

## CUANTIFICACIÓN DE DECORINA POR PCR EN TIEMPO REAL E IMMUNOLOCALIZACIÓN EN MÚSCULO DE VACAS HOLSTEIN <sup>a</sup>

### QUANTIFICATION OF DECORIN BY PCR IN REAL TIME AND IMMUNOLOCALIZATION IN MUSCLE OF HOLSTEIN COWS

Mendoza-Carrillo, J.M.<sup>1\*</sup>; Sanzón-Gómez, D.<sup>1</sup>; González-Rodríguez, E.<sup>2</sup> y García-Munguía, C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Ex Hda. El Copal Km. 9.0 Carr. Irapuato Silao, C.P. 36824. Irapuato, Gto.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas. Campus UACH II, 31109. Chihuahua, Chih.

\* E-mail: [jm.mendoza@ugto.mx](mailto:jm.mendoza@ugto.mx)

Fecha de envío: 05, abril, 2022

Fecha de publicación: 16, diciembre, 2022

#### Resumen:

La decorina (DCN) es un proteoglicano presente en los músculos de bovinos y su cantidad puede afectar la formación de fibras de colágeno e influir en la calidad de la carne. Se carece de información sobre la cantidad de DCN presente en músculos de animales adultos con diferente condición corporal (CC) y su efecto con la calidad de la carne. El objetivo de este experimento fue relacionar la expresión del gen que codifica para DNC por medio de PCR en tiempo real y por localización inmunohistoquímica en tejido de bovinos Holstein con diferente CC y su posible efecto en la textura de la carne. Se utilizaron 20 vacas de desecho Holstein de diferentes orígenes, sistemas de producción y con cinco CC (CC-1, emaciado, CC-2, delgado, CC-3, en peso, CC-4, gordo y CC-5, obeso) de un rastro TIF. Se tomaron muestras de tejido del músculo *Longissimus dorsi* (LD) de entre la 7<sup>a</sup> y 12<sup>a</sup> costilla de cada canal, las cuales se procesaron para la expresión del gen de DCN por PCR-RT y por localización inmunohistoquímica. Los datos del ARNm se ajustaron con un procedimiento GLM. La CC-1 y CC-2 presentaron valores de expresión bajos de ARNm, por el contrario, la CC-3, CC-4 y CC-5 presentaron valores altos. Lo anterior coincidió con lo observado en las micrografías donde se presenta una mayor intensidad de la inmunofluorescencia en las CC mayores (3 a 5), donde CC-5 presentó una franja de fluorescencia más gruesa, reflejando una mayor expresión de DCN. Los cambios en la expresión de la DNC aumentan cuando mejora la condición corporal de las vacas Holstein de manera lineal positiva.

**Palabras clave:** Proteoglicanos, condición corporal, inmunohistoquímica, vacas de desecho, carne.

<sup>a</sup> Parte del trabajo de Disertación Doctoral y trabajo de investigación con apoyo PRODEP.

### **Abstract:**

Decorin (DCN) is a proteoglycan present in bovine muscles and its quantity can affect the formation of collagen fibers and influence meat quality. Information on the amount of DCN present in muscles of adult animals with different body condition (CC) and its effect on meat quality is lacking. The objective of this experiment was to relate the expression of the gene that codes for DNC by means of real-time PCR (PCR-RT), and by immunohistochemical localization in Holstein bovine tissue with different CC and its possible effect on meat texture. The mRNA data were adjusted using a GLM. 20 Holstein cull cows from different origins, production systems and with five CC (CC-1, emaciated, CC-2, lean, CC-3, in weight, CC-4, fat and CC-5, obese) were used of a TIF trace. *Longissimus dorsi* (LD) muscle tissue samples were taken from between the 7th and 12th rib of each carcass, which were processed for DCN gene expression by RT-PCR and by immunohistochemical localization. CC-1 and CC-2 presented low mRNA expression values, while CC-3, CC-4 and CC-5 presented high values. The foregoing coincided with what was observed in the micrographs where a greater intensity of immunofluorescence is presented in the larger CCs (3 to 5), with CC-5 being the one that presented a thicker fluorescence fringe, reflecting a greater expression of DCN. Changes in DNC expression increase when Holstein cows' body condition improves in a positive linear manner.

**Keywords:** Proteoglycans, body condition score, immunohistochemistry, cull cows, beef.

## **INTRODUCCIÓN**

Los estudios e investigaciones en el músculo esquelético de los animales se han enfocado en la evaluación de las estructuras mínimas de contracción como la actina y la miosina. Sin embargo, el desarrollo del músculo está organizado y regulado por procesos que se realizan entre el músculo y las fibras musculares conformada por el tejido conectivo intramuscular (TCIM) que rodean y envuelven al músculo (Nishimura et al., 2002; Nishimura, 2010).

Uno de los componentes más importantes del TCIM es la matriz extracelular (MEC). Esta última forma parte de las tres capas de tejido conectivo (epimio, perimio y endomio) y está compuesta por fibras de colágeno, elastina, proteoglicanos (PG) y glicoproteínas. La MEC es una estructura dinámica que a través de la ruta de señalización célula-matriz regula el comportamiento de las células a través de la interacción de las moléculas la componen con múltiples factores de crecimiento (Velleman, 1999; Wang et al., 2019), los cuales afectan la respuesta del músculo esquelético a la fuerza de tensión, los enlaces cruzados y la organización fibrilar que determinan la elasticidad del músculo (Velleman, 2002; Hao et al., 2022).

El colágeno, componente importante de la MEC tiene una distribución específica y propiedades funcionales únicas en el tejido, formado por los tipos I y III (Bailey y Light, 1989; Kjaer, 2004; González y Bellón, 2013). Los PG, macromoléculas compuestas por una proteína central unida por medio de enlaces covalentes a múltiples cadenas de glicosoaminoglicanos (GAG) (Velleman, 2000). Dentro de los PG se encuentra la decorina (DCN) que pertenece a los pequeños PG, ricos en leucina de bajo peso molecular (45kDa), que modula la actividad de los factores de crecimiento tipo beta (TGF- $\beta$ ) y otros factores de crecimiento que influyen en los procesos de proliferación y diferenciación en una amplia gama de reacciones fisiológicas y patológicas (Brandan et al., 2006). La DCN interfiere en la diferenciación y migración celular de la formación de tejido conectivo en el músculo esquelético y la expresión de RNAm es mayor en tejido muscular fetal que en neonatos y adultos (Yoshida et al., 1998; Casar et al., 2004).

La DNC contribuye a la regulación de la fibrillogénesis del colágeno (Danielson et al., 1997), uniendo y estabilizando las fibrillas de colágeno (Scott y Thomlinson, 1998), también influye en la transmisión de la fuerza desde la miofibrilla hacia el tendón del músculo esquelético (Purslow y Duance, 1990) e interaccionan con el colágeno fibrilar tipo I, II y III (Vogel y Trotter, 1987; Scott, 1988; Weber et al., 1996; Loscalzo et al., 2013).

También, la DNC es importante en la morfogénesis del TCIM durante el desarrollo fetal de los bovinos (Nishimura et al., 2002), influye en la inactividad y el crecimiento de las células musculares por la modulación de los factores de crecimiento (Zhu et al., 2007; Kishioka et al., 2008; Nishimura et al., 2008). Así mismo, ésta morfogénesis del tejido conectivo intramuscular que soporta las fibras musculares, importante en la ternura de la carne (Scott, 1992; McCormick, 1999). Por tanto, el nivel de DCN podría afectar la formación de fibras de colágeno e influir negativamente en la calidad de la carne (Albrecht et al., 2011).

Por otra parte, la condición corporal (CC) estima las reservas de energía en los animales proporcionándoles una calificación en escala de 5 puntos (1= emaciada, 5= obesa) al ganado lechero (Wildman et al., 1982; Zin et al, 2020), el nivel de CC en los animales es un factor que afecta en la calidad de la carne. Durante la restricción nutricional, el recambio proteico, la remodelación del tejido conectivo, y la atrofia del músculo tienen lugar en el músculo esquelético (Byrne et al., 2005).

El balance energético positivo prolongado de energía induce cambios en el tejido adiposo que coinciden con los procesos de remodelación, degradación y reconstrucción de la MEC existente (Cao, 2007; Hausman y Richardson, 2004; Mlynek et al., 2022). A nivel molecular se ha observado en humanos y en ratones obesos, que la expansión del tejido adiposo requiere el desarrollo de una alta vascularización, proceso que coincide con una elevada expansión de DCN, lo que sugiere que la regulación de la expresión de esta proteína se encuentra estrechamente relacionada a este evento y es importante para facilitar la formación de nuevas estructuras de la MEC (Bolton et al., 2008).

Diversos trabajos realizados con las técnicas de inmunohistoquímica en perimio y endomisio de bovinos (Eggen et al., 1994) demuestran que la DCN es el mayor PG presente en músculos bovinos (Krusius y Ruoslahti, 1986) Sin embargo, no se han reportado trabajos dirigidos a evaluar la cantidad de DCN presente en músculo de animales adultos, en relación con los diferentes grados de CC y su efecto con la calidad de la carne. La hipótesis para este trabajo establece que la calificación de la CC de los animales afecta los niveles de expresión de la DNC ante los cambios en el balance energético positivo y negativo en los animales. El objetivo de este experimento fue relacionar la expresión del gen que codifica para DNC por medio de PCR en tiempo real (PCR-RT), y por localización inmunohistoquímica en tejido de bovinos Holstein con diferente CC y su posible efecto en la textura de la carne.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Calificación de Condición Corporal y Preparación de Muestras**

Se utilizaron 20 vacas de desecho Holstein de diferentes orígenes y sistemas de producción las cuales fueron procesadas en el rastro TIF 366 bajo la NOM-09-ZOO-1994 en la ciudad de Chihuahua, México que fueron calificadas según el método de Wildman et al. (1982) en cinco condiciones corporales (CC) (CC-1, emaciado, CC-2, delgado, CC-3, en peso, CC-4, gordo y CC-5, obeso), de acuerdo con su dentición mostraron un rango de edad de 24 a 36 meses. De los 5 a 10 min *post* matanza se tomaron muestras de tejido del músculo *Longissimus dorsi* (LD) de entre la 7<sup>a</sup> y 12<sup>a</sup> costilla de cada canal.

## Cuantificación de la Expresión de la Decorina por PCR en Tiempo Real

**Toma de las muestras.** Se obtuvieron 20 muestras del músculo LD recolectadas de las canales y fueron agrupadas en cuatro repeticiones (a, b, c y d), en cada repetición se encontraron representadas las cinco CC. Cada muestra se cortó en cuatro fracciones de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> y cada una se colocó en un criotubo con una solución ARN later® (Tissue Collection: ARN Stabilization Solution de la empresa AB Applied Biosytem), con la finalidad de conservar la integridad de las muestras. Estas se mantuvieron en refrigeración entre 2 y 4°C y fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

**ARN total.** La extracción de ARN se llevó a cabo por el método de Trizol reagent (Invitrogen Carlsbad, CA) utilizando de 50 a 100 mg de tejido músculo esquelético y fue homogenizada en un mortero pre enfriado con nitrógeno líquido, el homogenizado fue colocado en un tubo eppendorf y fue mezclado en un vortex con 1 mL de Trizol, incubándose por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µL de cloroformo al tubo y se agitó por 15 s con vortex, para después realizar una incubación por 15 min a 4°C. Seguido de la incubación, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 15 min. La fase acuosa superior que contiene el ARN total, fue transferida a tubos eppendorf nuevos con 500 µL de isopropanol, se mezcló suavemente y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Cada muestra fue centrifugada a 13,000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla generada se lavó con 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC (Dietil policarbonato), se mezcló suavemente para extraer el exceso de líquido con papel para secar la muestra, para posteriormente centrifugarse a 8,500 rpm a 4°C por 5 min. El alcohol fue descartado y con cuidado el exceso de alcohol fue evaporado aireando la muestra. La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua DEPC (0.05 – 0.1%) y se almacenaron a -80°C. El ARN se cuantificó con un espectrofotómetro a 260 nm, utilizando agua tridestilada como blanco. Se realizaron lecturas por triplicado de las muestras, para posteriormente calcular su pureza con la siguiente fórmula:

Valor de la observancia 40X (Absorbancia 260 nm) x (factor de dilución 1000) /1000= valor por cada 2 µL. El resultado se divido entre 2 µL y el resultado es el valor en µg mL<sup>-1</sup> o ng mL<sup>-1</sup>. Finalmente, los valores se corroboraron con el equipo Nanodrop.

**Síntesis de ADNc.** La síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total obtenido, se realizó con el Kit de AB System Apply High Capacity DNA Reverse Transcript. Se preparó una reacción que contenía  $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de Oligo dT, 10mM dNTPS mix, 1  $\mu\text{g}$  de ARN total y  $\text{H}_2\text{O}$  inyectable para ajustar el volumen a la cantidad de 16.6  $\mu\text{L}$ . La mezcla fue incubada 10 min en hielo y posteriormente homogenizada con una segunda mezcla de 3.0  $\mu\text{L}$  que contenía Buffer de síntesis 5X, 0.1 M DTT, 40 Units  $\mu\text{L}^{-1}$  RNAasa Out y  $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  Superscript II RT, para finalmente obtener un homogenizado de reacción de 20  $\mu\text{L}$ , la mezcla total fue incubada en el termociclador Techne Genius con el siguiente programa de síntesis: por 5 min a  $65^\circ\text{C}$ , para iniciar la fase de alineamiento,  $45^\circ\text{C}$  por 60 min para la elongación,  $85^\circ\text{C}$  por 5 min en la desnaturalización. Finalizado el tiempo se enfrió la mezcla y mantuvo a  $4^\circ\text{C}$ .

**PCR – RT.** Se realizaron cuatro repeticiones por cada muestra de carne en cada una de las cinco diferentes calificaciones de CC de las vacas lecheras Holstein que fueron evaluadas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT por sus siglas en inglés) en un equipo Step One Plus (AB system) para obtener los valores medios de umbral de fluorescencia (CT = Threshold cycle, por sus siglas en inglés) la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de la DNC. El ADNc de cada muestra fue cuantificado en un equipo nanodrop para evaluar la concentración dentro de las muestras de tejido en cada CC ( $130 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  aproximadamente). Debido a que el umbral de fluorescencia aumenta exponencialmente, en cuanto más ADN inicial contenga la muestra menor número de ciclos requiere para evaluar la eficiencia de la reacción, las muestras del lote B, fueron diluidas a 200, 100, 50, 25, 12.50, 6.25 y  $3.13 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . De ésta manera, para normalizar la cuantificación del ARNm blanco de cada reacción, se preparó una sonda de actina como gen de referencia endógena y como gen de interés de utilizó a la DNC para cada caso de CC, por triplicado para cada muestra de músculo. Se colocó para cada pozo, 20  $\mu\text{L}$  de mezcla conteniendo 10  $\mu\text{L}$  de Taqman Master mix, 1  $\mu\text{L}$  de sonda para actina como gen endógeno, 1  $\mu\text{L}$  ADNc y 8  $\mu\text{L}$  de agua para cada pozo, por triplicado en una placa de 48 pozos en donde se cubrió y homogenizó a 3,500 rpm por 15 segundos.

La sonda utilizada para DNC fue Bt03230914\_m1, con número de catálogo 4448892 y para actina fue Bt03279174\_g1, con número de catálogo 4331182, ambas de la empresa Thermo Fisher. La PCR-RT fue realizada en el equipo StepOnePlus (ABSystem) con el siguiente programa de amplificación para ambos genes: 50°C por 2 min como inicio, 40 ciclos de 95°C por 30 s de desnaturalización, 55°C por 30 s de extensión y 72°C por 30 s de extensión final. El procedimiento se repitió para cada una de las muestras de músculo de vaca en las cinco CC de las cuatro repeticiones. Finalizada la amplificación se obtuvieron los valores promedio el CT y RQ de las muestras por cada CC con el programa StepOne Plus™ (ABSystem) proporcionó, mismos que se analizaron estadísticamente.

### **Expresión del Gen DNC con la Técnica de Inmunohistoquímica**

**Toma de muestras.** De 20 vacas de raza Holstein que fueron calificadas en las cinco CC se obtuvieron 20 muestras del músculo LD de aproximadamente 2 X 2 X 2 cm cortadas transversalmente.

**Fijación de las muestras.** Estas se colocaron en frascos con capacidad de 100 mL con 70 mL de EtOH (etanol) al 70% y se conservaron a temperatura ambiente (14 - 20°C) como método de fijación. Posteriormente se procesaron las muestras en un equipo Microm STP 120, con EtOH a diferentes diluciones 75, 80, 90 y 95% por 15 min en cada una y por dos periodos de 15 min con EtOH absoluto. Finalizado este proceso se procedió a la formación del bloque de parafina con el equipo Microm EC 350, en donde se colocaron las muestras en parafina a 60°C por 20 min y se fijaron en porta muestras de plástico para posteriormente enfriarse y cortarse en un micrótopo Microm HM350 con navaja a un espesor de 5 µm y montados en portaobjetos xilanizados.

**Desparafinación y rehidratación.** Las muestras en los portaobjetos xilanizados se colocaron en horno eléctrico a 200°C por el tiempo necesario para eliminar la parafina excedente, posteriormente para eliminar los restos de parafina estos se bañaron en xileno dos veces por 5 min cada vez. Para la rehidratación de las muestras se colocaron 3 min en EtOH al 100, 95, 80, 70 y 50% por 3 min en cada dilución. Posteriormente se colocaron en agua destilada por 3 min por dos periodos.

**Proceso de eliminación de la auto fluorescencia.** Se realizó incubando las muestras con 20 mL de una solución de PBS a pH 7.4 con 150 mM de glicina y 0.01% de Tween. Posteriormente se incubaron en una solución de PBS 1X a pH 7.4 tres veces por 3 min. Luego se colocaron en solución de 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en PBS 1X pH 7.4 y después otra vez tres periodos de 3 min en solución de PBS 1X pH 7.4. Posteriormente se colocaron en solución de PBS a pH 7.4 a 4°C con 0.01% de borohidruro de sodio durante tres periodos de 10 min cada uno. Al termino se colocaron solo en solución de PBS 1X a pH 7.4 tres veces por 3 min cada vez. Por último, se colocaron por 30 min en 0.15 mM de etanolamina en PBS 1X a 4°C y después tres veces en solución de PBS 1X a pH 7.4 por 3 min cada vez.

**Recuperación antigénica.** Se colocaron las muestras por 30 min en solución 0.01% de EDTA a pH 9.0 a 90°C y posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 min en reposo en la misma solución hasta que tomó la temperatura ambiental.

**Permeabilidad.** Para incrementar la permeabilidad de la membrana las muestras se colocaron en una solución de PBS 1X con tritón al 0.02% en cámara húmeda por 30 min. Posteriormente se colocaron en solución de PBS 1X a pH 7.4 durante tres periodos de 5 min cada uno.

**Bloqueo.** Las laminillas se colocaron en una solución bloqueadora de suero fetal bovino 7% en PBS 1X a temperatura ambiente en cámara húmeda y posteriormente en solución de PBS 1X a pH 7.4 por 5 min por tres periodos.

**Tinción y fijación de las muestras.** 1) Se colocó el primer anticuerpo (primario) de DNC (N-15): sc-22613 del laboratorio Santa Cruz Biotechnology, Inc. en una dilución 1:25 en solución PBS 1X a pH 7.4, se incuban en cámara húmeda a temperatura ambiente por toda la noche. 2) Se colocó en solución de lavado por 5 min con PBS 1X a pH 7.4; 3) Posterior al lavado de las láminas se colocó por 1 h en contacto con el segundo anticuerpo (secundario) con anti IgG de cabra con FITC a temperatura ambiente; 4) Posteriormente se lavaron las muestras por triplicado por periodos de 5 min en solución PBS 1X a pH 7.4. Después se dejaron en cámara húmeda por 15 min y se colocó una o dos gotas de isómeros y xileno (resina de fijación) IVD HX803033 y se cubrieron con cubreobjetos que abarcaron toda el área de la muestra teñida.

**Observación en microscopio.** Una vez seca la resina se procedió a la observación en microscopio Ax10 Micro Imager A1 de Carl Zeiss y utilizando un filtro de luz 09 Zeiss con una emisión de LP 515 y excitación de 450 – 490nm de longitud de onda y con aumentos de 400X (10x en ocular y 40x en objetivo).

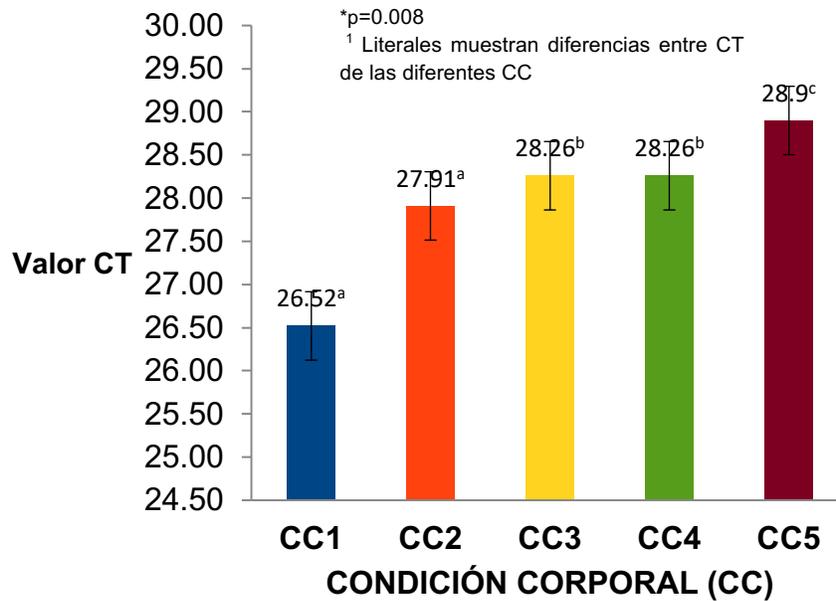
### **Análisis Estadísticos**

Para los datos del ARNm se ajustaron con un procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.0 (2000) y como único efecto fijo a la condición corporal de las vacas y la comparación de medias se realizó mediante contrastes polinomiales. Los valores fueron expresados como medias de los cuadrados mínimos de las muestras más su error estándar ( $\pm$ EE).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Cuantificación de la Expresión de la Decorina (DCN) por PCR en Tiempo Real**

Los valores obtenidos del análisis de la PCR en tiempo real con el equipo ABSsystem StepOne™, proporcionaron promedios del umbral de fluorescencia (CT) para cada triplicado de las muestras del músculo LD de vacas Holstein, así mismo, para el promedio de la cuantificación relativa (RQ por sus siglas en inglés) de las vueltas de expresión del gen DCN para cada CC (1 - 5) y estos se muestran en la Figura 1. Los valores de expresión del gen de la DCN representado por las medias del umbral de fluorescencia (CT) mostraron diferencias significativas ( $p = 0.008$ ) entre las muestras de músculo de las vacas Holstein en cada una de las CC (1 – 5) conforme estas se incrementaron. Así mismo, los valores de la expresión de la DNC mostraron un comportamiento lineal positivo ( $p = 0.00001$ ) expresado con mayores valores de CT. Como se observa en la Figura 1, conforme se fue incrementando la CC de 1 a 5, los valores del CT se fueron incrementando. Los valores de CT para CC-1 (animales emaciados), CC-3 (animales en peso ideal) y CC-5 (animales en condición obesa) fueron de 26.52, 28.26 y 28.90 respectivamente.



**Figura 1.** Valores de umbral de fluorescencia (CT) del ARNm de la decorina ( $\pm$ EE) de músculo *Longissimus dorsi* de vacas Holstein en diferentes condiciones corporales.

**Figure 1.** Fluorescence threshold (CT) values of decorin mRNA ( $\pm$ EE) from *Longissimus dorsi* muscle of Holstein cows under different body conditions.

En el Cuadro 1, la cuantificación relativa representada por RQ, que son las vueltas de expresión que el gen tuvo en cada una de las CC de las vacas Holstein, se observa como las CC-1 y CC-2 (0.8954 y 0.8754 respectivamente) no lograron expresar una vuelta (1.0), en comparación con los valores de RQ de las CC-3, CC-4 y CC-5.

Durante la restricción nutricional se afectan tejidos como el pulmón, cartílago, tejido muscular liso, vascular y músculo esquelético en la síntesis y degradación de los mismos como lo confirmó Spanheimer et al. (1991). Este reporte coincide con los del presente trabajo, los valores de expresión del ARNm de la DCN reportado como valor de CT son menores en la CC-1 en comparación con los valores de las CC-2 a la CC-5 y de la misma manera los valores de RQ, fueron significativamente menores en las CC bajas (1 y 2) comparados con los observados en los valores de RQ de las CC 3, 4 y 5.

**Cuadro 1.** Valores de la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de ARNm de la decorina en músculo de vacas Holstein de diferentes condiciones corporales.

**Table 1.** Values of the relative quantification (RQ) of the expression of mRNA of decorin in muscle of Holstein cows of different body conditions.

Objetivo	Condición corporal (CC)				
	1	2	3	4	5
Diferencia <sup>1</sup> vueltas	0.8954 <sup>a</sup>	0.8774 <sup>a</sup>	1.8783 <sup>b</sup>	2.1292 <sup>b</sup>	2.4665 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Las literales muestran diferencias entre las vueltas de expresión de la decorina entre cada condición corporal

Los valores de CT y RQ obtenidos por la PCR-RT en las condiciones altas (3, 4 y 5) con aumentos en los valores en la expresión de la DCN, coinciden con el comportamiento de los valores reportados por Bolton et al. (2008) en ratones y humanos en la evaluación del tejido graso y órganos, así como por Ross et al. (2005) en bovinos.

La expresión de los genes varía de acuerdo al estado nutricional de los animales que afecta los niveles de energía, los aportes calóricos y proteicos de las dietas. Para los valores de la RQ, que es el número de vueltas o veces que la cantidad de ARNm se expresó en este trabajo, mostró que en las CC-1 y CC-2 (0.8954 y 0.8774 respectivamente) presentaron valores de expresión bajos de ARNm y es debido a que los animales emaciados y/o delgados, con distrofia del músculo y poca energía, provoca la movilización y pérdida de masa muscular para aumentar el metabolismo de los aminoácidos para la producción de energía vía la gluconeogénesis (Byrne et al., 2005). Estos cambios observados, también son atribuidos a los cambios en la actividad metabólica dentro de la célula en los diferentes compartimientos del tejido muscular, por lo que, el efecto de la restricción nutricional y la expresión de varios genes en el músculo es posible se deba a la disminuida capacidad de la DCN a expresarse bajo una restricción nutricional.



El efecto de la restricción nutricional tiene tres causas posibles, la primera son los cambios en la expresión de los genes por efecto de los cambios metabólicos en la actividad celular en los diferentes compartimientos musculares. La segunda, por efecto de la modulación del recambio de proteínas que pueden aumentar o disminuir reflejando la modulación del músculo que está perdiendo miofibrillas más que el tejido colágeno para mantener el estado del tejido y por último, el metabolismo homeostático afecta la modulación de los genes por la alteración en la excreción del nitrógeno de los aminoácidos y una disminución en el metabolismo glicógeno y la energía que aumentan la transcripción del metabolismo de desintoxicación (Byrne et al., 2005), lo cual concuerda con el comportamiento observado en las dos CC bajas de las muestras de músculo de las vacas Holstein y que mostraron los valores menores de CT como expresión de ARNm.

Para los valores de expresión de la DCN en las condiciones CC-3, CC-4 y CC-5, se observa un incremento en los valores del CT y RQ de forma lineal positiva y con aumentos significativos en los valores de las vueltas de expresión de la DCN con RQ de 1.87, 2.12 y 2.46 respectivamente. Estos cambios inducen el intercambio proteico y energético formando tejido adiposo aumentando así el volumen muscular. Una de las funciones principales del tejido adiposo es el almacenamiento temporal de triglicéridos como reserva de energía. En el balance positivo de energía (CC- 3, 4 y 5), los pre adipocitos se desarrollan en adipocitos y tiene como consecuencia la deposición de grasa muscular en la cual la célula se altera y el volumen se incrementa junto con la MEC hasta producir una hipertrofia (Halberg et al., 2008) y la renovación de la red fibrilar de colágeno, así mismo, la formación de la MEC es estimulada por la insulina a través del aumento en la transcripción de los genes por procesos enzimáticos como lo reportó Mariman y Wang (2010).

Dentro de los cambios en el tejido adiposo y la MEC se incluyen adipocitos maduros en expansión, la formación de nuevos adipocitos, la acumulación de células inflamatorias en el tejido adiposo y la neovascularización para proporcionar sangre al tejido adiposo en expansión (Hausman y Richardson, 2004; Cao, 2007; Calgani, 2014). Para acomodar estos cambios, es necesaria la remodelación de la MEC por la degradación de la matriz existente y la formación de nueva matriz y la DNC es requerida para el correcto llenado por colágeno para la formación de nueva MEC (Ruoslahti, 1988; Cinar et al., 2021).

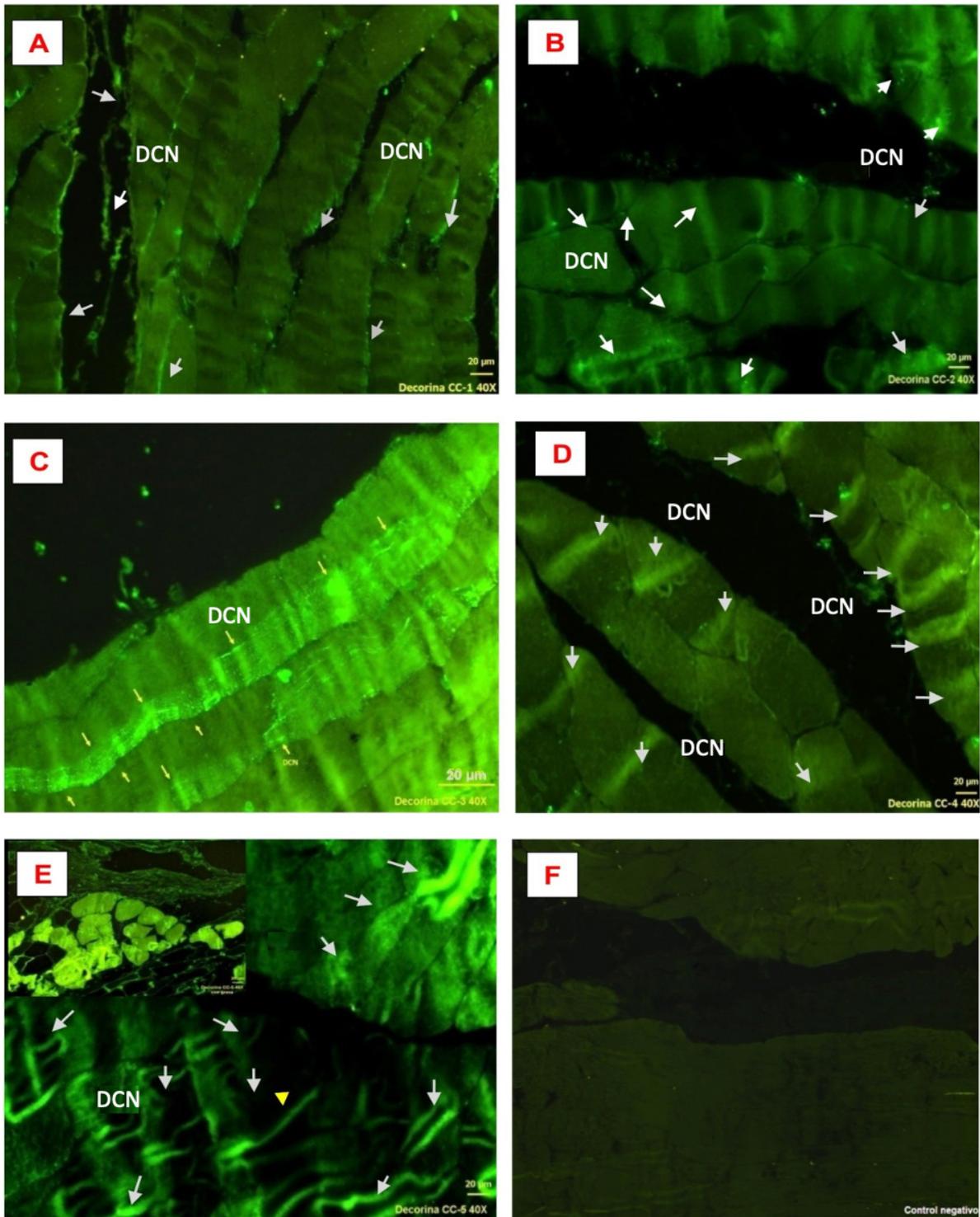
Los resultados de expresión de ARNm mostraron un cambio de RQ en la CC-3, que es el estado ideal de producción en vacas Holstein, también representa el momento en que los animales comienzan a mejorar la organización de las MEC y el volumen muscular, y posiblemente aumentando las reservas de energía.

### **Expresión del Gen DNC con la Técnica de Inmunohistoquímica**

Los resultados obtenidos en el análisis de inmunohistoquímica (IHQ) en los cortes de músculo de vacas, se muestran en la Figura 2. En la micrografía F se presenta el control negativo del tejido muscular como referencia de la prueba de IHQ de DNC, en las micrografías C, D y E las CC-3, CC4 y CC-5 respectivamente, en estas se observa una fluorescencia en las fibras más intensa y con mayor amplitud que las de CC-1 y CC-2, mostradas en las micrografías A y B. Esto se debió al efecto de la infiltración de grasa cuando existe un incremento en el balance energético. Ya que la deposición de grasa se acumula entre las capas de los grupos de fibras musculares y la red de TCIM, rompiendo parcialmente las estructuras de endomisio y el perimisio para dar espacio a los adipocitos, estos resultados concuerdan con los encontrados por Nishimura et al. (1999) en el LD de novillos de 20 y 36 meses de raza negra japonesa.

En la micrografía E se observa una reacción intensa en el tejido graso de la muestra, lo que corrobora que la DCN tiene una mayor actividad en el tejido graso, estos resultados son congruentes con los observados en el tejido adiposo de vacas, cerdos y ratones C57BL por Fukuhara et al. (2005), por el efecto de la mayor intensidad de fluorescencia en tejido adiposo visceral y subcutáneo reportado por Bolton et al. (2008) y en el tejido conectivo en cerdos por Nishiumi et al. (1997) y Calgani (2014), por lo que es evidente el papel de la DNC en la fisiología del tejido adiposo y TCIM, como se observó en las CC-3, CC-4 y CC-5 (Figura 2).

Debido a que el tejido adiposo es histológicamente clasificado como un tipo de tejido conjuntivo laxo y tal como el colágeno, contribuye considerablemente a la masa de tejido no celular. Este colágeno es producido en parte, por los adipocitos de las células de la fracción vascular/estromal (Zhang et al., 2007; Calgani, 2014), así como algunos tipos de células como las endoteliales, que expresan DNC en otros tejidos (Klein et al., 1995; Nelimarkka et al., 2001).



**Figura 2.** Morfología de fibras de músculo esquelético de vacas Holstein en diferentes condiciones corporales. (A=CC-1, B=CC-2, C=CC-3, D=CC-4, E=CC-5 y F=control negativo). Recuadro en E, muestra la expresión de decorina (DCN) en tejido adiposo.

**Figure 2.** Skeletal muscle fiber morphology of Holstein cows in different body conditions. (A=CC-1, B=CC-2, C=CC-3, D=CC-4, E=CC-5 and F=negative control). Inset in E shows decorin (DCN) expression in adipose tissue.

La DCN puede expresarse de diversas maneras en los tejidos, ya que tiene un rol pro angiogénico en tejido adiposo durante el balance energético positivo y en contraste, tiene efectos anti angiogénicos en ciertos casos y circunstancias como pudiera ser en las condiciones corporales más bajas (Nelimarkka et al., 1997; Grant et al., 2002; Sulochana et al., 2005; Blanco et al., 2011). Sin embargo, para adaptarse a estos cambios, la remodelación de la MEC se produce por la degradación de esta y la producción de nueva matriz, así mismo, la DNC actúa en la organización y se requiere para el correcto plegamiento de otros componentes de la MEC, como el colágeno (Ruoslahti, 1988; Saavedra et al., 2015).

En las micrografías de la Figura 2, en general se muestran las fluorescencias y se observa el número de reacciones a través y a lo largo de las fibras musculares del LD con una menor cantidad de DCN en CC-1 y CC-2 por el efecto del balance energético negativo (emaciadas y/o delgadas) y que corrobora los resultados obtenidos por la PCR en tiempo real en la expresión del gen. Por otra parte, observamos en las condiciones CC-3 y CC-4 (micrografías C y D) las diferencias en cuanto al grosor de la franja de fluorescencia en donde se expresó la DNC, que puede reflejar un crecimiento de tejido conectivo por la expansión del músculo y por efecto angiogénico para una mayor distribución del flujo sanguíneo en vías de almacenar la energía en los estados de CC-4 y CC-5 y la misma modificación de la MEC. Para el caso de la CC-5 (obesa) se observa una mayor y clara presencia de DNC y de tejido adiposo (micrografía E). En la CC-5 se observó tejido graso, pero en las hembras en una CC-3 Y CC-4 no se observaron depósitos de grasa. La expresión de DCN puede estar relacionada a los atributos de las razas lecheras que afectan en la deposición de la grasa inter e intramuscular, debido a que no presentan un marmoleo abundante como en los animales de razas especializadas en la producción de carne.

En este experimento, se observó que la expresión del ARNm a partir de un balance nutricional positivo desde la CC-3 a niveles positivos altos en condiciones 4 y 5, la DCN se expresa más en tejidos adiposos (CC-5). Esto sugiere que en animales con mayor CC (3 a 5), las características en la calidad de la carne serán mejores, debido a que se puede dar una mejor infiltración de grasa y también por el aumento de volumen muscular, se produce una reestructuración del TCIM de la MEC para expandirse, esto en términos de la calidad de la carne se refleja en mejores

características de carne, ya que al mejorar la alimentación antes del sacrificio las propiedades sensoriales mejoran como lo reportó Tatum (1981) y Suárez-Paternina et al (2015). Así mismo, como se reportó en las CC-5, el ganado con buena alimentación y que se mantiene en balance energético positivo experimentan rápidos rangos de síntesis de proteínas y por lo tanto, se puede esperar que se produzcan carne con más altas proporciones de nueva síntesis de colágeno termolábil afectando sus características organolépticas, lo cual concuerda con trabajos realizados por Aberle et al. (1981), Smith et al. (2007) y Yanng et al (2020). El ganado de desecho Holstein, que se encuentre en las CC 3, 4 y 5, tiene una mayor calidad de carne, así como una mayor cantidad de masa muscular, ya que la DCN interviene en la capacidad de retención del agua y en la expansión de la MEC (Velleman, 2002), por lo que ésta puede ser una oportunidad para darle continuidad al presente trabajo en la evaluación del rendimiento y caracterización de calidad de la carne de ganado de desecho en las condiciones adecuadas de producción y utilizar la expresión de la DCN como un posible indicador de esta calidad de la carne en razas productoras de carne de res y de otras especies *in vivo*, siempre que estas se encuentren en igualdad de condiciones corporales y explorar esta posibilidad. La DCN es un proteoglicano multifuncional que interactúa con el colágeno de la MEC que afectan las estructuras del TCIM perimisio y endomisio en el tejido músculo esquelético, tejido adiposo y vascular, que a su vez se ve afectada su expresión por los cambios metabólicos cuando cambian las condiciones corporales durante la vida productiva de los bovinos Holstein. Ya que estos son desechados por varias causas, también tienen diferentes estados fisiológicos de condición corporal y con la consecuencia en la variabilidad de la calidad de la carne de res y sus funciones metabólicas afectando la expresión de los genes reguladores de los tejidos, como la DCN, por lo tanto es necesario seguir explorando las posibilidades continuar midiendo la expresión de este gen y su relación con la cantidad de tejido colágeno y su calidad de la carne de animales y razas antes de sacrificarlos.



## CONCLUSIONES

Los cambios en la expresión de la DNC aumentan cuando mejora la condición corporal de las vacas Holstein de manera lineal positiva. Estas características hacen variar la calidad organoléptica de la carne, por lo que la dureza, puede afectarse cuando menor grasa y condición corporal existe, al incrementarse los enlaces de colágeno y menor expansión de la masa muscular. La expresión de la DNC en las micrografías corrobora lo observado en la PCR-RT, una mayor intensidad de la inmunofluorescencia en cada cambio positivo en la CC de los bovinos. La DCN se ve afectada por el incremento de la CC de los animales, genera una mayor acumulación de la grasa intramuscular y por tanto, una mejora en la suavidad de la carne por una mayor termolabilidad del colágeno estructural en músculo de ganado con mejor CC. El modelo utilizado de bovinos productores de leche permite observar los cambios en CC como se haría en ganado especializado en carne.

## Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada con fondos PRODEP y por el Ph. D. Francisco Alfredo Núñez González†, Profesor investigador de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la UACH. Así mismo, a la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato, por su invaluable apoyo.

## LITERATURA CITADA

- Aberle, E. D., Reeves, E. S., Judge, M. D., Husley, R. E., & Perry, T. W. (1981). Palatability and muscle characteristics of cattle with controlled weight gain: Time on high energy diet. *Journal of Animal Science*, 52, 757.
- Albrecht, E., Liu, X., Yang, X, Zhao, R., Jonas, L., & Maak, S. (2011). Colocalization of myostatin and decorin in bovine skeletal muscle. *Archives Animal Breeding*, 54, 147-156. <https://doi.org/10.5194/aab-54-147-2011>
- Bailey, J. A., & Light, N. D. (1989). *Connective tissue in meat and meat products*. Elsevier Applied Science, London.
- Blanco, M., Picard, B., Jurie, C., Agabriel, J., Micol, D., y Garcia-Launay, F. (2011) Estudio del efecto del músculo, edad y tipo de raza en el colágeno en la carne de terneros mediante meta-análisis. AIDA (2011), *XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II*, 628-630, Saint-Gènes-Champanelle, Francia.

- Bolton, K., Segal, D., McMillan, J., Jowett, J., Heilbronn, L., Abberton, K., Zimmet, P., Chisholm, D., Collier, G., & Walder, K. (2008). Decorin is a secreted protein associated with obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Obesity*, 32, 1113-1121.
- Brandan, E., Retamal, C., Cabello-Verrugio, C., & Marzolo, M. P. (2006) The low density lipoprotein receptor-related protein functions as an endocytic receptor for decorin. *The Journal Biological Chemistry*, 281, 31562-31571.
- Byrne, K. A., Wang, Y. H., Lehnert S. A., Harper, G. S., McWilliam, S. M., Bruce, H. L., & Reverter, A. (2005). Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. *Journal of Animal Science* 83, 1-12.
- Cao, Y. (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2362-2368.
- Casar, J. C., McKechnie, B. A., Fallon, J. R., Young, M. F., & Brandan, E. (2004) Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Developmental Biology*, 268(2), 358-371.
- Cinar, Z, Emre, U., Gül, M., Yiğit, Ö., Mammadov, E., Yiğit, E., Gül, S., Cırık, H.R. (2021). Is Decorin a Promising New Agent for Facial Nerve Regeneration? An Experimental Study. *Audiol Neurotol*, 26, 195-205. <http://doi:10.1159/000512003>
- Danielson, K. G., Balibault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kandle, K. E., & Iozzo, R. V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *Journal of Cell Biology*, 136(3), 729-743.
- Eggen, K. H., Malmstrom, A., & Koet, S. O. (1994). Decorin in a large dermatan sulfate proteoglycan in bovine striated muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1204(2), 287-297.
- Fukuhara, A, Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., & Shimomura, I. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307, 426-430.
- Galgani, J.E. (2014). Expandability of adipose tissue in metabolic homeostasis. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, 7 (1), 14-16.
- González, G.P. & Bellón, J.M. (2013). Alteraciones de la matriz extracelular del tejido conectivo en el proceso de herniogénesis inguinal. *Revista Hispanoamericana de hernia*, 1(1), 27-36.

- Grant, D. S., Yenisey, C., Rose, R. W., Tootell, M., Santra, M., & Iozzo, R. V. (2002). Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene*, 21, 4765-4777.
- Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P. E. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 37(3), 753-768.
- Hao, D., Lu, L., Song, H., Duan, Y., Chen, J., Carney, R., Li, J.J., Zhou, P., Nolte, J., Lam, K.S., Leach, J.K., Farmer, D.L., Panitch, A., & Wang, A. (2022). Engineered extracellular vesicles with high collagen-binding affinity present superior in situ retention and therapeutic efficacy in tissue repair. *Theranostics*, 12(13), 6021-6037. doi:10.7150/thno.70448
- Hausman, G. J. & Richardson, R. L. (2004). Adipose tissue angiogenesis. *Journal of Animal Science*, 82(3), 925-934. <https://doi.org/10.1071/AN17004>.
- Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J., Hattori, A., Sharma, M., Kambandur, R., & Nishimura, T. (2008). Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. *Journal of Cellular Physiology*, 215(3), 856-867.
- Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*, 84, 649-698.
- Klein, D. J., Cohen, R. M., & Rymaszewski, Z. (1995). Proteoglycan synthesis by bovine myocardial endothelial cells is increased by long-term exposure to high concentrations of glucose. *Journal of Cellular Physiology*, 165: 493-502.
- Krusius, T., & Ruoslahti, E. (1986). Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 83(20), 7683-7687.
- Loscalzo, J., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D. & Jameson, J. (2022). Harrison. Principios de Medicina Interna, 21e. McGraw Hill.
- Mariman, E. C. M., & Wang, P. (2010). Adipocyte extracellular matrix compositional, dynamics and role in obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 1277-1292.
- McCormick, R. J. (1999). Extracellular modifications to muscle collagen: implications for meat quality. *Poultry Science*, 78, 785-791.
- Młynek, K., Straczek, I., & Głównska, B. (2022). The occurrence of a negative energy balance in holstein-friesian and simmental cows and its association with the time of resumption of reproductive activity. *Metabolites*, 12(5), 448. <https://doi.org/10.3390/metabo12050448>

- Nelimarkka, L., Kainulainen, V., Schonherr, E., Moisander, S., Jortikka, M., Lammi, M., Elenius, K., Jalkanen, M., & Jarvelainen, H. (1997). Expression of small extracellular chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans is differentially regulated in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12730-12737.
- Nelimarkka, L., Salminen, H., Kuopio, T., Nikkari, S., Ekfors, T., Laine, J., Pelliniemi, L., & Jarvelainen, H. (2001). Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 158, 345-353.
- Nishimura, T. (2010). The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Animal Science Journal*, 81, 21-27.
- Nishimura, T., Futami, E., Taneichi, A., Mori, T., & Hattori, A. (2002). Decorin Expression during development of bovine skeletal muscle and its role in morphogenesis of the intramuscular connective tissue. *Cell Tissues Organs*, 171, 199-214.
- Nishimura, T., Hattori, A., & Takahashi, K. (1999). Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *Journal of Animal Science*, 77, 93-104.
- Nishimura, T., Nozu, V., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., & Hattori, A. (2008). Decorin expression in quiescent myogenic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 383-387.
- Nishiumi, T., Fukuda, T., & Nishimura, T. (1997). Isolation and characterization of a small proteoglycan associated with porcine intramuscular connective tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2978-2983.
- Purslow, P. P., & Duance, V. C. (1990). The Structure and Function of Intramuscular Connective Tissue. In D. W. L. Hukins (Ed.), *Connective Tissue Matrix* (Vol. 2, pp. 127-166). MacMillan.
- Ross, J. W., Smith, T. K., Krehbiel, C. R., Malayer, J. R., DeSilva, U., Morgan, J. B., White, F. J., Hersom, M. J., Horn G. W., & Geisert, R. D. (2005). Effects of grazing program and subsequent finishing on gene expression in different adipose tissue depots in beef steers. *Journal of Animal Science*, 83, 1914-1923.
- Rouslahti, E. (1988). Structure and biology of proteoglycans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 4, 229-255.
- SAS. (2000). JMP v.8. USA: Statistical Discovery from SAS Institute.
- Saavedra, J.S., Zúñiga, L.F., Vásquez-López, J.A., Navia, C.A., Mosquera, L.P., & Bernal, S.I. (2015). La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología*, 7(1), 12-35.

- Scott, J. E. (1988). Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochemical Journal*, 252, 313-323.
- Scott, J. E. (1992). Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB Journal*, 6, 2639-2645.
- Scott, J. E., & Thomlinson, A. M. (1998). The structure of interfibrillar proteoglycan bridge ('shape modules') in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments. *Journal of Anatomy*, 192, 391-405.
- Smith, G. C., Berry, B. W., Savell, J. W., & Cross, H. R. (2007). USDA maturity indices of beef rib steaks. *Journal of Food Quality*, 11, 1-13.
- Spanheimer, R., Zlavet, T., Umpierrez, G., & DiGirolamo, M. (1991). Collagen production in fasted and food-restriction rats: response to duration and severity of food deprivation. *The Journal of Nutrition*, 121, 518-524.
- Suárez-Paternina, E., Reza-García, S., Cuadrado-Capella, H., Pastrana-Vargas, I., Espinosa-Carvajal, M. & Mejía-Kerguelén, S. (2015). Variación en la concentración de sólidos solubles durante el día, en tres pasturas en época seca en el valle medio del río Sinú. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 16(2), 181-188.
- Sulochana, K. N., Fan, H., Jois, S., Subramanian, V., Sun, F., Kini, R. M., Ge, R. (2005). Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 27935-27948.
- Tatum, J. D. (1981). Is tenderness nutritionally controlled? *Reciprocal Meat Conference Proceeding*, 34, 65-67.
- Velleman, S. G. (1999). The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development. *Poultry Science*, 78, 778-784.
- Velleman, S. G. (2000). The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poultry Science*, 79, 985-989.
- Velleman, S. G. (2002). Role of the extracellular matrix in muscle growth and development. *Journal of Animal Science*, 80 (suppl 2), E8-E13.
- Velleman, S.G., Coy, C.S., & Bacon, W.L. (2003). Temporal and spatial localization of proteoglycan decorin transcripts during the progression of cholesterol-induced atherosclerosis in Japanese quail. *Connect Tissue Research*, 44(2), 69-80.
- Vogel, K. G., & Trotter, J. A. (1987). The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Collagen and Related Research*, 7, 105-114.

- Weber, I. T., Harrison, R. W., & Iozzo, R. V. (1996). Model structure of decorin and implication for collagen fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 31767-31770.
- Wildman, E. E., Jones, G. M., Wagner, P. E., Boman, R. L, Troutt, H. F., & Lesch, T. N. (1982). A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65, 495-501.
- Yang, S., Suhandoko, A.A., & Chen, D. (2020). Impact of Nutritional Information on Consumers' Willingness to Pay for Meat Products in Traditional Wet Markets of Taiwan. *Foods*, 9(8),1086. <https://doi.org/10.3390/foods9081086>
- Yoshida, N., Yoshida S., Koishi K., Masuda K., & Nabeshima Y. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of Cell Science*, 111, 769-779.
- Zhang, J., Wright, W., Bernlohr, D. A., Cushman, S. W., & Chen, X. (2007). Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 292, E1433-E1440.
- Zhu, J., Li, Y., Shen, W., Qiao, C., Ambrosio, F., Lavasani, M., Nozaki, M., Branca, M. F., & Huard, J. (2007). Relationships between growth factor beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 25852-25863.
- Wang, C., Brisson, B.K., Terajima, M., Li, Q., Hoxha, K., Han, B., Goldberg, A.M., Sherry, L.X., Marcolongo, M.S., Enomoto-Iwamoto, M., Yamauchi, M., Volk, S.W., & Han, L. (2019). Type III collagen is a key regulator of the collagen fibrillar structure and biomechanics of articular cartilage and meniscus. *Matrix Biology*, 85-86, 47-67.
- Zin, T.T., Seint, P.T., Tin, P., Horii, Y., Kobayashi, I. (2020). Body Condition Score Estimation Based on Regression Analysis Using a 3D Camera. *Sensors (Basel)*, 20(13), 3705.

