discrepância pode ser atribuída a vários fatores, como diferenças nas condições experimentais (*in vitro* vs. *in vivo*), variações na dieta e na composição da microbiota ruminal dos animais, ou mesmo a quantidade de lisozima presente nas amostras, que podem não ser suficientes para alterar significativamente a produção de metano.

As proteínas exclusivas do grupo de alta emissão de metano formaram dois clusters na análise PPI (Figura 2.4C). A presença de proteínas ribossômicas, como RPL8, RPS24 e RPL23 no cluster principal destaca intensa atividade na síntese proteica, o que pode refletir uma taxa metabólica mais alta. Esse aumento na atividade metabólica pode, por sua vez, levar a uma maior produção de metano devido ao desperdício de energia no processo. Além disso, proteínas associadas à biossíntese de lipídios e gliconjugados (NSDHL, GMDS, ECI1, BDH2) indicam que o metabolismo lipídico no grupo de alta emissão pode estar mais alterado, sugerindo uma modificação na via lipídica. O aumento da síntese de lipídios e gliconjugados pode estar relacionado a um maior desperdício de energia no metabolismo ruminal, o que favorece a produção de metano. O segundo cluster, composto pelas proteínas DMD e AGRN, está relacionado às funções musculares, sugerindo que pode haver

alterações nas funções musculares no grupo de alta emissão. Essas alterações podem refletir adaptações fisiológicas mais amplas no organismo do animal, impactando a eficiência metabólica no rúmen.

2.6 – CONCLUSÕES

Este estudo revelou diferenças importantes no perfil proteômico do tecido ruminal de bovinos Nelore com diferentes níveis de emissão residual de metano. Os resultados sugerem que a eficiência metabólica no rúmen está fortemente ligada aos níveis de metano emitidos. No grupo de baixa emissão, a maior abundância de proteínas relacionada à degradação proteica e ao metabolismo energético indica um processo de fermentação mais eficiente, com menor desperdício energético e, conseqüentemente, menor produção de metano. No grupo de alta emissão, as proteínas associadas à síntese proteica e à biossíntese lipídica sugerem um aumento no metabolismo celular, resultando em maior produção de metano devido à ineficiência no uso de energia. A presença de lisozima no grupo de alta emissão, embora associada à redução do metano em estudos *in vitro*, sugere maior complexidade nos mecanismos envolvidos, possivelmente influenciados por fatores como dieta e microbiota ruminal. Esses resultados destacam a complexidade do metabolismo ruminal e suas implicações para a emissão de metano, enfatizando a necessidade de mais investigações para entender os mecanismos moleculares que regulam a eficiência metabólica e a produção de metano em bovinos.

CONCLUSÕES FINAIS

Em conjunto, estes dois estudos demonstram que a composição proteômica do rúmen de bovinos Nelore é moldada pelo perfil nutricional, que pode interferir na eficiência metabólica refletida nas emissões de metano, uma vez que se trata de animais submetidos aos mesmos tratamentos. Dietas ricas em grãos estimulam respostas mitocondriais e sinais de estresse oxidativo, enquanto a inclusão de subprodutos agroindustriais favorece adaptações que envolvem o processamento de mRNA, a regulação da degradação proteica e a remodelação da matriz extracelular, mantendo a estrutura e a função do tecido ruminal. Paralelamente, animais com menor emissão residual de metano exibem maior abundância de proteínas ligadas à degradação proteica e ao metabolismo energético, indicativo de fermentação mais eficiente e aproveitamento energético otimizado, ao passo que aqueles com emissões elevadas apresentam aumento de proteínas associadas à síntese proteica e à biossíntese lipídica, refletindo um uso menos eficiente da energia e maior geração de metano.

Assim, a integração destas evidências ressalta que a modulação proteômica do rúmen é um reflexo fiel das condições nutricionais e do balanço energético celular, influenciando diretamente tanto a saúde e a produtividade animal quanto o perfil de emissões de gases de efeito estufa. A compreensão desses mecanismos moleculares abre caminho para estratégias de manejo e formulação de dietas que visam simultaneamente maximizar a eficiência alimentar e reduzir as emissões de gases de efeito estufa na pecuária de corte.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef Report 2024 - Perfil da pecuária no Brasil. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2024-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>>. Acesso em: 28 jan. 2025.
- AEBERSOLD, R., & MANN, M. "Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function". *Nature*, **537** (7620), 347-355, 2016.
- ALMEIDA, A. M.; ALI, S. A.; CECILIANI, F.; ECKERSALL, P. D.; HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E.; HAN, R. ... ZACHUT, M. "Domestic animal proteomics in the 21st century: A global retrospective and viewpoint analysis". *Journal of Proteomics*, **241**, 104220, 2021.
- ALMEIDA, A. M.; BASSOLS, A.; BENDIXEN, E.; BHITE, M.; CECILIANI, F.; CRISTOBAL, S. ...TURK, R. "Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences". *Animal*, **9** (1), 1-17, 2015.
- ALMEIDA, A.; ECKERSALL, D. & MILLER, I. "Proteomics in domestic animals, from Farm to Systems Biology". Springer, Cham, Switzerland, 2018.
- ALVES, L. R. & GOLDENBERG, S. "RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa". *World Journal of Biological Chemistry*, **7**(1), 78-87, 2016.
- ANDERSEN, T. O.; KUNATH, B. J.; HAGEN, L. H.; ARNTZEN, M. Ø. & POPE, P. B. "Rumen metaproteomics: closer to linking rumen microbial function to animal productivity traits". *Methods*, **186**, 42-52, 2021.
- ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHID, M. & RASOOL, M. H. "Proteomics: technologies and their applications". *Journal of Chromatographic Science*, **55** (2), 182–196, 2016.
- BALSA, E., MARCO, R., PERALES-CLEMENTE, E., SZKLARCZYK, R., CALVO, E., LANDÁZURI, M. O., & ENRÍQUEZ, J. A. "NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain". *Cell Metabolism*, **16** (3), 378–386, 2012.
- BAMPIDIS, V. A. & ROBINSON, P. H. "Citrus by-products as ruminant feed: a review". *Animal Feed Science and Technology*, **128** (3/4), 175-217, 2006.
- BANNINK, A.; FRANCE, J.; LOPEZ, S.; GERRITS, W.; KEBREAB, E.; TAMMINGA, S. & DIJKSTRA, J. "Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall". *Animal Feed Science and Technology*, **143**, 3–26, 2008.
- BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T.; ELOIZA & TAJARA, E. H. "Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas". *Revista da Associação Médica Brasileira*, **58** (3), 366-375, 2012.

BEAUCHEMIN, K. A.; UNGERFELD, E. M.; ECKARD, R. J. & WANG, M. Review: "Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation". *Animal*, **14** (1), 2–16, 2020.

BENDIXEN, E.; DANIELSEN, M.; GIANAZZA, E.; HOLLUNG, K. & MILLER, I. "Farm animal proteomics - A review". *Journal of proteomics*, **74**, 282– 293, 2011.

BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". *Journal of the Royal Statistical Society*, **57** (1), 289-300, 1995.

BERGEN, W. G. "Contribution of research with farm animals to protein metabolism concepts: A historical perspective". *Journal of Nutrition*, **137** (3), 706-710, 2007.

BERGMAN, E. N. "Energy contributions of volatile fatty-acids from the gastrointestinal-tract in various species". *Physiological Reviews*, **70**, 567–590, 1990.

Bica, R.; Palarea-Albaladejo, J.; Kew, W.; Uhrin, D.; Pacheco, D.; Macrae, A. & Dewhurst, R. J. "Nuclear magnetic resonance to detect rumen metabolites associated with enteric methane emissions from beef cattle". *Scientific Reports*, 10:5578, 2020.

BILIĆ, P.; KULEŠ, J.; GALAN, A.; GOMES DE PONTES, L.; GUILLEMIN, N.; HORVATIĆ, A.; SABES, A. F.; MRLJAK, V. & ECKERSALL, P. D. "Proteomics in veterinary medicine and animal science: neglected scientific opportunities with immediate impact". *Proteomics*, **18** (14), 1800047, 2018.

BISWAS, A. A.; LEE, S. S.; MAMUAD, L. L.; KIM, S-H.; CHOI, Y-J.; BAE, G-S.; LEE, K.; SUNG, H-G. & LEE, S-S. "Use of Lysozyme as a Feed Additive on In vitro Rumen Fermentation and Methane Emission". *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*, **29**, 1601-1607, 2016.

BLOCK, K. L.; VORNLOCHER, H-P. & HERSHEY, J. W. B. "Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3". *The Journal of Biological Chemistry*, **273**(48), 31901–31908, 1998.

BOISSAN, M.; DABERNAT, S.; PEUCHANT, E.; SCHLATTNER, U.; LASCU, I. & LACOMBE, M-L. "The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement". *Molecular and Cellular Biochemistry*, **329**, 51–62, 2009.

BONDZIO, A.; GABLER, C.; BADEWIEN-RENTZSCH, B.; SCHULZE, P.; MARTENS, H. & EINSPIER, R. "Identification of differentially expressed proteins in ruminal epithelium in response to a concentrate-supplemented diet". *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **301**, 260–268, 2011.

BORMAN, M. A.; MACDONALD, J. A. & HAYSTEAD, T. A. J. "Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins". *FEBS Letters*, **573**(1-3), 207–213, 2004.

BOUDON, S.; OUNAÏSSI, D.; VIALA, D.; MONTEILS, V.; PICARD, B. & CASSAR-MALEK, I. "Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers". *Journal of Proteomics*, **217**, 103685, 2020.

BRADFORD, M. "A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2), 248–254, 1976.

BRODBELT, J. S. "Deciphering combinatorial post-translational modifications by top-down mass spectrometry". *Current Opinion in Chemical Biology*, **70**, 102180, 2022.

BROWN, M.S.; PONCE, C.H. & PULIKANTI, R. "Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism". *Journal of Animal Science*, **84**, 25–33, 2006.

CARNIELLI, C. M.; MACEDO, C. C. S.; DE ROSSI, T.; GRANATO, D. C.; RIVERA, C.; DOMINGUES, R. R.; ... PAES LEME, A. F. "Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer". *Nature Communications*, **9** (1):3598, 2018.

CARVALHO, M. E. Caracterização da frequência de polimorfismo em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Pirassununga, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP, 2008. Dissertação de mestrado.

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*, **96**(3), 1318–1324, 2014.

CASAL, A., GARCIA-ROCHE, M., NAVAJAS, E. A., CASSINA, A., & CARRIQUIRY, M. "Hepatic mitochondrial function in Hereford steers with divergent residual feed intake phenotypes". *Journal of Animal Science*, **96**, 4431–4443, 2018.

CECILIANI, F.; ECKERSALL, D.; BURCHMORE, R & LECCHI, C. "Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics". *Veterinary Pathology*, **51** (2), 351-362, 2014.

CHEN, C-W.; WANG, H-L.; HUANG, C-W.; HUANG, C-Y.; LIM, W. K.; TU, I-C... & CHANG, Z-F. "Two separate functions of NME3 critical for cell survival underlie a neurodegenerative disorder". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**(2), 566–574, 2018.

CHEN, W.-H.; LEE, S-C.; SABU, S.; HUEI-CHUN, P.; CHUNG, S-C.; HAN, C-C. & CHANG, H-C. "Solid-phase extraction and elution on diamond (SPEED): a fast and general platform for proteome analysis with mass spectrometry". *Analytical Chemistry*, **78**, 4228–4234, 2006.

CHOI, K.-M.; JOO, M.-S.; CHO, D.-H.; HAN, H.-J.; KIM, M. S.; CHO, M. Y.; JUNG, S. H.; KIM, D-H. & PARK, C.-I. "Functional analysis and gene expression profiling of extracellular cathepsin Z in red sea bream, *Pagrus major*". *Fish & Shellfish Immunology*, **93**, 208-215, 2019.

CHOI, M. "MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments". *Bioinformatics*, **30**, 2524–2526, 2014.

CLEMMONS, B. A., MARTINO, C., SCHNEIDER, L. G., LEFLER, J., EMBREE, M. M., & MYER, P. R. "Temporal stability of the ruminal bacterial communities in beef steers". *Scientific Reports*, **9** (1), 9522, 2019.

CORBETT, J. R.; ROBINSON, D. E. & PATRIE, S. M. "Robustness and Ruggedness of Isoelectric Focusing and Superficially Porous Liquid Chromatography with Fourier Transform Mass Spectrometry". *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **32**, 346-354, 2021.

CORREDDU, F.; LUNESU, M. F.; BUFFA, G.; ATZORI, A. S.; NUDDA, A.; BATTACONE, G. & PULINA, G. "Can Agro-industrial by-products rich in polyphenols be advantageously used in the feeding and nutrition of dairy small ruminants?". *Animals*, **10** (1), 131, 2020.

COX, J.; HEIN, M. Y.; LUBER, C. A.; PARON, I.; NAGARAJ, N. & MANN, M. "Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed maxLFQ". *Molecular & Cellular Proteomics*, **13**, 2513–2526, 2014.

CROFT, D.; O'KELLY, G.; WU, G.; HAW, R.; GILLESPIE, M.; MATTHEWS, L.; CAUDY, M.; GARAPATI, P.; GOPINATH, G.; JASSAL, B.; JUPE, S.; KALATSKAYA, S. M.; MAY, B.; NDEGWA, N.; SCHMIDT, E.; SHAMOVSKY, V.; YUNG, C.; BIRNEY, E.; HERMJAKOB, H.; D'EUSTACHIO, P. & STEIN, L. "Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes". *Nucleic Acids Research*, **39**, 691–697, 2011.

CUPP-SUTTON, K. A. & WU, S. "High-throughput quantitative top-down proteomics". *Molecular Omics*, **16**, 91-99, 2020.

D'ALESSANDRO, A. & ZOLLA, L. "Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology". *Journal of Proteomics*, **78**, 558-577, 2013.

D'ALESSANDRO, A.; RINALDUCCI, S.; MARROCCO, C.; ZOLLA, V.; NAPOLITANO, F. & ZOLLA, L. "Love me tender: an Omics window on the bovine meat tenderness network". *Journal of Proteome Research*, **75**, 4360–4380, 2012.

DANIELSEN, M.; CODREA, M.C.; INGVARTSEN, K.L.; FRIGGENS, N. C.; BENDIXEN, E. & RONTVED, C. M. "Quantitative milk proteomics — host responses to lipopolysaccharide-mediated inflammation of bovine mammary gland". *Proteomics*, **10**, 2240–2249, 2010.

DE CURTIS, I. "The RAC3 GTPase in neuronal development, neurodevelopmental disorders, and cancer". *Cells*, **8**(9), 1063, 2019.

DEMAIS, V.; AUDRAIN, C.; MABILLEAU, G.; CHAPPARD, D. & BASLÉ, M. F. "Diversity of bone matrix adhesion proteins modulates osteoblast attachment and organization of actin cytoskeleton". *Morphologie*, **98** (321), 53–64, 2014.

DESHMUKH, A. S.; STEENBERG, D. E.; HOSTRUP, M.; BIRK, J. B.; LARSEN, J. K.; SANTOS, A.; KJØBSTED, R.; HINGST, J. R.; SCHÉELE, C. C.; MURGIA, M.; KIENS, B.; RICHTER, E. A.; MANN, M. & WOJTASZEWSKI, J. F. P. "Deep muscle-proteomic analysis of freeze-dried human muscle biopsies reveals fiber type-specific adaptations to exercise training". *Nature Communications*, **12**, 304, 2021.

DEUSCH, S.; CAMARINHA-SILVA, A.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; RODEHUTSCORD, M. & SEIFERT, J. "A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments". *Frontiers in Microbiology*, **8** (1605), 1-21, 2017.

DOBSON, D. E.; PRAGER, E. M. & WILSON, A. C. "Stomach Lysozymes of Ruminants". *The Journal of Biological Chemistry*, **259** (18), 11607-11616, 1984.

DONG, S.; ZHAO, J.; WEI, J.; BOWSER, R. K.; KHOO, A.; LIU, Z.; LUKETICH, J. D.; PENNATHUR, A.; MA, H. & ZHAO, Y. "F-box protein complex FBXL19 regulates TGF β 1-induced E-cadherin down-regulation by mediating Rac3 ubiquitination and degradation". *Molecular Cancer*, **13**: 76, 2014.

DONOGHUE, K. A.; BIRD-GARDINER, T.; ARTHUR, P. F.; HERD, R. M. & HEGARTY, R. F. "Genetic and phenotypic variance and covariance components for methane emission and postweaning traits in Angus cattle". *Journal of Animal Science*, **94**, 1438–1445, 2016.

DUBOST, A.; MICOL, D.; LETHIAS, C. & LISTRAT, A. "New insight of some extracellular matrix molecules in beef muscles. Relationships with sensory qualities". *Animal*, **10**(5), 821–828, 2016.

Duthie, C-A.; Rooke, J. A.; Hyslop, J. J. & Waterhouse, A. "Methane emissions from two breeds of beef cows offered diets containing barley straw with either grass silage or brewers' grains". *Animal*, **9**(10), 1680–1687, 2015

DUTHIE, C.-A.; HASKELL, M.; HYSLOP, J. J.; WATERHOUSE, A.; WALLACE, R. J.; ROEHE, R. & ROOKE, J. A. "The impact of divergent breed types and diets on methane emissions, rumen characteristics and performance of finishing beef cattle". *Animal*, **11**(10), 1762–1771, 2017.

EGGLER, A. L.; LUO, Y.; VAN BREEMEN, R.B. & MESECAR, A.D. "Identification of the highly reactive cysteine 151 in the chemopreventive agent-sensor Keap1 protein is method-dependent". *Chemical Research in Toxicology*, **20**, 1878–1884, 2007.

ELOLIMY, A. A.; ABDEL-HAMIED, E.; HU, L.; MCCANN, J. C.; SHIKE, D. W.; LOOR, J. J. "Rapid communication: Residual feed intake in beef cattle is associated with differences in protein turnover and nutrient transporters in ruminal epithelium". *Journal of Animal Science*, **97**(5), 2181–2187, 2019.

ERDE, J.; LOO, R. R. O. & LOO, J. A. "Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments". *Journal of Proteome Research*, **13**, 1885–1895, 2014.

ERIKSSON, J. E.; DECHAT, T.; GRIN, B.; HELFAND, B.; MENDEZ, M.; PALLARI, H-M. & GOLDMAN, R. D. "Introducing intermediate filaments: from discovery to disease". *Journal of Clinical Investigation*, **119**(7):1763–1771, 2009.

ETHIER, M.; HOU, W.; DUEWEL, H. S. & FIGEYS, D. "The proteomic reactor: a microfluidic device for processing minute amounts of protein prior to mass spectrometry analysis". *Journal of Proteome Research*, **5**, 2754–2759, 2006.

ETSCHMANN, B.; SUPLIE, A. & MARTENS, H. "Change of ruminal sodium transport in sheep during dietary adaptation". *Archives of Animal Nutrition*, **63**, 26–38, 2009.

FEIST, P. & HUMMON, A. B. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences*, **16** (2), 3537-3563, 2015.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F. & WHITEHOUSE, C. M. "Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules". *Science*, **246**, 64–71, 1989.

FLAY, H. E.; KUHN-SHERLOCK, B.; MACDONALD, K. A.; CAMARA, M.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; DONAGHY, D. J. & ROCHE, J. R. "Selecting cattle for low residual feed intake did not affect daily methane production but increased methane yield". *Journal of Dairy Science*, **102** (3), 2708–2713, 2019.

GAGAOUA, M.; BONNET, M.; DE KONING, L. & PICARD, B. "Reverse Phase Protein array for the quantification and validation of protein biomarkers of beef qualities: The case of meat color from Charolais breed". *Meat Science*, **145**, 308–319, 2018.

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

GALLI, F.; ROSSI, M.; D'ALESSANDRA, Y.; DE SIMONE, M.; LOPARDO, T.; HAUPT, Y.; ALSHEICH-BARTOK, O.; ANZI, S.; SHAULIAN, E.; CALABRÒ, V.; MANTIA, G. L. & GUERRINI, L. "MDM2 and Fbw7 cooperate to induce p63 protein degradation following DNA damage and cell differentiation". *Journal of Cell Science*, **123**(14), 2423–2433, 2010.

GERBER, P. J., HRISTOV, A. N., HENDERSON, B., MAKKAR, H., OH, J., LEE, C., MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T.; FIRKINS, J.; ROTZ, A.; DELL, C.; ADESOGAN, A. T.; YANG, W. Z.; TRICARICO, J. M.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; DIJKSTRA, J. & OOSTING, S. "Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review". *Animal*, **7**, 220–234, 2013.

GLATTER, T.; AHRNÉ, E.; AEBERSOLD, R.; HECK, A. J. R. & SCHMIDT, A. "Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/trypsin proteolysis over trypsin digestion". *Journal of Proteome Research*, **11**, 5145–5156, 2012.

GOES, R. H. T. B.; TRAMONTINI, R. C. M.; ALMEIDA, G. D. "Degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta de diferentes subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação de bovinos". *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **9** (3), 715-725, 2008.

GOLDMAN, R. D.; KHUON, S.; CHOU, Y. H.; OPAL, P. & STEINERT, P. M. "The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity". *Journal of Cell Biology*, **134**(4), 971–983, 1996.

GOODLAD, R. A. "Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep". *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, **66**, 487–499, 1981.

GOULARTE, S. R.; ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; ÍTAVO, C. C. B. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; FAVARO, S. P.; DIAS, A. M.; TORRES JUNIOR, R. A. A. & BITTAR, C. M. M. "Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta". *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **63** (6), 1479-1486, 2011.

GRESSLEY, T. F.; HALL, M. B. & ARMENTANO, L. E. "Ruminant nutrition symposium: Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants". *Journal of Animal Science*, **89**(4), 1120-1130, 2011.

GUMULEC, J.; MASARIK, M.; KRIZKOVA, S.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; HRABETA, J.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M. & KIZEK, R. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma". *Current Medicinal Chemistry*, **18**(33), 5041–5051, 2011.

GUO C.; SUN D.; WANG X. & MAO S. "A combined metabolomic and proteomic study revealed the difference in metabolite and protein expression profiles in ruminal tissue from goats fed hay or high-grain diets". *Frontiers in Physiology*, **10** (66), 2019.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H. & AEBERSOLD, R. "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags". *Nature Biotechnology*, **17** (10), 994–999, 1999.

HAGEN, L. H., BROOKE, C. G., SHAW, C. A., NORBECK, A. D., PIAO, H., ARNTZEN, M. Ø.; OSLOM, H. M.; COPELAND, A.; ISERN, N.; SHUKLA, A.; ROUX, S.; LOMMBARD, V.; HENRISSAT, B.; O'MALLEY, M. A.; GRIGORIEV, I. V.; TRINGE, S. G.; MACKIE, R. I.; PASA-TOLIC, L.; POPE, P. B. & HESS, M. "Proteome specialization of anaerobic fungi during ruminal degradation of recalcitrant plant fiber". *The ISME Journal*, 2020.

HAN, X.; ASLANIAN, A. & YATES, J. R. "Mass spectrometry for proteomics". *Current Opinion in Chemical Biology*, **12**, 483–490, 2008.

HARPER, M. E.; ANTONIOU, A.; BEVILACQUA, L.; BEZAIRE V. & MONEMDJOU S. "Cellular energy expenditure and the importance of uncoupling". *Journal of Animal Science*, **80**, 90–97, 2002.

HARTWIG, B.; BORM, B.; SCHNEIDER, H.; ARIN, M. J. & KIRFEL, G. "Laminin-5-deficient human keratinocytes: Defective adhesion results in a saltatory and inefficient mode of migration". *Experimental Cell Research*, **313**(8), 1575-1587, 2007.

HEMMAVANH, C.; KOCH, M.; BIRK, D. E. & ESPANA, E. M. "Abnormal corneal endothelial maturation in collagen XII and XIV null mice". *Invest Ophthalmol & Visual Science*, **54**(5), 3297–3308, 2013.

HETTINGA, K.; VAN VALENBERG, H.; DE VRIES, S.; BOEREN, S.; VAN HOOIJDONK, T.; VAN ARENDONK, J. & VERVOORT, J. "The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk". *PLoS ONE*, **6**(4), e19433, 2011.

HILL, R. A. *Feed Efficiency in the Beef Industry 287*. Wiley-Blackwell, Ames, 2012.

HRISTOV, A. N.; OH, J.; GIALLONGO, F.; FREDERICK, T.; WEEKS, H.; ZIMMERMAN, P. R.; HARPER, M. T.; HRISTOVA, R. A.; ZIMMERMAN, R. S. &

Branco, A. F. "The Use of an automated system (GreenFeed) to monitor enteric methane and carbon dioxide emissions from ruminant animals". *Journal of Visualized Experiments*, 103, e52904, 2015.

HU, R.; SHAH, A. M.; HAN, Q.; MA, J.; DAI, P.; MENG, Y.; PENG, Q.; JIANG, Y.; KONG X.; WANG, Z. & ZOU, H. "Proteomics reveals the obstruction of cellular ATP synthesis in the ruminal epithelium of growth-retarded Yaks". *Animals*, **14**, 1243, 2024.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources". *Nature Protocols*, **4** (1), 44–57, 2009.

HUGHES, C. S.; MOGGRIDGE, S; MÜLLER, T; SORENSEN, P. H; MORIN, G. B. & KRIJGSVEL, J. "Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments". *Nature protocols*, **14**, 68–85, 2019.

HUNT, D. F.; YATES, J. R., III; SHABANOWITZ, J.; WINSTON, S. & HAUER, C. R. "Protein sequencing by tandem mass spectrometry". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **83**, 6233–6237, 1986.

HUWS, S. A.; CREEVEY, C.; OYAMA, L. B.; MIZRAHI, I.; DENMAN, S. E.; POPOVA, M... MORGAVI, D. P. "Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future". *Frontiers in Microbiology*, **9**(2161), 2018.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). *Climate Change 2014. Synthesis report 2014*.

JIA, X.; VEISETH-KENT, G.; GROVE, H.; KUZIORA, P.; AASS, L.; HILDRUM, K. I. & HOLLUNG, K. "Peroxiredoxin-6 - A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle". *Journal of Animal Science*, **87**, 2391-2399, 2009.

JIANG, L.; HE, L. & FOUNTOULAKIS, M. "Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis". *Journal of Chromatography A*, **1023**, 317–320, 2004.

JOHNSON, K. A., & JOHNSON, D. E. "Methane emissions from cattle". *Journal of Animal Science*, **73**(8), 2483–2492, 1995.

JÚNIOR, R. G.; MARTINS, C. F.; PEREIRA, L. G. R. & CARVALHO, M. A. "Subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos: caroço de algodão". Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

KAMIŃSKA, A.; ENGUITA, F. J. & STĘPIEŃ, E. Ł. "Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent". *Vascular Pharmacology*, **101**, 21–28, 2018.

KANEHISA, M., GOTO, S., SATO, Y., FURUMICHI, M. & TANABE, M. "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets". *Nucleic Acids Research*, **40**, 109–114, 2012.

KINUGAWA, K.; MONNET, Y.; LU, L.; BEKAERT, A. J.; THÉRY, C.; MALLAT, Z.; HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. "MFGE8 does not orchestrate clearance of apoptotic

neurons in a mouse model of Parkinson's disease". *Neurobiology of Disease*, **51**, 192–201, 2013.

KLEIGER, G & MAYOR, T. "Perilous journey: a tour of the ubiquitin–proteasome system". *Trends in Cell Biology*, **24**(6), 352–359, 2014.

KONG, G.; LEE, H.; TRAN, Q.; KIM, C.; PARK, J.; KWON, S. H.; KIM, S-H. & PARK, J. "Current knowledge on the function of α -methyl acyl-CoA racemase in human diseases". *Frontiers in Molecular Biosciences*, **7**:153, 2020.

KREIMER, S.; BELOV, M. E.; DANIELSON, W. F.; LEVITSKY, L. I.; GORSHKOV, M. V.; KARGER, B. L. & IVANOV, A. Advanced Precursor Ion Selection Algorithms for Increased Depth of Bottom-Up Proteomic Profiling. *Journal of Proteome Research*, **15**, 3563–3573, 2016.

KULAK, N. A.; PICHLER, G.; PARON, I.; NAGARAJ, N & MANN, M. "Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells". *Nature Methods*, **11**, 319–324, 2014.

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. P. & 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*, **90**, 770-774, 2012.

LAI, Y. H. & WANG, Y. S. "Advances in high-resolution mass spectrometry techniques for analysis of high mass-to-charge ions". *Mass Spectrometry Reviews*, **42** (6), 2426-2445, 2022.

LANA, A. & ZOLLA, L. "Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective". *Journal of Proteomics*, **147**, 85-97, 2016.

LEÃO, A. G.; SOBRINHO, A. G. da S.; LOUREIRO, C. M. B. "Peso e rendimento dos não-componentes da carcaça de cordeiros terminados com dieta contendo níveis crescentes de farelo de amendoim". *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Jaboticabal – SP, 2007.

LEE, M.; KOVACS-NOLAN, J.; YANG, C.; ARCHBOLD, T.; FAN, M. Z. & MINE, Y. "Hen egg lysozyme attenuates inflammation and modulates local gene expression in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-Induced colitis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (6), 2233–2240, 2009.

LEIGHTON, B.; NICHOLAS, A. R. & POGSON, C. I. "The pathway of ketogenesis in rumen epithelium of the sheep". *Biochemical Journal*, **216**(3), 769–772, 1983.

LEÓN, I. R.; SCHWAMMLE, V.; JENSEN, O.N. & SPRENGER, R. R. "Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis". *Molecular & Cellular Proteomics*, **12**, 2992–3005, 2013.

LEŚNIEROWSKI, G. & YANG, T. "Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential". *Trends in Food Science & Technology*, **107**, 333-342, 2021.

LI, F.; LI, C.; CHEN, Y.; LIU, J.; ZHANG, C.; IRVING, B.; FITZSIMMONS, C.; PLASTOW, G.; GUAN, L. L. “Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle”. *Microbiome*, **7** (1), 2019.

LI, Y.; ZANG, Y.; ZHAO, X.; LIU, L.; QIU, Q.; OUYANG, K. & QU, M. “Dietary supplementation with creatine pyruvate alters rumen microbiota protein function in heat-stressed beef cattle”. *Frontiers in Microbiology*, **12**:715088, 2021.

LIEBLER, D. C. & HAM, A.-J. L. “Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics”. *Nature Methods*, **6**, 785, 2009.

LIN, Y.; WEI, L.; HU, B.; ZHANG, J.; WEI, J.; QIAN, Z. & ZOU, D. “RBM8A Promotes Glioblastoma Growth and Invasion Through the Notch/STAT3 Pathway”. *Frontiers in Oncology*, **11**:736941, 2021.

LIU, H.; ZHENG, F.; CAO, Q.; REN, B.; ZHU, L.; STRIKER, G. & VLASSARA, H. “Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme”. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **290** (5), 824–832, 2006.

LIU, J.; XU, T.; LIU, Y.; ZHU, W. & MAO, S. “A high-grain diet causes massive disruption of ruminal epithelial tight junctions in goats”. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **305** (3), 232–241, 2013.

LIU, W.; XIE, L.; HE, Y.-H.; WU, Z.-Y.; LIU, L.-X.; BAI, X.-F.; DENG, D.-X.; XU, X.-E.; LIAO, L.-D.; LIN, W.; HENG, J.-H.; XU, X.; PENG, L.; HUANG, Q.-F.; LI, C.-Y.; ZHANG, Z.-D.; WANG, W.; ZHANG, G.-R.; GAO, X.; WANG, S.-H.; LI, C.-Q.; XU, L.-Y.; LIU, W. & LI, E.-M. “Large-scale and high-resolution mass spectrometry-based proteomics profiling defines molecular subtypes of esophageal cancer for therapeutic targeting”. *Nature Communications*, **12**, 4961, 2021.

LIU, W.; ZHANG, L.; XUAN, K.; HU, C.; LIU, S.; LIAO, L.; LI, B.; JIN, F.; SHI, S. & JIN, Y. “Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells”. *Bone Research*, **6**(1), 2018.

LIUNI, P. & WILSON, D. J. “Understanding and optimizing electrospray ionization techniques for proteomic analysis”. *Expert Review Proteomics*, **8**, 197–209, 2011.

LOOR, J.J.; VAILATI-RIBONI, M.; MCCANN, J.C.; ZHOU, Z. & BIONAZ, M. “TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Nutrigenomics in livestock: Systems biology meets nutrition”. *Journal of Animal Science*, **93** (12), 5554–5574, 2015.

MAGAÇO, F. dos S. & DUARTE, E. R. “Interação microbiana e metanogênese em ruminantes – uma revisão”. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, **13**(1), 88-95, 2019.

MAKAROV, A. “Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis”. *Analytical Chemistry*, **72**, 1156–1162, 2000.

MALHEIROS, J. M.; CORREIA, B. S. B.; CERIBELI, C.; BRUSCADIN, J. J.; DINIZ, W. J. S.; BANERJEE, P... & REGITANO, L. C. de A. “Ruminal and feces metabolites associated with feed efficiency, water intake and methane emission in Nelore bulls”. *Scientific Reports*, **13**(18001), 2023.

MALMUTHUGE, N. "Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation". *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **8** (1), 2017.

MANZA, L. L.; STAMER, S. L.; HAM, A.-J. L.; CODREANU, S. G. & LIEBLER, D. C. "Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters". *Proteomics*, **5**, 1742–1745, 2005.

MARCO-RAMELL, A.; DE ALMEIDA, A. M.; CRISTOBAL, S.; RODRIGUES, P.; RONCADA, P. & BASSOLS, A. "Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context". *Molecular BioSystems*, **12**, 2024-2035, 2016.

MARINO, V. M.; SCHADT, I.; TERRA, S. L.; CACCAMO, M. & CAGGIA, C. "Lysozyme sources for disease prevention and health promotion – Donkey milk in alternative to hen egg-white lysozyme". *Future Foods*, **9**:100321, 2024.

MARKUS, M. A. & MORRIS, B. J. "RBM4: A multifunctional RNA-binding protein". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**, 740–743, 2009.

MCCOOL, E. N.; LUBECKYJ, R. A.; SHEN, X.; CHEN, D.; KOU, Q.; LIU, X. & SUN, L. Deep top-down proteomics using capillary zone electrophoresis - Tandem mass spectrometry: Identification of 5700 proteoforms from the escherichia coli proteome. *Analytical Chemistry*, **90**, 5529–5533, 2018.

MCDOUGALL, K., PLUMB, C., KING, W. A., & HAHNEL, A. "Inhibitor profiles of alkaline phosphatases in bovine preattachment embryos and adult tissues". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **50**(3), 415–422, 2002.

MCDOWELL, G. S.; GAUN, A. & STEEN, H. "iFASP: Combining isobaric mass tagging with filter-aided sample preparation". *Journal of Proteome Research*, **12**, 3809–3812, 2013.

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Quarto Inventário Nacional de Emissões e Remoções Antrópicas de Gases de Efeito Estufa – Relatório de Referência, 2020.

MEIER, F.; BRUNNER, A.-D.; KOCH, S.; KOCH, H.; LUBECK, M.; KRAUSE, M.; GOEDECKE, N.; DECKER, J.; KOSINSKI, T.; PARK, M. A.; BACHE, N.; HOERNING, O.; COX, J.; RATHER, O. & MANN, M. "Online parallel accumulation - Serial Fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer". *Molecular & Cellular Proteomics*, **17** (12), 2534–2545, 2018.

MEIER, F.; ESCARLATE, B.; GRASSL, N.; LUBECK, M.; PARQUE, M. A.; RAETHER, O. & MANN, M. "Parallel accumulation – Serial fragmentation (PASEF): multiplying sequencing speed and sensitivity by synchronized scans in a trapped ion mobility device". *Journal of Proteome Research*, **14**, 5378–5387, 2015.

MESQUITA, G.; SILVA, T.; GOMES, A. C.; OLIVEIRA, P. F.; ALVES, M. G.; FERNANDES, R.; ALMEIDA, A.; MOREIRA, A. C. & GOMES, M. S. "H-Ferritin is essential for macrophages' capacity to store or detoxify exogenously added iron". *Scientific Reports*, **10**:3061, 2020.

- MILLER, R. M. & SMITH, L. M. "Overview and considerations in bottom-up proteomics". *Analyst*, **148**, 475–486, 2023.
- MIRZAEI, H. & CARRASCO, M. *Modern proteomics - sample preparation, analysis and practical applications*. Springer, 2016.
- MOREIRA, A. C.; SILVA, T.; MESQUITA, G.; GOMES, A. C.; BENTO, C. M.; NEVES, J. V.; RODRIGUES, D. F.; RODRIGUES, P. N.; ALMEIDA, A. A.; SANTAMBROGIO, P. & GOMES, M. S. "H-Ferritin Produced by Myeloid Cells Is Released to the Circulation and Plays a Major Role in Liver Iron Distribution during Infection". *International Journal of Molecular Sciences*, **23** (1):269, 2021.
- MORZEL, M.; TERLOUW, C.; CHAMBON, C.; MICOL, D. & PICARD, B. "Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of —Blonde d'Aquitaine young bulls: a central role of HSP27 isoforms". *Meat Science*, **78**, 297-304, 2008.
- MOSS, A.; JOUANY, J-P. & NEWBOLD, J. "Methane production by ruminants: its contribution to global warming". *Annales de zootechnie*, **49** (3), 231-253, 2000.
- MULAKALA, B. K.; SMITH, K. M.; SNIDER, M. A.; AYERS, A.; HONAN, M. C. & GREENWOOD, S. L. "Influence of dietary carbohydrate profile on the dairy cow rumen meta-proteome". *Journal of Dairy Science*, **105** (10), 8485-8496, 2022.
- MURALI, M. & MACDONALD, J. A. "Smoothelins and the control of muscle contractility". *Advances in Pharmacology*, **81**, 39-78, 2018.
- MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M. & LENG, R. A. "Rates of production of methane in the rumen and large intestines of sheep". *British Journal of Nutrition*, **36**, 1-14, 1976.
- NAIR, M. N., LI, S., BEACH, C. M., RENTFROW, G., & SUMAN, S. P. "Changes in the sarcoplasmic proteome of beef muscles with differential color stability during postmortem aging". *Meat and Muscle Biology*, **2**, 1–17, 2018.
- NEGUSSIE, E.; DE HAAS, Y.; DEHARENG, F.; DEWHURST, R. J.; DIJKSTRA, J.; GENGLER, N.; MORGAVI, D. P.; SOYEURT, H.; GASTELEN, S. V. & BISCARINI, F. "Invited review: Large-scale indirect measurements for enteric methane emissions in dairy cattle: A review of proxies and their potential for use in management and breeding decisions". *Journal of Dairy Science*, **100** (4), 2433–2453, 2017.
- NIESSEN, P.; CLÉMENT, S.; FONTAO, L.; CHAPONNIER, C.; TEUNISSEN, B.; RENSEN, S.; RENSEN, S.; EYS, G van & GABBIANI, G. "Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin". *Experimental Cell Research*, **292**(1), 170–178, 2004.
- NOCEK, J. E. & TAMMINGA, S. "Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition". *Journal of Dairy Science*, **74**, 3598-3629, 1991.
- NOURI, K.; FENG, Y. & SCHIMMER, A. D. "Mitochondrial ClpP serine protease-biological function and emerging target for cancer therapy". *Cell Death & Disease*, **11**(841), 2020.

- OBA, M. & ALLEN, M. S. "Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations". *Journal of Dairy Science*, **86** (1), 184-194, 2003
- O'FARRELL, P. H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". *Journal of Biological Chemistry*, **250** (10), 4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, C.; FAORO, H.; ALVES, L. R. & GOLDENBERG, S. "RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics and Molecular Biology*, **40**(1), 22–30, 2017.
- PANDEY, A. & MANN, M. "Proteomics to study genes and genomes". *Nature*, **6788** (405), 837–846, 2000.
- PENNER, G. B.; STEELE, M. A.; ASCHENBACH, J. R. & MCBRIDE, B. W. "Ruminant nutrition symposium: molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets". *Journal of Animal Science*, **89**, 1108–1119, 2011.
- PENNER, G. B.; TANIGUCHI, M.; GUAN, L.L.; BEAUCHEMIN, K.A. & OBA, M. "Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue". *Journal of Dairy Science*, **92**, 2767–2781, 2009.
- PEREIRA, A. S. C.; BALDI, F.; SAINZ, R. D.; UTEMBERGUE, B. L.; CHIAIA, H. L. J.; MAGNABOSCO, C. U.; MANICARDI, R.; ARAUJO, F. R. C.; GUESDES, 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*, **55**, 1295-1302, 2015.
- PERRIN, L. & VIGNJEVIC, D. M. "The emerging roles of the cytoskeleton in intestinal epithelium homeostasis". *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **150–151**, 23-27, 2023.
- PFEFFER, E. & HRISTOV, A. N. "Interactions between cattle and the environment: a general introduction". *Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle*. Wallingford: CABI Publishing; 2007, 1–12.
- PICARD, B. & GAGAOUA, M. "Proteomic investigations of beef tenderness. Proteomics In food science: From farm 555 to fork". Academic Publisher, 177-197, 2017.
- PURSLOW, P. P.; WARNER, R. D.; CLARKE, F. M. & HUGHES, J. M. "Variations in meat colour due to factors other than myoglobin chemistry; a synthesis of recent findings (invited review)". *Meat Science*, **159**, 107941, 2020.
- R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. Available from: <https://www.R-project.org/>
- RABILLOUD, T. & LELONG, C. "Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial". *Journal of Proteomic*, **74** (10), 1829-1841, 2011.

RIPPLE, W. J.; SMITH, P.; HABERL, H.; MONTZKA, S. A.; MCALPINE, C. & BOUCHER, D. H. "Ruminants, climate change and climate policy". *Nature Climate Change*, **4**, 2–5, 2014.

RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B.; WU, D.; HU, Y.; LAW, C. W.; SHI, W. & SMYTH, G. K. "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies". *Nucleic Acids Research*, **43**(7), 47-47, 2015.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; DE VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; DA SILVA, M. C. M. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. "Eletroforese bidimensional e análise de proteomas". Comunicado técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, **136**, 1-12, 2005.

SAHOO, N. R.; KUMAR, P.; BHUSAN, B.; BHATTACHARYA, T. K.; DAYAL, S. & SAHOO, M. "Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance: A review". *Journal of Animal Science Advances*, **2** (4), 347-360, 2012.

SCALA, M.; NISHIKAWA, M.; ITO, H.; TABATA, H.; KHAN, T.; ACCOGLI, A... NAGATA, K. "Variant-specific changes in RAC3 function disrupt corticogenesis in neurodevelopmental phenotypes". *Brain*, **145** (9), 3308–3327, 2022.

SHEN, Z.; KUHLA, S.; ZITNAN, R.; SEYFERT, H.BM.; SCHNEIDER, F.; HAGEMEISTER, H.; CHUDY, A.; LOHRKE, B.; BLUM, J.BW.; HAMMON, H. M. & VOIGT, J. "Intraruminal infusion of n-butyric acid induces an increase of ruminal papillae size independent of IGF-1 system in castrated bulls". *Archives of Animal Nutrition*, **59**, 213–225, 2005.

SHEN, Z.; SEYFERT, H. M.; LOHRKE, B.; SCHNEIDER, F.; ZITNAN, R.; CHUDY, A.; KUHLA, S.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W.; MARTENS, H.; HAGEMEISTER, H. & VOIGT J. "An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats". *Journal of Nutrition*, **134**, 11–17, 2004.

SHEN, Z.; SEYFERT, H. M.; LOHRKE, B.; SCHNEIDER, F.; ZITNAN, R.; CHUDY, A.; KUHLA, S.; HAMMON, H. M.; BLUM, J. W.; MARTENS, H.; HAGEMEISTER, H. & VOIGT, J. "An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats". *Journal of Nutrition*, **134**, 11–17, 2004.

SHIM, J.; SEO, H.; CHOI, Y.; YOO, I.; LEE, C.-K.; HYUN, S.-H.; LEE, E. & KA, H. Analysis of legumain and cystatin 6 expression at the maternal-fetal interface in pigs. *Molecular Reproduction and Development*, **80** (7), 570–580, 2013.

SHUKEN, S. R. & MCNERNEY, M. W. "Costs and benefits of popular P-Value correction methods in three models of quantitative omic experiments". *Analytical Chemistry*, **95**, 2732–2740, 2023.

SHUKEN, S. R. "An introduction to mass spectrometry-based proteomics". *Journal of Proteome Research*, **22**, 2151–2171, 2023.

SIELAFF, M.; KUHAREV, J.; BOHN, T.; HAHLBROCK, J.; BOPP, T.; TENZER, S. & DISTLER, U. "Evaluation of FASP, SoP3, and iST protocols for proteomic sample

preparation in the low microgram range". *Journal of Proteome Research*, **16**, 4060–4072, 2017.

SJÖBLOM, B.; SALMAZO, A. & DJINOVIĆ-CARUGO, K. "α-Actinin structure and regulation". *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**(17), 2688-2701, 2008.

SMAIL-TABBONE, M. & RANCE, B. Literature on Bioinformatics and Translational Informatics. *Yearbook of Medical Informatics*, **29**, 188-192, 2020.

SMIRNOVA, K. S.; MAIERA, T. V.; WALKERA, A.; HEINZMANN, S. S.; FORCISI, S.; MARTINEZ, I., WALTERB, J. & SCHMITT-KOPPLINA, P. "Challenges of metabolomics in human gut microbiota research". *International Journal of Medical Microbiology*, **306**, 266-279, 2016.

SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P. & HUYNEN, M. A. "STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene". *Nucleic Acids Research*, **28**, 3442–3444, 2000.

SNELLING, T. J. & WALLACE, R. J. "The rumen microbial metaproteome as revealed by SDS-PAGE". *BMC Microbiology*, **17** (9), 2017.

SONG, J.; CHOI, H.; JEONG, J. Y.; LEE, S.; LEE, H. J.; BAEK, Y.; JI, S. Y. & KIM, M. "Effects of sampling techniques and sites on rumen microbiome and fermentation parameters in hanwoo steers". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28** (10), 1700-1705, 2018.

STEELE, M.A.; CROOM, J.; KAHLER, M.; ALZAHA, O.; HOOK, S.E.; PLAIZIER, K. & MCBRIDE B.W. "Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis". *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **300**, 1515–1523, 2011.

STEPANOVA, E.; GYGI, S. P. & PAULO, J. A. "Filter-based protein digestion (FPD): a detergent-free and scaffold-based strategy for TMT workflows". *Journal of Proteome Research*, **17**, 1227–1234, 2018.

SU, Y-A.; CHIU, H-Y.; CHANG, Y-C.; SUNG, C-J.; CHEN, C-W.; TEI, R... & LIU, Y-W. "NME3 binds to phosphatidic acid and mediates PLD6-induced mitochondrial tethering". *Journal of Cell Biology*, **222**(10): e202301091, 2023.

SUN, D.; MAO, S.; ZHU, W. & LIU, J. "Proteomic identification of ruminal epithelial protein expression profiles in response to starter feed supplementation in pre-weaned lambs". *Animal Nutrition*, **7** (4), 1271-1282, 2021.

SUN, D.; MAO, S.; ZHU, W. & LIU, J. "Proteomic identification of ruminal epithelial protein expression profiles in response to starter feed supplementation in pre-weaned lambs". *Animal Nutrition*, **7**, 1271-1282, 2021.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J. & MERING, C. von. "STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life". *Nucleic Acids Research*, **43**, 447–52, 2015.

TALUKDER, M. A. S.; BALBOULA, A. Z.; SHIROZU, T.; KIM, S. W.; KUNII, H.; SUZUKI, T.; ITO, T.; KIMURA, K. & TAKAHASHI, M. "Activation of lysosomal cathepsins in pregnant bovine leukocytes". *Reproduction*, **155** (6), 515–528, 2018.

TANIGUCHI, M.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; OBA, M & GUAN, L. L. "Comparative analysis of gene expression profiles in ruminal tissue from Holstein dairy cows fed high or low concentrate diets". *Comparative Biochemistry and Physiology*, **5**, 274–279, 2010.

TANIGUCHI, M.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; OBA, M.; GUAN, L. L. "Comparative analysis of gene expression profiles in ruminal tissue from Holstein dairy cows fed high or low concentrate diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **5**, 274–279, 2010.

THURMAN, T. J.; WASHAM, C. L.; ALKAM, D.; BIRD, J. T.; GIES, A.; DHUSIA, K.; ROBESON, M. S. & BYRUM, S. D. "proteoDA: a package for quantitative proteomics". *Journal of Open Source Software*, **8**(85), 5184, 2023.

TIGRE, J. S. "Uso de polpa cítrica peletizada na alimentação de ruminantes, revisão. *Pubvet*, **6** (24), 2012.

TONISSI, R. H.; GOES, B.; MANCIO, A. B.; VALADARES FILHO, S. de C. & LANA, R. de P. "Degradação ruminal da matéria seca e proteína bruta, de alimentos concentrados utilizados como suplementos para novilhos". *Ciência e Agrotecnologia*, **28** (1), 167-173, 2004

TURK, B.; TURK, D. & TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477** (1-2), 98-111, 2000.

TYANOVA, S. & COX, J. "PERSEUS: A bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. *Cancer systems biology*, 133–148, 2018.

UPPAL, S. K.; WOLF, K.; KHAHRA, S. S. & MARTENS, H. "Modulation of Na⁺ transport across isolated rumen epithelium by short-chain fatty acids in hay- and concentrate-fed sheep". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **87**, 380–388, 2003.

WANG, S.; SONG, J.; TAN, M.; ALBERS, K. M. & JIA, J. "Mitochondrial fission proteins in peripheral blood lymphocytes are potential biomarkers for Alzheimer's disease". *European Journal of Neurology*, **19**, 1015-1022, 2012.

WANG, W-Q.; JENSEN, O. N; MØLLER, I. M; KIM H. HEBELSTRUP, K. H. & ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. "Evaluation of sample preparation methods for mass spectrometry-based proteomic analysis of barley leaves". *Plant Methods*, **14** (72), 2018.

WANG, X. "Bioinformatics of Human Proteomics". Springer Science + Business Media B.V.: Dordrecht, The Netherlands, 2013.

WANG, Y., CHEN, D., QIAN, H., TSAI, Y. S., SHAO, S., LIU, Q.; DOMINGUEZ, D. & WANG, Z. "The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression". *Cancer Cell*, **26**(3), 374–389, 2014.

- WANG, Y.; MAJAK, W. & MCALLISTER, T. A. "Frothy bloat in ruminants: Cause, occurrence, and mitigation strategies". *Animal Feed Science and Technology*, **172**, 103–114, 2012.
- WESTON, L. A.; BAUER, K. M. & HUMMON, A. B. "Comparison of bottom-up proteomic approaches for LC–MS analysis of complex proteomes". *Analytical Methods*, **5**, 4615–4621, 2013.
- WILKINS, M. R., PASQUALI, C., APPEL, R. D., OU, K., GOLAZ, O., SANCHEZ, J.-C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, E.; WILLIAMS, K. L. & HOCHSTRASSER, D. F. "From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis". *Nature Biotechnology*, **14** (1), 61–65, 1996.
- WIRTH, C.; BRANDT, U.; HUNTE, C. & ZICKERMANN, V. "Structure and function of mitochondrial complex I". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1857**(7), 902–914, 2016.
- WIŚNIEWSKI, J. R. "Filter Aided Sample Preparation – A Tutorial". *Analytica Chimica Acta*, **1090**, 23-30, 2019.
- WISNIEWSKI, J. R.; ZIELINSKA, D. F. & MANN, M. "Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method". *Analytical Biochemistry*, **410**, 307–309, 2011.
- WISNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N. & MANN, M. "Universal sample preparation method for proteome analysis". *Nature Methods*, **6**, 359–362, 2009.
- WOODS, A. G.; SOKOLOWSKA, I.; NGOUNOU WETIE, A. G.; CHANNAVEERAPPA, D.; DUPREE, E. J.; JAYATHIRTA, M.; ASLEBAGH, R.; WORMWOOD, K. L. & DARIE, C. C. "Mass spectrometry for proteomics-based investigation. In advancements of mass spectrometry in biomedical research". Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 1–26, 2019.
- XU, J.; LIN, Y.; YANG, M. & ZHANG, L. "Statistics and pitfalls of trend analysis in cancer research: a review focused on statistical packages". *Journal of Cancer*, **11**, 2957-2961, 2020.
- YANG, Y.; WANG, J.; YUAN, T.; BU, D.; YANG, J. & SUN, P. "Proteome profile of bovine ruminal epithelial tissue based on GeLC–MS/MS". *Biotechnology Letters*, **35** (11), 1831–1838, 2013.
- YOUNG, P. & GAUTEL, M. "The interaction of titin and α -actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism". *The EMBO Journal*, **9**(23), 6331–6340, 2000.
- ZAMBETTI, N. A.; BINDELS, E. M. J.; STRIEN, P. M. H. V.; VALKHOF, M. G.; ADISTY, M. N.; HOOGENBOEZEM, R. M.; SANDERS, M. A.; ROMMENS, J. M.; TOUW, I. P. & RAAIJMAKERS, M. H. G. P. "Deficiency of the ribosome biogenesis gene *Sbds* in hematopoietic stem and progenitor cells causes neutropenia in mice by attenuating lineage progression in myelocytes". *Haematologica*, **100**(10), 1285–1293, 2015.
- ZENG, X.; CHEN, Y.; LI, W. & LIU, S. "Application of fenugreek in ruminant feed: implications for methane emissions and productivity". *PeerJ*, **12**: e16842, 2024.

ZHAN, K.; GONG, X.; CHEN, Y.; JIANG, M.; YANG, T. & ZHAO, G. "Short-chain fatty acids regulate the immune responses via G protein-coupled receptor 41 in bovine rumen epithelial cells". *Frontiers in Immunology*, **10**:2042, 2019.

ZHANG, S.; YU, Q.; LI, Z.; ZHAO, Y. & SUN, Y. "Protein neddylation and its role in health and diseases". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **9**(85), 2024.

ZHANG, Z.; WU, S; STENOIEN, D. L. & PASA-TOLIC, L. "High-throughput proteomics". *Annual Review of Analytical Chemistry*, **7**, 427-454, 2014.

ZHAO, T.; LI, Z.; GUO, Z.; WANG, A.; LIU, Z.; ZHAO, Q.; LI, Y.; MCKENZIE, E. A. & DIAO, A. "Functional recombinant human Legumain protein expression in *Pichia pastoris* to enable screening for Legumain small molecule inhibitors". *Protein Expression and Purification*, **150**, 12–16, 2018.

ZHENG, K.; GUO, L.; ULLAH, S.; CAO, Y.; HUANG, X.; SHAN, H.; JIANG, J.; WU J. & JIANG, Y. "Proteome changes of sheep rumen epithelium during postnatal development". *Frontiers in Genetics*, **13**:1031707, 2022.

ZOU, D., MCSWEENEY, C., SEBASTIAN, A., REYNOLDS, D. J., DONG, F., ZHOU, Y.; DENG, D.; WANG, Y.; LIU, L.; ZHU, J.; ZOU, J.; SHI, Y.; ALBERT, I. & MAO, Y. "A critical role of RBM8a in proliferation and differentiation of embryonic neural progenitors". *Neural Development*, **10**:18, 2015.

ZOUGMAN, A.; SELBY, P. J. & BANKS, R. E. "Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis". *Proteomics*, **14**, 1006–1000, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista das proteínas exclusivas do grupo de animais alimentados com dieta convencional.

Identificação Uniprot	Nome da proteína	Nome do gene
A0AAA9T6K2	Enzima de conjugação de ubiquitina E2 G2	UBE2G2
A0AAA9TZX0	GTPase OPA1 semelhante à dinamina, mitocondrial	OPA1
A0A3Q1LQC4	Carboxipeptidase	SCPEP1
A0A3Q1M3W5	Monooxigenase COQ6 da biossíntese de ubiquinona, mitocondrial	COQ6
Q27996	Lisozima C, isozima traqueal	
A0A3Q1MSC4	NADPH--citocromo P450 redutase	POR
Q3T0I5	Proteína de fissão mitocondrial 1	FIS1
F6QZC1	Coativador transcricional p15 da RNA polimerase II ativada	SUB1
A0A3Q1N5T2	Subunidade J do fator de iniciação da tradução eucariótica 3	EIF3J
A0A3Q1NBQ9	Tetraspanina	CD82
Q56JX3	Proteína de subunidade ribossômica grande eL31	RPL31
Q2TBT3	Proteína 2 contendo domínio de hidratase de enoil-CoA, mitocondrial	ECHDC2
A0AAA9RYP4	Dolicil-difosfooligossacarídeo--proteína glicosiltransferase subunidade MAGT1	MAGT1
A0AAA9S218	Fator de processamento pré-mRNA 8	PRPF8
A0AAA9SDL8	Homólogo da esterase 1 hidrolisante de acetato de isoamila	IAH1
A0AAA9ST36	Enoil-CoA delta isomerase 2	ECI2
Q95KV7	Subunidade 13 do subcomplexo alfa da NADH desidrogenase [ubiquinona] 1	NDUFA13
A0AAA9TEY6	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintase	ALDH18A1
A0AAA9TU74	Domínio PYD e CARD contendo	PYCARD
O46415	Cadeia leve de ferritina	FTL

A0AAF6Z6H0	Dolicil-difosfooligossacarídeo--proteína glicosiltransferase subunidade DAD1	PAI1
P04896	Isoformas alfa da subunidade G(s) da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina curta	GNAS
A2VDZ9	Proteína B associada à membrana da vesícula	VAPB
A4IFG0	Glutathiona S-transferase	GSTM1
E1BPB3	Fator de iniciação da tradução eIF2B subunidade epsilon	EIF2B5
F1MCN8	Alfa-metilacil-CoA racemase	AMACR
Q0PHW6	17-beta hidroxisteroide desidrogenase 2	HSD17B2
Q2KHU4	Subunidade proteolítica da protease Clp dependente de ATP, mitocondrial	CLPP
Q3SWZ6	Proteína de maturação do ribossoma SBDS	SBDS
Q3T0U5	Proteína 2A do corpo multivesicular carregada	CHMP2A

APÊNDICE B – Lista das proteínas exclusivas do grupo de animais alimentados com dieta composta por subprodutos.

Identificação Uniprot	Nome da proteína	Nome do gene
Q1JPJ8	Oligopeptidase de Thimet	THOP1
A0AAA9T031	Legumaina	LGMN
A0A3Q1LS09	Tráfego de ER para regulador de Golgi	TFG
A0A3Q1LPT1	Subunidade alfa da proteína farnesiltransferase/geranilgeraniltransferase tipo 1	FNTA
A0A3Q1N8C9	Subunidade alfa do complexo AP-2	AP2A1
A0A3Q1LW91	Xantina desidrogenase/oxidase	XDH
A0A3Q1MG83	FMR1 homólogo autossômico 1	FXR1
A0A3Q1M5A2	Sorcin	ISR
A0A3Q1M903	Mieloperoxidase	MPO
A0A3Q1ME09	Fator de reticulação de actina de microtúbulos 1	MACF1
A0AAA9SGZ6	Enzima de conjugação de ubiquitina E2 L3	UBE2L3
A0A3Q1MS19	Subunidade beta 3 da laminina	LAMB3
A0AAA9T3L8	Colágeno tipo XVIII cadeia alfa 1	COL18A1
Q5E9G3	Subunidade 2 do complexo ativador do proteassoma	PSME2
A0A3Q1NFZ7	Subunidade gama 2 da laminina	LAMC2
A0A3Q1NI32	Proteína 3 associada ao receptor do hormônio tireoidiano	THRAP3
P30404	Peptidil-prolil cis-trans isomerase F, mitocondrial	PPIF
A0AAF7A244	Cadeia leve de clatrina	CLTA
A0AAA9T6B8	Ribonucleoproteína nuclear pequena Sm D1	SNRPD1

A0AAA9RY40	Hidrolase carboxil-terminal da ubiquitina	USP14
A0AAA9S1S4	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea R	HNRNPR
A0AAA9S251	Actina 6A	ACTL6A
A0AAA9T936	Grande proteína rica em prolina BAG6	SACO6
A0AAA9SBL0	Proteína de ligação do membro 3 da família ABI	ABI3BP
A0AAA9SW28	Exportina-2	CSE1L
Q2NKU4	Proteína 1 estável ao calor regulada por cálcio	CARHSP1
E1BEK9	Helicase de RNA UPF1 e ATPase	UPF1
A0AAA9T6I1	Homólogo do cromossomo 29 C11orf54	C29H11orf54
A0AAA9THS6	Proteína S100	S100A2
A0AAF6YJ25	Inibidor de peptidase 16	PI16
P61282	Proteína semelhante à ubiquitina NEDD8	NEDD8
A0AAF6YL61	Fator de splicing 3a subunidade 1	SF3A1
A0AAF6ZED5	Proteína contendo domínio C1q	LOC511240
P33046	Catelicidina-4	CATHL4
A0AAF7ASI3	Catecol O-metiltransferase	COMT
E1BAU5	Proteína contendo domínio WAP	LOC512548
E1BAZ4	Isomerase hidroxipiruvato putativa	HYI
F1MC31	Fator de splicing 3b subunidade 2	SF3B2
Q5EA36	Proteína de ligação ao RNA 14	RBM14
F1MJK3	Proteína da zona de gravidez	LOC506828

F1MX87	Cadeia alfa do complemento C8	C8A
F6Q2U9	Alfa-galactosidase	NAGA
P07507	Proteína matriz Gla	MGP
P40673	Proteína B2 do grupo de alta mobilidade	HMGB2
Q17QP9	Proteassoma subunidade 26S, não ATPase, 14	PSMD14
Q2TBQ3	Guanidinoacetato N-metiltransferase	GAMT
Q3MHR3	Cadeia leve de dineína 2, citoplasmática	DYNLL2
Q3SZA5	Espermina sintase	SMS
Q3T0E7	Subunidade catalítica PP1-alfa da proteína fosfatase serina/treonina	PPP1CA
Q5EAC9	Proteína de choque térmico beta-8	HSPB8

APÊNDICE C – Termos de ontologia genética enriquecidos (FDR < 0,1) para proteínas identificadas exclusivamente no tecido ruminal de bovinos alimentados com dieta Conv. e Subp., analisados pelo software DAVID.

Categorias funcionais	Termos GO	Proteínas	p-valor
<i>Proteínas exclusivas do grupo convencional</i>			
Componente celular	Mitocôndria	PYCARD, NDUFA13, AMACR, ECI2, ECHDC2, ALDH18A1, COQ6	0,001
<i>Proteínas exclusivas do grupo subprodutos</i>			
Componente celular	Tipo complexo spliceossomal	SF3B2, SF3A1, SNRPD1, LOC107131841	<0,001
Componente celular	Etapa catalítica 2 spliceossoma	SF3B2, SF3A1, SNRPD1, LOC107131841, HNRNPR	<0,001
Componente celular	U2 snRNP	SF3B2, SF3A1, SNRPD1, LOC107131841	<0,001
Componente celular	Spliceossomo pré-catalítico do tipo U2	SF3B2, SF3A1, SNRPD1, LOC107131841	<0,001
Componente celular	Citoplasma	GAMT, UPF1, MACF1, USP14, RBM14, S100A2, HSPB8, CSE1L, HMGB2, NAGA, NEDD8, HNRNPR, SRI, DYNLL2, PPP1CA, UBE2L3,	<0,001

		CARHSP1, TFG, FNTA, PPIF, PSME2, THOP1	
Componente celular	Região extracelular	BAG6, LOC511240, CATHL4, MGP, LOC512548, LAMC2, PI16, C8A, LOC506828, LGMN	0,001
Componente celular	Complexo spliceossomal tipo U12	SF3B2, SNRPD1, LOC107131841	0,002
Componente celular	Partícula nuclear	SF3B2, SF3A1, RBM14, THRAP3, PPP1CA	0,003
Componente celular	Spliceossoma pré-catalítico	SF3B2, SNRPD1, LOC107131841	0,005
Função molecular	Atividade ativadora da endopeptidase	PSMD14, PSME2, LGMN	<0,001
Processo biológico	Regulação do processo catabólico da proteína proteassomal	USP14, PSMD14, PSME2	<0,001
Processo biológico	Splicing de mRNA, via spliceossoma	SF3B2, SF3A1, RBM14, SNRPD1, LOC107131841	<0,001
Processo biológico	Resposta imune inata	USP14, RBM14, CATHL4, HMGB2, LOC512548, C8A	

APÊNDICE D – Termos de ontologia genética significativamente enriquecidos identificados a partir das proteínas diferencialmente abundantes e exclusivas do tecido ruminal de bovinos nos grupos de baixa e alta ERM, conforme análise realizada pelo software DAVID.

Categorias funcionais	Termos GO	Proteínas	p-valor
Proteínas diferencialmente abundantes			
Componente celular	Citoesqueleto	PFN2, RAC3, CHP1, ENAH, KRT36, TMOD1	< 0,001
Componente celular	Projeção de células	RAC3, ENAH	< 0,001
Componente celular	Actina filamentosa	RAC3, SMTN	0,001
Componente celular	Sistema de endomembrana	RAC3, RAB5C, CHP1	0,002
Processo biológico	Organização do citoesqueleto de actina	CAPZA2, PFN2, RAC3, SMTN	< 0,001
Proteínas exclusivas do grupo L			
Componente celular	Tipo: spliceossomo catalítico passo 1	RBM8A, LIX1L, PRPF19	< 0,001
Função molecular	Ligação de íons de zinco	CA3, PTER, CA2, MPI, RGN, RBM4B, SAMHD1, SQSTM1	< 0,001
Função molecular	Ligação de mRNA	RBM8A, LIX1L, HDLBP, RBM4B, MRPL12	0,001

Proteínas exclusivas do grupo H			
Componente celular	Citoesqueleto de actina cortical	DMD, SPTBN2	0,002
Componente celular	Junção celular	DMD, SPTBN2	0,004
Componente celular	Disco Z	DMD, FHL2	0,006
Componente celular	Complexo inibidor de serina protease	PRSS1, LOC615026	0,006
Componente celular	Projeção de células	DMD, SPTBN2	0,01
Função molecular	Atividade de lisozima	LOC785803, LOC781146, LOC112446693, LOC617219	<0,001
Processo biológico	Processo metabólico	LOC785803, LOC781146, LOC112446693, LOC617219	<0,001
Processo biológico	Morte de células de outro organismo	LOC785803, LOC781146, LOC112446693, LOC617219	<0,001
Processo biológico	Resposta de defesa a bactérias Gram-negativas	LOC785803, LOC781146, LOC112446693, LOC617219	<0,001
Processo biológico	Resposta de defesa a bactérias Gram-positivas	LOC785803, LOC781146, LOC112446693, LOC617219	<0,001
Processo biológico	Regulação do processo do sistema muscular	DMD	0,003
Processo biológico	Regulamento da herança de Golgi	MAP2K1, LOC101905399	0,008
