UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

ZOOTECNIA

PREDIÇÃO DE GENES HUB PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE

Aluno: Luís Gustavo Valli Veloso

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque

JABOTICABAL - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

ZOOTECNIA

PREDIÇÃO DE GENES HUB PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE

Luís Gustavo Valli Veloso

Orientador: Profa. Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica) apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal – SP

2022

V443p

Veloso, Luís Gustavo Valli

Predição de genes hub para características de qualidade da carne em bovinos Nelore / Luís Gustavo Valli Veloso. -- Jaboticabal, 2022

48 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Larissa Fernanda Simielli Fonseca

Coorientadora: Lucia Galvão de Albuquerque

1. Genética animal. 2. Melhoramento genético. 3. Bovino de corte. 4. Qualidade da carne. 5. Genes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Zootecnia

CERTIFICADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: PREDIÇÃO DE GENES HUB PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DA CARNE EM BOVINOS NELORE

ACADÊMICO: Luís Gustavo Valli Veloso

CURSO: Zootecnia

ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca

PERÍODO: **Semestre** 10 **Ano** 2022

Aprovado com conceito: **A** [X] **B** [ ] **C** [ ]

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados CAPELO. [X] **Sim** [ ] **Não**

Reprovado: [ ]

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	Profa. Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca	Larissa F. Simielli Fonseca
Membro	Profa. Dra. Danielly Beraldo dos Santos Silva	
Membro	Me. Patrícia Iana Schmidt	Patrícia Iana Schmidt

Jaboticabal 01 / 11 / 2022

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: / /

Chefe do Departamento

Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA
Chefe do Departamento de Zootecnia
Matrícula Nº 422823-6

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem ele não estaria vivenciando esse momento único, sempre esteve comigo em todas as conquistas alcançadas durante todas as minhas fases de aprendizado da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Fábio e Liciane que são até os dias de hoje a minha maior base nessa vida, obrigado por todo apoio incondicional desde o momento que eu pisei no jardim de infância até esse momento no final da faculdade sem vocês não estaria aqui também. Como sempre somos família de três, amo vocês.

Agradeço as minhas avós Elza e Sônia por fazerem parte da minha vida, juntamente com minhas tias Fabiana e Mônica e outros familiares.

Agradeço a minha tia Sônia que sempre me ajudou e apoiou durante minha permanência na faculdade, juntamente com todo pessoal do Departamento de Biologia.

Agradeço a todas as minhas amizades do tempo de escola, principalmente as que mantiveram o contato após a conclusão do ensino médio.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação desde o início de tudo até agora no período da faculdade.

Agradeço a todos meus colegas do curso de zootecnia pela vivência durante todos esses anos. Em especial a Isabela Milla, Larissa Gonçalves Barbosa, Mariana de Oliveira Nascimento e Willian Souza por toda amizade construída ao lado de vocês, foram pessoas muito importantes durante todo o curso e com toda certeza os levarei comigo por toda minha vida. Além disso destaco também minha amiga, irmã e parceira de estágio Nathalia Espanhol que se tornou uma pessoa muito importante para minha vida. Amo todos vocês e obrigado por

todos os momentos e risadas que passamos juntos nesses anos e por todo o apoio de sempre, melhor grupo da zootecnia.

Gostaria de agradecer a Professora Lucia Galvão de Albuquerque por ter me aceitado no estágio lá no começo de tudo em 2020, obrigado por todos os ensinamentos passados.

Agradeço a todo pessoal da salinha e do grupo de Genética e Melhoramento Animal da FCAV pelos ensinamentos, ajudas, risadas e amizades durante todo processo.

Agradeço a minha orientadora Professora Larissa Fernanda Simielli Fonseca por todos os ensinamentos e ajudas durante a realização desse trabalho, além da paciência e suporte perante as minhas dúvidas e dificuldades. Tenho a convicção de que ganhei uma grande amiga.

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Unesp e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte e financiamento da bolsa de iniciação científica que contribui imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer a Unesp por mudar minha vida e proporcionar momentos únicos que levarei para sempre comigo.

A todos que participaram de alguma forma da minha jornada até hoje, muito obrigado!

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso aos meus pais Liciane e Fábio e todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante meus 22 anos de existência. Meus amigos, familiares e professores, todos tiveram grande importância durante cada etapa vivenciada. Muito obrigado!

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**..... 1
2. **OBJETIVOS**..... 3
   - **2.1. Geral**..... 3
   - **2.2. Específicos**..... 3
3. **REVISÃO DE LITERATURA**..... 4
   - **3.1. RNA-Seq e estudo de características de qualidade de carne em bovinos**..... 4
   - **3.2. Redes de co-expressão gênica**..... 8
4. **MATERIAIS E MÉTODOS**..... 10
   - **4.1. Genes candidatos oriundos de uma revisão sistemática**..... 10
   - **4.2. Análise de co-expressão e enriquecimento**..... 17
5. **RESULTADOS**..... 17
6. **DISCUSSÃO**..... 25
7. **CONCLUSÃO**..... 30
8. **REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS**..... 33

1. INTRODUÇÃO

Segundo um estudo levantado pela Secretaria de Inteligência e Relações Estratégicas da Embrapa no ano de 2021, analisando os dados disponibilizados pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o ano de 2020 colocou o Brasil na posição de maior rebanho de bovinos. Com cerca de 217 milhões de cabeças, representando 14,3% do total mundial e ficando à frente da Índia, com 190 milhões. As exportações entre os anos de 2000 a 2020 renderam cerca de 265 bilhões de dólares, só no ano de 2020 foram exportados 2,2 milhões de toneladas de carne bovina o que representa 14,4% do total no mundo.

Considerando este cenário, em paralelo com o crescimento do rebanho, o melhoramento genético animal tornou-se cada vez mais efetivo. Desde o sequenciamento completo do genoma bovino em 2009 até a mais recente atualização de 2020 (ROSEN et al., 2020) o melhoramento genético animal avançou muito no objetivo de encontrar genes e variantes que possam proporcionar melhorias para as características de importância econômica e relevantes para a produção, além de estudar como essas características se inter-relacionam e influenciam o desenvolvimento metabólico do animal (LÔBO et al., 2010).

As expansões da comercialização da carne bovina estão totalmente relacionadas com à qualidade da carne. Por parte dos consumidores a maciez é considerada a característica organoléptica de maior relevância (PAZ & LUCHIARI FILHO, 2000). A melhoria da maciez vêm contribuindo para a produção de carne de zebuínos, uma vez que esses animais apresentam carne mais dura quando comparados aos de origem taurina (ALVES et al., 2005).

As características que medem a quantidade de gordura intramuscular, como conteúdo lipídico e marmoreio, têm sido correlacionadas à maciez, palatabilidade, suculência e valor nutricional que a carne possui (WOOD et al., 2008; PICKWORTH et al., 2010 e COSTA et al., 2013). A gordura que fica localizada intramuscularmente agrega valor ao produto pois

muitos consumidores ficam dispostos a pagar mais caro por carne que apresentam alto grau de marmoreio (DU et al., 2013; HAUSMAN et al., 2014). Outra característica de grande importância no processamento da carne, é a espessura de gordura subcutânea, que atua principalmente como isolante térmico durante o processo de resfriamento da carcaça, fazendo uma capa de proteção para a carne (MEIRELLES et al., 2010).

Visando a melhoria dessas características, várias metodologias quantitativas e moleculares vêm sendo aplicadas ao longo dos anos. Dentre as técnicas moleculares, o estudo do transcriptoma têm sido muito relevante, uma vez que permite a análise dos genes expressos dentro de uma célula ou de um tecido específico em um dado momento (FONSECA et al., 2017). Vários artigos científicos já foram publicados contendo listas de genes diferencialmente expressos para as características de qualidade de carne como concentração de minerais (DINIZ et al., 2016; AFONSO et al., 2019), ácidos graxos (BERTON et al., 2016; CESAR et al., 2016; OLIVIERI et al., 2020), gordura intramuscular (CESAR et al., 2015; SANTOS SILVA et al., 2019), marmoreio (FONSECA et al., 2020), maciez (FONSECA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018) e índice de fragmentação miofibrilar (MUNIZ et al., 2020).

A busca por genes candidatos para cada característica separadamente, têm mostrado que prospectar genes comuns para as várias características de qualidade de carne, pode auxiliar de forma efetiva no processo de entendimento da expressão dos fenótipos. Assim, estudos visando a integração desses dados em bovinos da raça Nelore, têm grande potencial para contribuir na seleção de animais geneticamente superiores para essas características. O objetivo deste trabalho foi realizar análise de enriquecimento e co-expressão de forma conjunta com os genes diferencialmente expressos, comuns para as características de qualidade da carne (concentração de minerais, teor de ácido graxos, teor de gordura

intramuscular e maciez), a partir de estudos prévios publicados na literatura, que utilizaram a técnica de RNA-Seq para identificar genes candidatos em bovinos da raça Nelore.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar análises de enriquecimento e co-expressão de forma conjunta com os genes diferencialmente expressos, comuns para as características de qualidade de carne: teor de ácidos graxos, teor de gordura intramuscular (método químico e visual – marmoreio), concentrações de minerais e maciez (índice de fragmentação miofibrilar e *shear force)*.

2.2. Específico

- A partir da revisão sistemática realizada por Corrêa et al. (2022)
- Realizar análise de enriquecimento funcional com o objetivo de entender as funções e processos biológicos, as quais os genes diferencialmente expressos comuns atuam.
- Realizar análise de co-expressão a fim de encontrar genes *hub*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.RNA-Seq e estudo de características de qualidade de carne em bovinos

A técnica de análise de expressão global conhecida como *RNA Sequencing* (RNA-Seq) teve seu início de utilização em 2004 e vêm sendo uma ferramenta revulocionária em análises de transcriptoma para diversas espécies. Comparada com outra técnica como a tradicional *microarray*, o RNA-Seq possui muitas vantagens, como: uma quantificação precisa de transcritos, maior gama de cobertura dinâmica e abrangente de todas as sequências que são expressas em um tecido alvo. Contudo temos algumas exigências para o bom funcionamento dessa técnica, tais como a necessidade de computadores com uma grande capacidade de armazenamento de dados, além do desenvolvimento de técnica para a normalização desses dados e alguns métodos específicos da estatística para esse tipo de análise (WICKRAMASINGHE et al., 2014).

O sequenciamento de RNA (RNA-Seq), tipicamente, consiste no isolamento do RNA total, enriquecimento e depleção do rRNA, conversão do RNA alvo em uma biblioteca de cDNA com adaptadores anexados em uma ou ambas as extremidades, sequenciamento em plataformas *high-throughput* e análise dos dados (GRIFFITH et al., 2015). O RNA-Seq possui milhões de leituras de curtas sequências de DNA complementar (cDNA) que geralmente são mapeadas em relação a um genoma de referência, obtendo um mapa transcricional com escala genômica, sendo constituída pela estrutura de transcrição e o nível de expressão que cada gene possui. Além do mais, por meio desta técnica é possível conhecer com exatidão a localização das fronteiras de transcrição; como se dá a conexão de dois éxons; polimorfismos em regiões transcritas e encontrar algumas isoformas de splicing (CLOONAN et al., 2008; LISTER et al., 2008; MORTAZAVI et al., 2008; CÁNOVAS et al., 2010; CIRULLI et al., 2010).

A primeira utilização da técnica de RNA-Seq em bovinos foi realizada por Medrano et al. (2010). Esses autores fizeram uma análise comparativa do transcriptoma de células somáticas e tecido mamário em bovinos da raça Holandesa e mostraram que o leite expressa um conjunto único de genes referentes ao desenvolvimento de órgãos, comportamento e imunidade dos animais, além disso o leite pode ser usado como uma amostra alternativa para o estudo da expressão na glândula mamária. Desde então, técnica de RNA-Seq vêm sendo abundantemente utilizada para os estudos de transcriptoma de animais de produção, tais como bovinos (CASEY et al., 2011; FORTES et al., 2016); suínos (CARDOSO et al., 2017); aves (CUI et al., 2017); peixes (SUDHAGAR et al., 2018); equinos (CORREA et al., 2018) e até abelhas (BADAOUI et al., 2017).

Para bovinos da raça Nelore a técnica de RNA-Seq vêm sendo aplicada para identificar genes diferencialmente expressos para características de qualidade da carne, tais como: concentração de minerais (AFONSO et al., 2019), ácidos graxos (BERTON et al., 2016; CESAR et al., 2016; OLIVIERI et al., 2020), teor de gordura intramuscular (CESAR et al., 2015; SANTOS SILVA et al., 2019), marmoreio (FONSECA et al., 2020), maciez (FONSECA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018) e índice de fragmentação miofibrilar (MUNIZ et al., 2020).

Estudos realizados com bovinos da raça Nelore mostraram que genes envolvidos no metabolismo de transporte de moléculas minerais estão relacionados com a maciez da carne (TIZIOTO et al., 2013; TIZIOTO et al., 2014; FONSECA et al., 2017). A disponibilidade do cálcio é um exemplo, que afeta o sistema proteolítico calpaína/calpastatina, os quais são componentes principais da proteólise da carne no *post-mortem* (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006) além de ser de extrema importância para a contração muscular.

A composição de ácidos graxos (AG) da gordura intramuscular presente na carne é de extrema importância para a saúde humana, sendo que essa gordura não pode ser removida ou extraída antes do seu consumo final (DE SMET, RAES & DEMEYER, 2004). Tanto a quantidade como a qualidade da composição de ácidos graxos da carne bovina são dependentes de todo metabolismo lipídico que se desenvolve ao longo da vida do animal.

Dentre os fatores que influenciam diretamente na composição de ácidos graxos na carne, temos a genética, dieta, condição sexual, taxa de crescimento e idade ao abate (WOODS & FEARON 2009; LADEIRA et al., 2016). Dentre todos os fatores a genética possui uma importância considerável no perfil dos ácidos graxos de ruminantes (PITCHFORD et al., 2002; DE SMET, RAES & DEMEYER, 2004). Além do mais, o conteúdo da gordura intramuscular está intrinsicamente relacionado com à raça (INOUE et al., 2011; KELLY et al., 2013; FEITOSA et al., 2017). Partindo desse princípio, Martins et al. (2015), comparando dois grupos genéticos, retrataram que a carne de bovinos da raça Nelore apresenta um menor conteúdo de gordura quando comparado a carne de bovinos da raça Angus.

De acordo com Ladeira et al. (2018) algumas mudanças no balanço entre a síntese e a degradação de lipídios (*turnover* lipídico) resultam no aumento ou na redução do marmoreio na carne. Sendo assim, aumentar a captação e síntes dos ácidos graxos juntamente com diminuição da oxidação pode ser associada com o aumento de deposição de gordura intramuscular. E todo processo está influenciado pela expressão de genes, que vão ter sua expressão aumentada ou reprimida a partir da dieta oferecida aos animais (LADEIRA et al., 2018).

A seleção por força de cisalhamento se torna uma maneira eficaz de melhorar a maciez da carne bovina, visto que as estimativas de herdabilidade moderadas altas que foram encontradas na literatura para essa característica podem variar de 0,14 a 0,93 para raças taurinas (SHACKELFORD et al., 1994; BOUKHA et al., 2011; ALLAIS et al., 2014;

MATEESCU et al., 2015) e 0,11 a 0,29 para zebuínos (RILEY et al., 2003; SMITH et al., 2009; TIZIOTO et al., 2013; CASTRO et al., 2014). Nota-se que a herdabilidade pode apresentar grande variabilidade até para animais de mesma raça, em virtude das populações analisadas, formação de grupo contemporâneo e ainda do modelo utilizado para estimação.

A maciez da carne é uma das características mais valorizadas no mercado das carnes (MIAR et al., 2014; SUN et al., 2020). Fonseca et al. (2017) identificaram 40 genes diferencialmente expressos para maciez em bovinos Nelore, porém apenas 17 mostraram funções conhecidas, o que evidencia a natureza quantitativa da característica, sendo a maioria envolvidos no desenvolvimento do tecido muscular, esses genes podem ser considerados marcadores potenciais para a característica de maciez da carne.

Outra metodologia utilizada para fazer a avaliação da maciez na carne de forma acurada, é o índice de fragmentação miofibrilar (IFM) (HOPKINS et al., 2000). De forma fenotípica o IFM e a força de cisalhamento são medidas inversamente proporcionais para a maciez da carne, sendo assim, quando ocorre um aumento no IFM, a força de cisalhamento diminui (OLSON et al., 1976).

De acordo com Muniz et al. (2020) o uso de fenótipos com IFM como um indicativo potencial para a característica de maciez da carne, para estudos de transcriptômica, pode proporcionar o descobrimento de novos genes candidatos à essa característica. Ainda neste trabalho, os autores mostraram genes que podem ser selecionados como candidatos posicionais para a maciez como os codificadores de miosina (*MYL6* e *MYBPH*) e codificadores tripartidos (*TRIM63* e *TRIM55*), além dos genes *TRIOBP* e *CHRNG*. Esses genes codificam proteínas que são específicas do músculo, fator fundamental no processo da carne devido a sua maturação.

3.2. Redes de co-expressão gênica

Com a descoberta de novas tecnologias e consequentemente a chegada das ciências "ômicas", como a genômica, transcriptômica e proteômica, entre outras, a grande quantidade de dados que vêm sendo gerados, necessitam de novas abordagens para a sua síntese e interpretação. Uma das abordagens mais comuns para a análise dos grandes conjuntos de dados transcriptômicos, é a análise de redes de correlação (co-expressão), método que foi proveniente da biologia de sistemas (AOKI et al., 2007; LANGFELDER et al., 2008; DILEO et al., 2011).

A principal função de uma rede de co-expressão é informar a correlação que existe entre os genes expressos. O termo expõe a semelhança, em variedade de condições experimentais, dos padrões de expressão dos genes (AOKI et al., 2007). A análise de co-expressão pode ser não específica, na qual o interesse e foco principal são as próprias redes, ou pode ser de maneira específica, identificando as propriedades associados a genes-chaves, também chamados de *hub*, em vias ou nos processos biológicos (DILEO et al., 2011).

Segundo Toledo et al. (2013) os genes hub podem ser definidos como aqueles que possuem um número grande de ligações com outros genes, e estão relacionados com várias vias metabólicas importantes. Esses genes apresentam papéis reguladores nas redes de expressão gênica, além de estarem elevadamente correlacionados com um vasto número de genes (FILTEAU et al., 2013; LIM et al., 2013; KOGELMAN et al., 2014). Em bovinos da raça Nelore, genes hub, que desempenham um papel importante no sistema celular biológico de lipídios, foram preditos e tidos com reguladores principais de outros genes diferencialmente expressos para a característica de marmoreio e conteúdo de lipídios (SANTOS SILVA et al., 2019; FONSECA et al., 2020).

Em uma rede de correlação temos os *nodes* (podendo ser chamados de nós) e os *edges* (podendo ser chamados de arestas ou conexões). Os *nodes* são basicamente os genes presentes na rede ou processos biológicos, representados por pontos dentro da rede quando realizamos análises de enriquecimento, já os *edges* são as conexões que esses processos, ou esses genes, apresentam e estão ligados dentro da própria rede. A partir do número de *edges* podemos determinar o nível que os genes estão correlacionados entre si.

4. MATERÍAIS E MÉTODOS

4.1. Genes candidatos oriundos de uma análise sistemática

Os genes estudados neste trabalho são provenientes de uma revisão sistemática realizada por (CORRÊA et al., 2022). Segundo Corrêa et al. (2022), para a revisão sistemática foi realizada uma busca de artigos utilizando ferramentas como o Google Scholar e o PubMed com as seguintes combinações de termos “Genes Nelore expressos diferencialmente”, “RNA-Seq Nelore” e “Transcriptomics Nelore”.

Os critérios estabelecidos para os artigos inseridos na revisão foram os seguintes: (i) Estudo com bovinos Nelore. (ii) Estudos aplicando análise de transcriptoma de RNA-Seq. (iii) Estudos identificando genes diferencialmente expressos associados as características de produção, carcaça e carne. Os genes diferencialmente expressos foram agrupados da seguinte forma: Grupo 1 – produção (escore de condição corporal e consumo de ração residual) Grupo 2 – carcaça (espessura de gordura e área de olho de lombo) Grupo 3 – qualidade de carne (ácido graxo, teor de gordura intramuscular, concentração de minerais, maciez, índice de fragmentação miofibrilar e marmoreio). Para a realização deste trabalho, foram utilizados apenas os genes (N=222) em comum para o Grupo 3 (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes diferencialmente expressos em comum para as características de qualidade da carne, relativos ao grupo 3.

Símbolo do Gene	Nome do Gene
ABCC5	ATP binding cassette subfamily C member 5 (ABCC5)
ABRA	actin binding Rho activating protein (ABRA)
ADAMTS20	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 20 (ADAMTS20)
AGTPBP1	ATP/GTP binding carboxypeptidase 1 (AGTPBP1)
AIMP2	aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 2(AIMP2)
AKAP9	A-kinase anchoring protein 9(AKAP9)
AKT1S1	AKT1 substrate 1 (AKT1S1)
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3 (AMPD3)
ANGPT1	angiopoietin 1 (ANGPT1)
ANK3	ankyrin 3 (ANK3)
ANKRD2	ankyrin repeat domain 2 (ANKRD2)
ANKRD52	ankyrin repeat domain 52 (ANKRD52)
APOL3	apolipoprotein L, 3 (APOL3)
APOL3	apolipoprotein L, 3 (APOL3)
AQP4	aquaporin 4 (AQP4)
ARID5B	AT-rich interaction domain 5B (ARID5B)
ASB12	ankyrin repeat and SOCS box containing 12 (ASB12)
ASB5	ankyrin repeat and SOCS box containing 5 (ASB5)
ATOH8	atonal bHLH transcription factor 8 (ATOH8)
ATP1A1	ATPase Na+/K+ transporting subunit alpha 1 (ATP1A1)
AVPI1	arginine vasopressin induced 1 (AVPI1)
B3GALNT2	beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2)
BANK1	B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 (BANK1)
BDH1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1 (BDH1)
BLA-dqb	MHC class II antigen (BLA-DQB)
BMP1	bone morphogenetic protein 1 (BMP1)
BOLA	major histocompatibility complex, class I, A (BoLA)
C28H10orf116	Adipogenesis Regulatory Factor (ADIRF)
C7	complement C7 (C7)
C9orf172	Apical Junction Component 1 Homolog (AJM1)
CACNA2D2	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 2 (CACNA2D2)
CACNG7	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 7 (CACNG7)
CAV3	caveolin 3 (CAV3)

CCL1	C-C motif chemokine ligand 1 (CCL1)
CDON	cell adhesion associated, oncogene regulated(CDON)
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1)
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta (CEBPD)
CHI3L1	chitinase 3 like 1(CHI3L1)
CIB2	calcium and integrin binding family member 2 (CIB2)
CISH	cytokine inducible SH2 containing protein(CISH)
CLDN5	claudin 5 (CLDN5)
CNN1	calponin 1 (CNN1)
CNN2	calponin 2 (CNN2)
COL15A1	collagen type XV alpha 1 chain (COL15A1)
COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain (COL18A1)
COL5A3	collagen type V alpha 3 chain (COL5A3)
CPXM1	carboxypeptidase X, M14 family member 1 (CPXM1)
CSRP3	cysteine and glycine rich protein 3 (CSRP3)
CYP4B1	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1 (CYP4B1)
DAB2	DAB adaptor protein 2 (DAB2)
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2)
DIXDC1	DIX domain containing 1 (DIXDC1)
DMPK	DM1 protein kinase (DMPK)
DOC2G	double C2 domain gamma (DOC2G)
ECM2	extracellular matrix protein 2 (ECM2)
EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)
ELN	Elastin (ELN)
ELTD1	Adhesion G Protein-Coupled Receptor L4 (ADGRL4)
EME2	essential meiotic structure-specific endonuclease subunit2 (EME2)
ENSBTAG00000006182	ENSBTAG00000006182 pseudogene
ENSBTAG00000027962	ENSBTAG00000027962
ENSBTAG00000032057	ENSBTAG00000032057
ENSG00000202198	7SK (promoter - enhancer)
ESF1	ESF1 nucleolar pre-rRNA processing protein homolog (ESF1)
ESRRG	estrogen related receptor gamma (ESRRG)
F1MPT3	F1MPT3
FABP5	fatty acid binding protein 5 (FABP5)
FAM129A	Niban Apoptosis Regulator 1 (NIBAN)
FAM131A	family with sequence similarity 131 member A (FAM131A)
FAM134B	Reticulophagy Regulator 1 (RETREG1)
FAM184A	family with sequence similarity 184 member A (FAM184A)
FEM1C	fem-1 homolog C (FEM1C)
FKBP5	FKBP prolyl isomerase 5 (FKBP5)

FMOD	Fibromodulin (FMOD)
FNDC4	fibronectin type III domain containing 4 (FNDC4)
FOXO1	forkhead box O1(FOXO1)
FXR2	FMR1 autosomal homolog 2(FXR2)
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible alpha (GADD45A)
GFPT2	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2)
GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase subunits alpha and beta (GNPTAB)
GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase 1 (GPCPD1)
GPS2	G protein pathway suppressor 2 (GPS2)
GYPC	glycophorin C (GYPC)
HBB	hemoglobin, beta (HBB)
HDAC11	histone deacetylase 11 (HDAC11)
HGH1	HGH1 homolog (HGH1)
HMOX1	heme oxygenase 1 (HMOX1)
HPCAL4	hippocalcin like 4 (HPCAL4)
HSPA6	heat shock protein family A (Hsp70) member 6 (HSPA6)
HSPB8	heat shock protein family B (small) member 8 (HSPB8)
HSPH1	heat shock protein family H (Hsp110) member 1 (HSPH1)
IER3	immediate early response 3 (IER3)
IER5	immediate early response 5 (IER5)
IFI6	interferon alpha inducible protein 6 (IFI6)
ISG15	ISG15 ubiquitin like modifier (ISG15)
ISOC2	isochorismatase domain containing 2 (ISOC2)
ITGB1BP2	integrin subunit beta 1 binding protein 2 (ITGB1BP2)
ITIH4	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4)
JAM2	junctional adhesion molecule 2 (JAM2)
JMJD1C	jumonji domain containing 1C (JMJD1C)
JSRP1	junctional sarcoplasmic reticulum protein 1 (JSRP1)
KCNC4	potassium voltage-gated channel subfamily C member4 (KCNC4)
KCNQ4	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 4 (KCNQ4)
KERA	Keratocan (KERA)
KIAA1671	KIAA1671 (KIAA1671)
KIAA2013	KIAA2013 ortholog (KIAA2013)
KLHL21	kelch like family member 21 (KLHL21)
LBH	LBH regulator of WNT signaling pathway (LBH)
LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (LCP1)
LMF1	lipase maturation factor 1 (LMF1)
LOC100848684	uncharacterized LOC100848684 (LOC100848684)
LOC104973907	LOC104973907
LUM	Lumican (LUM)
MAFF	MAF bZIP transcription factor F (MAFF)
MAOB	monoamine oxidase B (MAOB)

MAP1B	microtubule associated protein 1B (MAP1B)
MAPKAPK2	MAPK activated protein kinase 2 (MAPKAPK2)
MDFIC	MyoD family inhibitor domain containing (MDFIC)
MED25	mediator complex subunit 25 (MED25)
MFSD8	major facilitator superfamily domain containing 8 (MFSD8)
MGC148692	Capping Protein Inhibiting Regulator Of Actin Dynamics (CRACD)
MGLL	monoglyceride lipase (MGLL)
MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2 (MICAL2)
MLF1	myeloid leukemia factor 1 (MLF1)
MMP2	matrix metallopeptidase 2 (MMP2)
MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6 (MRPS6)
MT1A	metallothionein-1A (MT1A)
MT2	Metallothionein 2
MT2A	metallothionein 2A (MT2A)
MX1	MX dynamin like GTPase 1 (MX1)
MXRA5	matrix remodeling associated 5 (MXRA5)
MYBPH	myosin binding protein H (MYBPH)
MYH10	myosin heavy chain 10 (MYH10)
MYLK3	myosin light chain kinase 3 (MYLK3)
MYOF	Myoferlin (MYOF)
MYOM3	myomesin 3 (MYOM3)
NDUFS6	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit S6 (NDUFS6)
NEDD4	NEDD4 E3 ubiquitin protein ligase (NEDD4)
NFIB	nuclear factor I B (NFIB)
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2 (NFKB2)
NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 (NIPSNAP1)
NOV	Cellular Communication Network Factor 3 (CCN3)
NPDC1	neural proliferation, differentiation and control 1 (NPDC1)
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4 group A member 2 (NR4A2)
NRAP	nebulin related anchoring protein (NRAP)
NT5DC3	5'-nucleotidase domain containing 3 (NT5DC3)
OPRD1	opioid receptor delta 1 (OPRD1)
OTUD1	OTU deubiquitinase 1 (OTUD1)
P4HA3	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3 (P4HA3)
PADI2	peptidyl arginine deiminase 2 (PADI2)
PCDH18	protocadherin 18 (PCDH18)
PDE4D	phosphodiesterase 4D (PDE4D)
PERP	p53 apoptosis effector related to PMP22 (PERP)
PGM2L1	phosphoglucomutase 2 like 1 (PGM2L1)
PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2 (PHTF2)
PKDCC	protein kinase domain containing, cytoplasmic (PKDCC)
PLEKHA4	pleckstrin homology domain containing A4 (PLEKHA4)

PLEKHH3	pleckstrin homology, MyTH4 and FERM domain containing H3 (PLEKHH3)
PLIN2	perilipin 2 (PLIN2)
PLIN5	perilipin 5 (PLIN5)
PMP22	peripheral myelin protein 22 (PMP22)
PON3	paraoxonase 3 (PON3)
POSTN	Periostin (POSTN)
PPFIBP2	PPFIA binding protein 2 (PPFIBP2)
PPP1R27	protein phosphatase 1 regulatory subunit 27 (PPP1R27)
PRND	prion like protein doppel (PRND)
RAB11FIP3	RAB11 family interacting protein 3 (RAB11FIP3)
RANGAP1	Ran GTPase activating protein 1 (RANGAP1)
RAPSN	receptor associated protein of the synapse (RAPSN)
RCAN1	regulator of calcineurin 1 (RCAN1)
RFX2	regulatory factor X2 (RFX2)
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa (RGS2)
RGS2	regulator of G protein signaling 2 (RGS2)
RNF115	ring finger protein 115 (RNF115)
RNF128	ring finger protein 128 (RNF128)
ROCK2	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2)
RPL36	ribosomal protein L36 (RPL36)
RPS15	ribosomal protein S15 (RPS15)
RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase A3 (RPS6KA3)
RRAD	RRAD, Ras related glycolysis inhibitor and calcium channel regulator (RRAD)
RUNX1	RUNX family transcription factor 1 (RUNX1)
RYR3	ryanodine receptor 3 (RYR3)
S100B	S100 calcium binding protein B (S100B)
SCN3B	sodium voltage-gated channel beta subunit 3 (SCN3B)
SCUBE2	signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing2 (SCUBE2)
SFRP5	secreted frizzled related protein 5 (SFRP5)
SHISA4	shisa family member 4 (SHISA4)
SLC12A7	solute carrier family 12 member 7 (SLC12A7)
SLC22A4	solute carrier family 22 member 4 (SLC22A4)
SLC7A4	solute carrier family 7 member 4 (SLC7A4)
SLK	STE20 like kinase (SLK)
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3A (SMPDL3A)
SMTNL1	smoothelin like 1 (SMTNL1)
SPOCK2	SPARC (osteonectin), cwcv and kazal like domains proteoglycan2 (SPOCK2)
SRXN1	sulfiredoxin 1 (SRXN1)
STXBP3	syntaxin binding protein 3 (STXBP3)
SURF6	surfeit 6 (SURF6)
SYS1	SYS1 golgi trafficking protein (SYS1)

SYT4	synaptotagmin 4 (SYT4)
SYTL2	synaptotagmin like 2 (SYTL2)
TBKBP1	TBK1 binding protein 1 (TBKBP1)
TFPT	TCF3 fusion partner (TFPT)
TJAP1	tight junction associated protein 1 (TJAP1)
TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3 (TMCO3)
TMUB1	transmembrane and ubiquitin like domain containing 1 (TMUB1)
TNC	tenascin C (TNC)
TNFRSF12A	TNF receptor superfamily member 12A (TNFRSF12A)
TPP1	tripeptidyl peptidase 1 (TPP1)
TRAFD1	TRAF-type zinc finger domain containing 1 (TRAFD1)
TRIM55	tripartite motif containing 55 (TRIM55)
UBA7	ubiquitin like modifier activating enzyme 7 (UBA7)
UBE2S	ubiquitin conjugating enzyme E2 S (UBE2S)
UBTD1	ubiquitin domain containing 1 (UBTD1)
UBXN6	UBX domain protein 6 (UBXN6)
UCHL1	ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1)
UCP3	uncoupling protein 3 (UCP3)
USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (USP13)
VCAN	Versican (VCAN)
VPS72	vacuolar protein sorting 72 homolog (VPS72)
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1 (WIPF1)
XIRP2	xin actin binding repeat containing 2 (XIRP2)
ZNF385C	zinc finger protein 385C (ZNF385C)
ZNF628	zinc finger protein 628 (ZNF628)

4.2. Análise de co-expressão e enriquecimento

A análise de enriquecimento foi realizada para os genes comuns para as características descritas no Grupo 3, por meio do aplicativo ClueGO (BINDEA et al., 2009), implementado no *software* Cytoscape v3.8.2 (SHANNON et al., 2003), que gera redes de interação biomoleculares facilitando a compreensão e visualização dos resultados.

As redes de co-expressão foram geradas por meio do Cytoscape v.3.8.2 e do *plugin* GeneMania (MONTOJO et al., 2010). Com o aplicativo NetworkAnalyzer (ASSENOV et al., 2008) foram calculadas as métricas de rede (número de *nodes* e *edges* para cada gene). O aplicativo Centiscape (SCARDONI et al., 2009) foi usado para determinar o grau de distribuição e centralidade de intermediação, empregados como métrica global para identificar os quatro principais genes *hub*.

5. RESULTADOS

A partir dos genes comuns para as características de qualidade da carne, foram enriquecidos 78 termos (processos biológicos), dentre eles, 30 foram considerados significativos (FDR<0,05). A figura 1 mostra a rede dos processos biológicos, gerada a partir do ClueGO. A tabela 2 mostra os GOterms significativos para processos biológicos e seus genes associados encontrados.

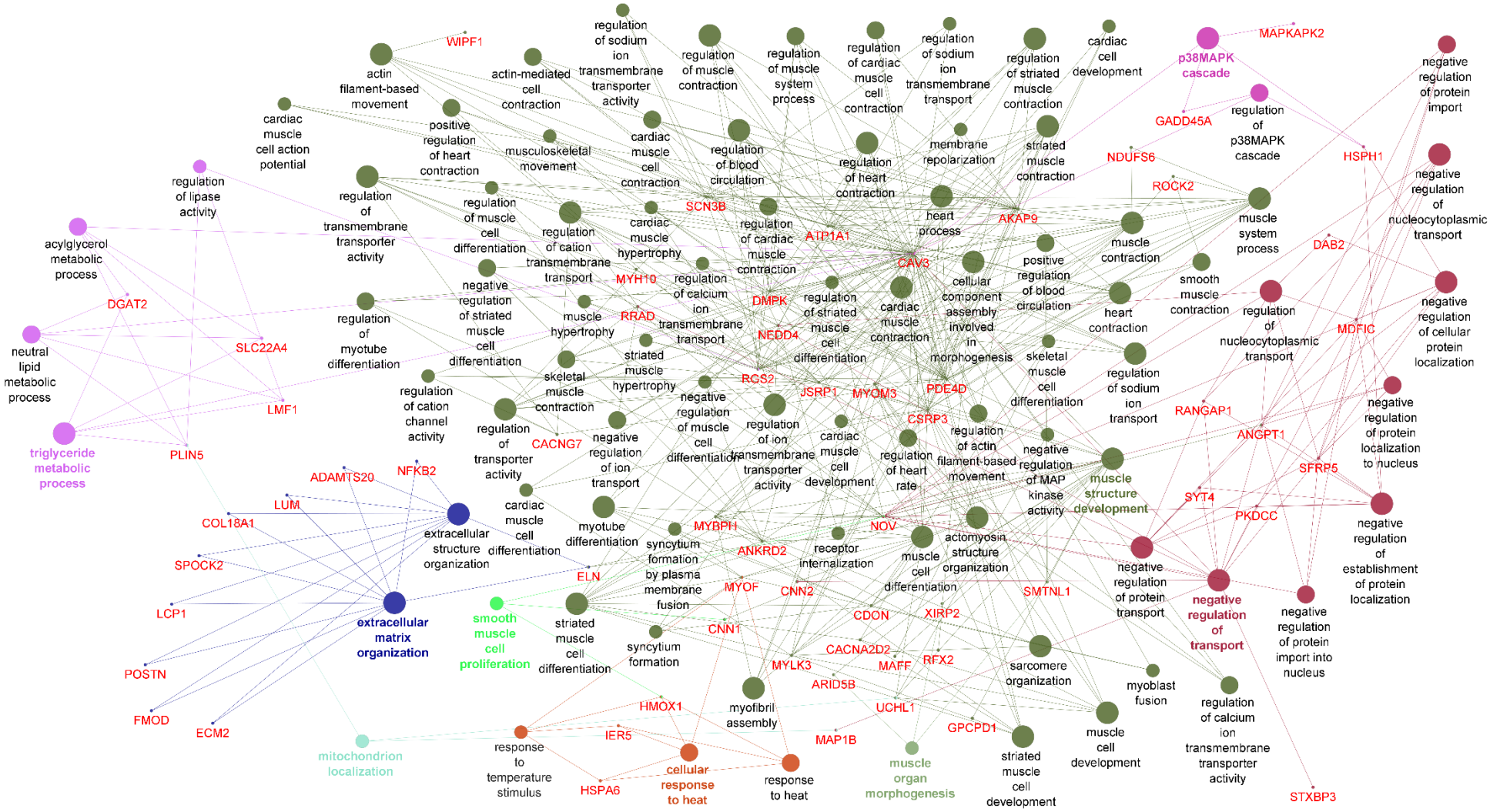

Figura 1. Redes de processos biológicos e seus genes associados para características de qualidade de carne em bovinos Nelore.

Legenda - Os *nodes* (nós) seguem as seguintes distribuições relacionados as cores: Azul escuro - Processos biológicos relacionados com a matriz extracelular; Ciano - Processo biológico relacionado com a localização mitocondrial; Verde escuro - Processos biológicos relacionados com os músculos e corrente sanguínea; Verde claro - Processo biológico relacionado com proliferação de celulares musculares lisas; Laranja - Processos biológicos relacionados com a resposta celular ao calor; Rosa escuro - Processo biológico ligado a cascata p38MAPK; Rosa claro - Processo biológico relacionado com o metabolismo lipídico e dos triglicerídeos; Vermelho escuro - Processos biológicos relacionados com a regulação negativa de transporte.

Tabela 2 – GOTerms para processos biológicos significativos e seus genes associados.

GoTerm	**Genes associados encontrados**	**FDR (<0,05)**
Contração muscular estriada (GO:0006941)	*[AKAP9, ATP1A1, CAV3, CSRP3, DMPK, JSRP1, MYBPH, MYOM3, PDE4D, RGS2, SCN3B]*	0,00
Contração muscular (GO:0006936)	*[AKAP9, ATP1A1, CAV3, CSRP3, DMPK, JSRP1, MYBPH, MYOM3, NDUFS6, PDE4D, RGS2, ROCK2, SCN3B]*	0,00
Diferenciação de células musculares estriadas (GO:0051146)	*[ANKRD2, CACNA2D2, CAV3, CDON, CSRP3, DMPK, MYBPH, MYLK3, MYOF, MYOM3, NOV, UCHL1]*	0,00
Desenvolvimento da estrutura muscular (GO:0061061)	*[ANKRD2, ARID5B, CACNA2D2, CAV3, CDON, CSRP3, DMPK, ELN, GPCPD1, MAFF, MYBPH, MYLK3, MYOF,*	0,00

	MYOM3, NOV, SMTNL1, UCHL1, XIRP2]	
Organização de matriz extracelular (GO:0030198)	*[ADAMTS20, COL18A1, ECM2, ELN, FMOD, LCP1, LUM, NFKB2, POSTN, SPOCK2]*	0,00
Regulação negativa do transporte (GO:0051051)	*[ANGPT1, CAV3, CNN2, MAP1B, MDFIC, NEDD4, NOV, PKDCC, RAB11FIP3, RANGAP1, RRAD, SFRP5, STXBP3, SYT4]*	0,00
Regulação da contração muscular estriada (GO:0006942)	*[AKAP9, ATP1A1, CAV3, DMPK, PDE4D, RGS2]*	0,00
Organização da estrutura actomiosina (GO:0031032)	*[CAV3, CNN1, CNN2, CSRP3, ELN, MYBPH, MYH10, MYLK3, MYOM3]*	0,01
Processo metabólico dos triglicerídeos (GO:0006641)	*[CAV3, DGAT2, LMF1, PLIN5, SLC22A4]*	0,04
Regulação da circulação sanguínea (GO:1903522)	*[AKAP9, ATP1A1, CAV3, CSRP3, DMPK, PDE4D, RGS2, SCN3B, SMTNL1]*	0,01

Regulação negativa do estabelecimento de localização de proteínas (GO:1904950)	*[ANGPT1, HSPH1, MDFIC, NOV, PKDCC, RAB11FIP3, RANGAP1, SFRP5, SYT4]*	0,01
Movimento baseado em filamentos actina (GO:0030048)	*[AKAP9, CAV3, MYH10, PDE4D, SCN3B, WIPF1]*	0,01
Regulação da atividade de transporte transmembrana de íons (GO:0032412)	*[AKAP9, CACNG7, CAV3, JSRP1, NEDD4, PDE4D, RRAD, SCN3B]*	0,01
Desenvolvimento de células musculares estriadas (GO:0055002)	*[CACNA2D2, CAV3, CSRP3, MYBPH, MYLK3, MYOM3, UCHL1]*	0,02
Montagem de componentes celulares envolvidos na morfogênese (GO:0010927)	*[CAV3, CSRP3, MYBPH, MYLK3, MYOM3, RFX2]*	0,02
Regulação negativa da localização da proteína celular (GO:1903828)	*[ANGPT1, DAB2, HSPH1, MDFIC, NOV, PKDCC, SFRP5]*	0,02
Cascata p38MAPK (GO:0038066)	*[CAV3, GADD45A, HSPH1, MAPKAPK2]*	0,02
Contração muscular cardíaca (GO:0060048)	*[AKAP9, CAV3, CSRP3, PDE4D, RGS2, SCN3B]*	0,03

Resposta celular ao calor (GO:0034605)	*[HMOX1, HSPA6, IER5, MYOF]*	0,03
Diferenciação do miotubo (GO:0014902)	*[ANKRD2, CAV3, CDON, DMPK, MYOF, NOV]*	0,03
Regulação negativa do transporte nucleocitoplasmático (GO:0046823)	*[ANGPT1, MDFIC, NOV, RANGAP1, SFRP5]*	0,03
Regulação do transporte de íons de sódio (GO:0002028)	*[ATP1A1, CAV3, DMPK, NEDD4, SCN3B]*	0,03

Por meio da análise de co-expressão (Figura 2) foram encontrados 2299 nós (*nodes*) e 16672 conexões (*edges*). Dentre todos os nodes, três não apresentaram conexões: *MFSD8*, *SYS1* e *ZNF385C*.

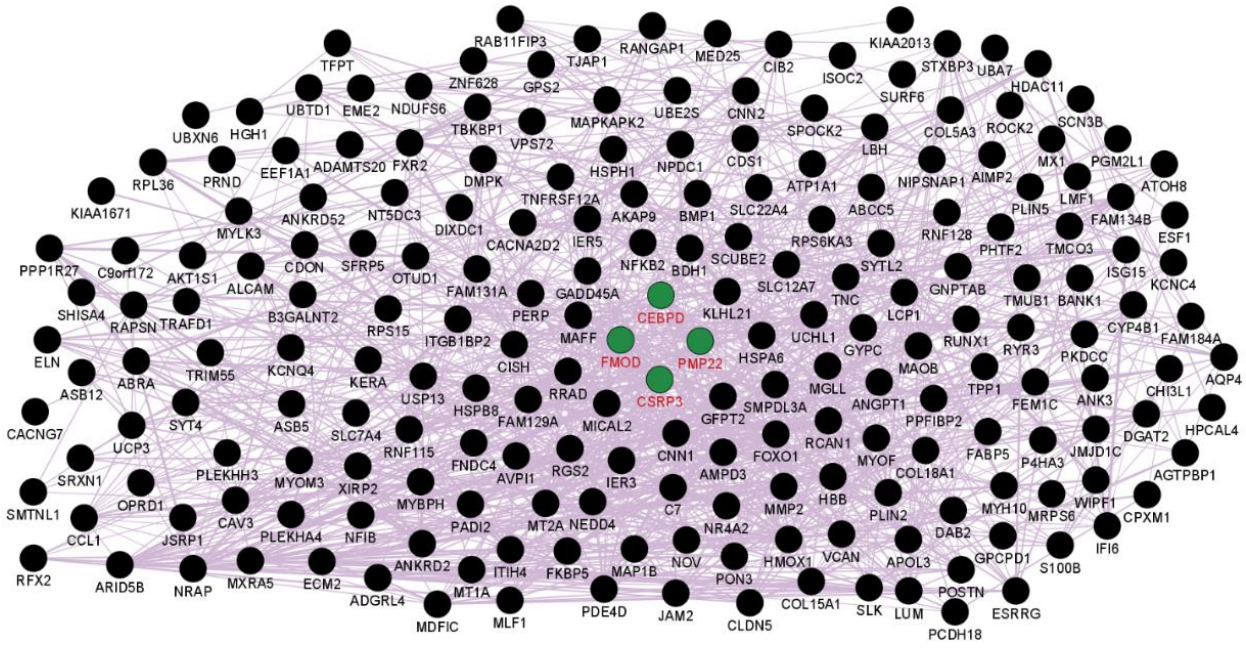

Figura 2 – Rede obtida pela análise de co-expressão com os 222 genes comuns para características de qualidade da carne, em destaque os genes preditos como *hub*.

Os genes *Hub* foram preditos por meio das métricas globais topológicas de distribuição e centralidade de intermediação. A Figura 3 mostra todos os genes, destacando 4 deles que foram preditos como *hub*, são eles os genes *CSRP3*, *PMP22*, *FMOD* e *CEBPD*.

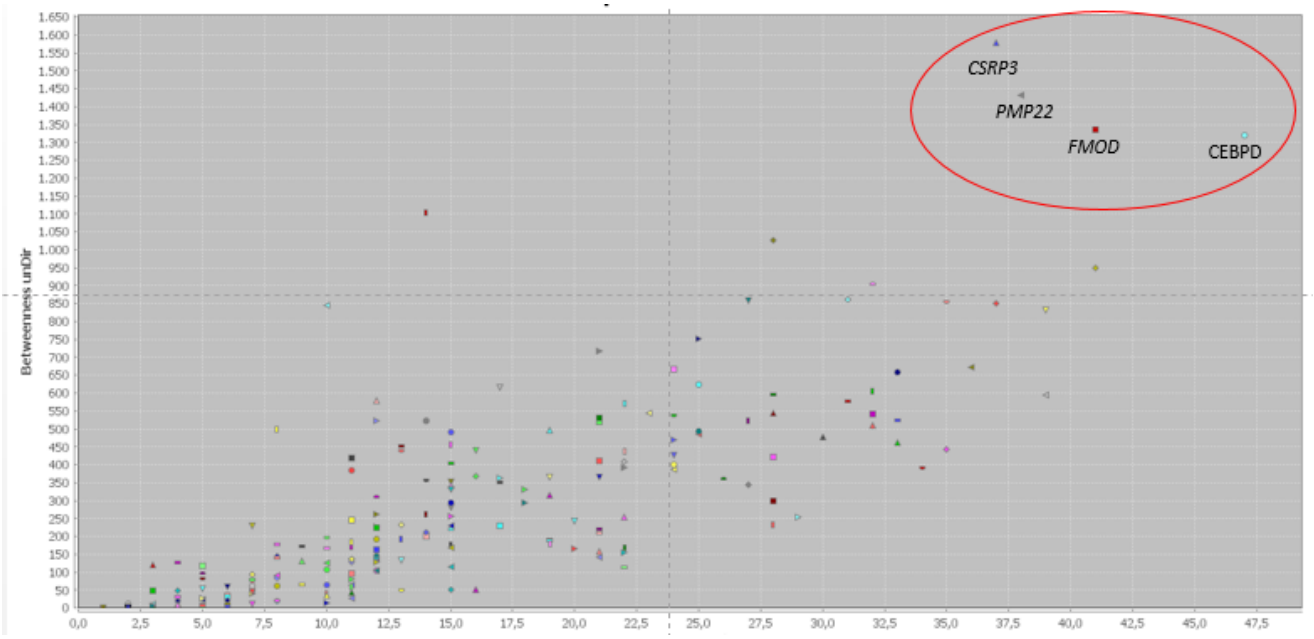

Figura 3 – Genes hub (*CSRP3*, *PMP22*, *FMOD* e *CEBPD*), em destaque, identificados por meio das métricas globais topológicas grau de distribuição (eixo x) e centralidade de intermediação (eixo y).

6. DISCUSSÃO

Os primeiros genes a serem discutidos possuem papel importante para o metabolismo dos lipídios, gliconeogênese, ação da insulina no metabolismo de carboidratos e lipídios e organização da matriz extracelular. Seguido pelos genes e processos biológicos ligados ao músculo (desenvolvimento, diferenciação e contração) e ao metabolismo muscular. Após essa parte foi discutido os genes ligados aos processos biológicos da regulação da corrente sanguínea e metabolismo dos triglicerídeos, finalizando com a discussão dos genes que foram preditos como *hub*.

Os genes *FOXO1* e *NFKB2* desempenham papel importante no metabolismo lipídico. O gene *FOXO1* segundo Sparks e Dong (2009) e posteriormente Li et al. (2014) desempenha papel dentro das vias hepáticas de lipídios e lipoproteínas, sendo assim considerado um dos principais genes na regulação e coordenação da ação da insulina tanto no metabolismo de lipídios quanto para carboidratos. Além disso Xing et al. (2018) evidenciaram que o gene *FOXO1* está envolvido na apoptose e autofagia, regulação do sistema imune, enzimas antioxidantes, sendo importante para o metabolismo lipídico dos bovinos da raça Nelore. Já o gene *NFKB2* de acordo com Santos Silva et al. (2019) pode afetar toda a modulação do metabolismo lipídico de bovinos. Neste trabalho, este gene foi associado com processos biológicos relacionados à organização da matriz extracelular (GO:0030198). A matriz extracelular é componente que une as células para montagem, arranjo de partes constituintes ou desmontagem dos tecidos. Sendo assim esses dois genes podem estar relacionados com as características de teor de ácidos graxos e teor de gordura intramuscular, consequentemente podem afetar o marmoreio da carne.

Também foram encontrados processos biológicos relacionados ao músculo, como contração muscular (GO:0006942); diferenciação de células musculares estriadas (GO:0051146); desenvolvimento de células musculares estriadas (GO:0055002); contração

do músculo cardíaco (GO:0060048) e desenvolvimento da estrutura muscular (GO:0061061). Todos esses processos são de extrema importância para o desenvolvimento e crescimento do tecido muscular, principalmente o tecido esquelético, cujo desenvolvimento é complexo, visto que envolve, além das células contráteis do músculo, a expansão da matriz extracelular (MUKUNDU & SUBRAMANIAM 2020). Sendo assim os genes presentes nesses processos biológicos podem afetar diretamente o desenvolvimento do músculo e isso afetará a maciez da carne pós o processo de *post-mortem*.

Dentre os genes que apareceram com mais frequência nos termos relacionados ao metabolismo muscular, *CAV3*, *CSRP3*, *PDE4D*, *RGS2* e *AKAP9*, apresentam papéis importantes para o desenvolvimento de características de carne, pois estão relacionados à crescimento e desenvolvimento muscular, contração do músculo cardíaco e regulação da corrente sanguínea (BHUIYAN et al., 2007; JIANG et al., 2009; SEVANE et al., 2014). O gene *CAV3*, presente em todos os termos relacionados ao metabolismo muscular, de acordo com Oliveira et al. (2016) atua como miRNAs diferencialmente expressos para ácidos graxos em bovinos de corte, e podem influenciar em outros processos biológicos como adipogênese e na deposição de gordura na carne. O gene *PDE4D*, desempenha papel em vários processos biológicos relacionados ao metabolismo muscular (CONTI et al., 2002). Esse gene codifica a fosfodiesterase, enzima responsável por hidrolisar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), mensageiros intramusculares responsáveis por mediar respostas a vários hormônios e neurotransmissores. Este gene já foi associado à regulação hormonal da foliculogênese nos bovinos (MAXIME SASSEVILLE et al., 2009). Santos Silva et al. (2019) indicaram o gene *PDE4D* como *hub* na análise da rede de co-expressão gênica para a característica de gordura intramuscular em bovinos Nelore.

O termo regulação da corrente sanguínea (GO:1903522), apresentou os seguintes genes associados: *AKAP9*, *ATP1A1*, *CAV3*, *CSRP3*, *DMPK*, *PDE4D*, *RGS2*, *SCN3B* e *SMTNL1*. O

período de 24 horas após o abate do animal, interfere de forma direta na conversão do músculo em carne e nesse intervalo de tempo ocorre diversos eventos bioquímicos (KOOHMARAIE 1995). Durante os estágios iniciais pós-morte, os níveis de ATP se mantêm constantes devido a conversão de ADP mais fosfocreatina em ATP, porém o suprimento de oxigênio vai ser interrompido devido a cessação da circulação sanguínea. Durante esse período ocorre o início da fase de *rigor mortis*, na qual, ácido lático é produzido de forma anaeróbica por meio da glicólise, causando a diminuição do pH. Com a diminuição das reservas de glicogênio e outros carboidratos, diminui-se o ATP nesta etapa e assim há liberação de íons cálcio no espaço miofibrilar, encurtando o músculo e tendo assim influência direta na característica de maciez da carne (BENDALL 1973). Além desses, o gene *KLHL*, de acordo com Dhanoa et al. (2013), exerce um vasto papel em processos celulares, como supressão transcricional, organização de citoesqueleto e direcionamento das proteínas para ubiquitinação, processos diretamente associados com as alterações post-mortem e consequentemente atuam no processo de amaciamento da carne.

Os genes *CAV3*, *DGAT2*, *LMF1*, *PLIN5* e *SLC22A4* foram enriquecidos para o processo metabólico dos triglicerídeos (GO:0006641). Os triglicerídeos são moléculas utilizadas para o armazenamento das gorduras no tecido animal e podem ser sintetizados, principalmente no fígado, tecido adiposo, intestino, no entanto, segundo Cherian (2021) a maioria das células podem realizar sua síntese. Um triglicerídeo se forma a partir de um glicerol que está ligado com três ácidos graxos, sendo classificados como saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. As gorduras que estão presentes na carne bovina são ricas pelos ácidos graxos poli-insaturados que mantém participação em vários processos biológicos pertinentes para a saúde humana (ALEX et al., 2011).

Dentre os genes estudos, *CSRP3* foi o mais enriquecido, apresentando maior frequência nos processos biológicos significativos (n=8). Esse gene apresentou significância nos

seguintes processos biológicos: regulação da força de contração do coração (GO:0002026); hipertrofia do músculo cardíaco (GO:0003300); desenvolvimento do tecido muscular esquelético (GO:0007519); localização de proteínas em organelas (GO:0033365); detecção de estiramento muscular (GO:0035995); desenvolvimento do tecido muscular cardíaco (GO:0048738); montagem de miofibrilas cardíacas (GO:0055003) e contração do músculo cardíaco (GO:0060048). Além de desempenhar esse vasto número de processos biológicos, através das análises deste trabalho ficou evidenciado que o gene *CSRP3* foi classificado como gene *hub*.

O *CSRP3* já apresentou ter papéis importantes para o desenvolvimento da gordura intramuscular em bovinos Nelore (CESAR et al., 2015; BERTON et al., 2016; SILVA-VIGNATO et al., 2017; SANTOS SILVA et al., 2020). Além disso, segundo He et al. (2014) o gado Quinchuan, de origem chinesa, apresenta SNVs (variantes únicas de nucleotídeos) em todos os íntrons e éxons do gene *CSRP3* e padrões de expressão tecidual (qRT-PCR) altamente significativos associados com as características de carcaça na população de Quinchuan.

O gene *FMOD*, também predito como *hub*, foi associado ao termo de expansão da matriz extracelular (GO:0030198). De acordo com Afondo et al. (2020) este gene está ligado a infra regulação dos seguintes: cálcio, cobre, selênio e sódio em grupos de mineral alto em relação aos grupos de mineral baixo. O transporte de íons na matriz celular é realizado contra o gradiente de concentração, ou seja, necessita de ATP para que ocorra. Conforme já explicado acima, com a cessão da corrente sanguínea *post-mortem*, diminui o aporte de oxigênio, levando a glicólise, diminuição do ATP e acúmulos de íons cálcio, o que está diretamente relacionado ao *rigor mortis* e ao processo de transformação de músculo em carne.

O gene *PMP22* também foi predito como *hub*. Apesar de não ter sido enriquecido para nenhum GO term, de acordo com Santos Silva et al. (2020), em bovinos Nelore, ele foi mais expresso em grupo de animais com maior deposição de gordura intramuscular, tendo sua

função atrelada ao metabolismo de lipídios. O gene *CEBPD* predito como *hub*, assim como o *PMP22* não foi enriquecido, contudo Arivarathe et al. (2021) mostraram que esse gene está relacionado com percentual de gordura no leite em vacas holandesas, Jersey e meio sangue (H/J). Ainda nesse estudo, o gene *CEBPD* está relacionado com processo biológico de diferenciação das células adiposas, ligado à síntese de gordura e o seu armazenamento, indicando sua relação com a deposição de gordura em tecidos e uma possível relação com o marmoreio da carne.

Portanto todos os genes diferencialmente expressos comuns e genes hub encontrados neste trabalho para as características avaliadas, como teor de ácidos graxos, teor de gordura intramuscular (método químico e visual – marmoreio), concentração minerais, maciez (índice de fragmentação miofibrilar e *shear force*) participam diretamente de uma espessa rede de processos biológicos envolvendo principalmente metabolismo muscular, proteico, lipídico, triglicerídeo e de carboidratos, além de regulação da corrente sanguínea e expansão de matriz extracelular. Essas informações são primordiais para compreender as complexidades das características e como elas estão co-expressas entre si. Todos os genes destacados podem ser considerados candidatos e assim contribuírem para programas de seleção de bovinos Nelore para qualidade da carne.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam os genes comuns diferencialmente expressos encontrados para as características de qualidade de carne para bovinos da raça Nelore e como eles estão associados entre si. Esses genes, de modo geral, desempenham significativos papéis nos processos biológicos, tais como metabolismo lipídico e proteico, processo de contração e desenvolvimento muscular, regulação da corrente sanguínea e processo metabólico dos triglicerídeos. Além disso o estudo evidenciou quatro genes hub que estão diretamente relacionados com alguns processos biológicos e consequentemente as características de interesse econômico. Os genes parecem atuar de forma pleiotrópica sobre as características estudadas e que apresentam grande valor econômico agregado. Juntando todas as informações obtidas e futuros estudos para melhorar o entendimento das características e seus genes associados, podem ser muito úteis para o desenvolvimento estratégico de novos programas de seleção para bovinos Nelore e consequentemente aumentar a produtividade do rebanho e a produção nacional de carne.

RESUMO

Com o Brasil sendo um dos destaques em âmbito mundial pela exportação de carne bovina, a busca pelo melhoramento de características de qualidade de carne, como maciez, marmoreio, entre outros, vem sendo cada vez maior, uma vez que o mercado internacional tem grande exigência com relação a esses atributos. Nesse sentido, vários trabalhos visando o entendimento dos genes expressos relacionados à essas características têm sido desenvolvidas na raça Nelore. Sendo assim, a partir de artigos e estudos prévios que utilizaram a técnica de RNA-Seq, o presente estudo teve como objetivo buscar genes diferencialmente expressos em comum para características de qualidade de carne em bovinos Nelore e realizar análise de enriquecimento funcional e co-expressão afim de predizer genes *hub* para essas características. Ao todo 222 genes foram encontrados para as características de carne e a partir desses foram enriquecidos 78 termos, sendo 30 considerados significativos (FDR<0,05). Todos os genes diferencialmente expressos comuns e genes *hub* encontrados neste trabalho para as características avaliadas, participam diretamente de uma espessa rede de processos biológicos envolvendo principalmente metabolismo muscular, proteico, lipídico, triglicerídeo e de carboidratos, além de expansão de matriz extracelular. Os genes encontrados, parecem atuar em processos chave relacionados as características estudadas e podem ser relacionados como candidatos à inserção em avaliações genéticas visando o aumento da qualidade da carne em bovinos Nelore.

Palavras-chave: Análises de enriquecimento, bovinos Nelore, co-expressão, genes *hub*, RNA-Seq, processos biológicos.

ABSTRACT

With Brazil being one of the highlights worldwide for the export of beef, the search for improving meat quality characteristics, such as tenderness, marbling, among others, has been increasing, since the international market has great demand. with respect to these attributes. In this sense, several studies aimed at understanding the expressed genes related to these characteristics have been developed in the Nelore breed. Therefore, based on articles and previous studies that used the RNA-Seq technique, the present study aimed to search for genes differentially expressed in common for meat quality traits in Nellore cattle and to perform functional enrichment and co-expression analysis. in order to predict hub genes for these traits. A total of 222 genes were found for meat traits and from these 78 terms were enriched, 30 of which were considered significant (FDR<0.05). All common differentially expressed genes and hub genes found in this work for the evaluated traits participate directly in a thick network of biological processes involving mainly muscle, protein, lipid, triglyceride and carbohydrate metabolism, in addition to extracellular matrix expansion. The genes found seem to act in key processes related to the characteristics studied and can be listed as candidates for insertion in genetic evaluations aimed at increasing meat quality in Nellore cattle.

Key words: Biological processes, co-expression, enrichment analyses, hub genes, Nelore cattle, RNA-Seq.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, J. Muscle transcriptome analysis reveals genes and metabolic pathways related to mineral concentration in *Bos indicus*. *Sci Rep* **9**, 12715 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-49089-x.

AFONSO, J. *et al.* Genetic regulators of mineral amount in Nelore cattle muscle predicted by a new co-expression and regulatory impact factor approach. *Sci Rep* **10,** 8436 (2020).

ALEX, H.B. *et al.* Introduction to Lipid Biochemistry, Metabolism, and Signaling. Chem. Chem Rev. 27 (2011) 5817-5820.

ALLAIS, S. *et al.* Fine mapping of quantitative trait loci underlying sensory meat quality traits in three French beef cattle breeds. Journal Animal Science, 2014; (92):4329-4341.

ALVES, D. D. *et al.* Maciez da Carne Bovina. Ciência Animal Brasileira, 2005 jul/set; 6(3): 135-149.

AOKI, K.; Ogata, Y.; Shibata, D. Approaches for extracting pratical information from gene co-expression networks in plant biology. Plant Cell Physiology, Kyoto, JPN, v. 48, n. 3, p.381-390, Mar. 2007.

ARIYARATHNE, H.B.P.C. *et al.* Identification of Genomic Regions Associated with Concentrations of Milk Fat, Protein, Urea and Efficiency of Crude Protein Utilization in Grazing Dairy Cows. Genes (Basel). 2021 Mar 23;12(3):456. doi: 10.3390/genes12030456. PMID: 33806889; PMCID: PMC8004844.

ASSENOV, Y. *et al.* Computing topological parameters of biological networks Bioinformatics, 15 (24) (2008), pp. 282-284.

BADAOUI, B. *et al.* (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (Apis mellifera) infected with Nosema ceranae. PLoS One. 12(3):e0173438.

BENDALL, JR. Posmortem changes in muscle. In: GH BOURNE, editor. The structure and function of muscle, vol. 2. New York: Academic Press; 1973. p. 244–309.

BERTON, M. P. *et al.* Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid, BMC Genomics. 972 (2016) 1-16.

BHUIYAN, M.S.A. *et al.* Analysis of SNPs in Bovine CSRP3, APOBEC2 and Caveolin Gene Family, Journal of Animal Science and Technology. 49 (2007) 719-728.

BINDEA, G. *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks, Bioinformatics, Volume 25, Issue 8, 15 April 2009, Pages 1091–1093.

BOUKHA, A. *et al.* Genetic parameters of carcass and meat quality traits of double muscled Piemontese cattle. Meat Science, 2011; (89):84-90.

BRASIL é o quarto maior produtor de grãos e o maior exportador de carne bovina do mundo. Secretaria de Inteligência e Relações Estratégicas (Sire) da Embrapa, 01 de junho de 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>. Acesso em: 2 de ago. de 2022.

CÁNOVAS, Q. M. *et al.* SNP Discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology. Mammalian Genome, New York, USA, v. 21, n. 11-12, p.592-598, Dec. 2010.

CARDOSO, T.F. *et al.* (2017). RNA-seq based detection of differentially expressed genes in the skeletal muscle of Duroc pigs with distinct lipid profiles. Sci Rep 7:40005.

CASAS, E. *et al.* Effects of calpastatin and μ-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. Journal of Animal Science, v.84, p.520-525, 2006.

CASEY, T. *et al.* (2011). Transcriptome analysis of epithelial and stromal contributions to mammogenesis in three week prepartum cows. PLoS One 6(7):e22541.

CASTRO, L.M. *et al.* Quantitative genetic analysis for meat tenderness trait in Polled Nellore cattle. Revista Ciência Agronômica, abr-jun, 2014; 45(2): 393-402.

CESAR, A. S. M. *et al.* Differences in the skeletal muscle Transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids contente, BMC Genomics. 17 (2016) 1-16.

CESAR, A. S. M. *et al.* Putative regulatory factors associated with intramuscular fat contente. Plos One, San Francisco, USA, v. 10, n. 6, p. 1-21, Jun. 2015.

CHERIAN, G. A Guide to the Principles of Animal Nutrition. (2021).

CIRULLI, E. *et al.* Screening the human exome: a comparison of whole genome and whole transcriptome sequencing. Genome Biology, London, GBR, v. 11, n. 57, p. 57-64, May. 2010.

CLOONAN, N. *et al.* Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. Nature Methods, London, GBR, v. 5, n. 7, p. 613-619, Jul. 2008.

CONTI, M. *et al.* Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. Molecular and cellular endocrinology, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 2002.

CORRÊA, M. S. L. *et al*. Análise integrativa de dados multi-ômicos para descoberta de eqtls e estudos funcionais de genes associados à características de importância econômica de bovinos nelore. Tese de doutorado. **Unifenas, Alfenas**, MG, 2022.

CORREIA, C.N. *et al.* (2018). RNA Sequencing (RNA-Seq) Reveals Extremely Low Levels of Reticulocyte-Derived Globin Gene Transcripts in Peripheral Blood From Horses (Equus caballus) and Cattle (Bos taurus). Front Genet. 2018;9:278.

COSTA, A. *et al.* Expression of genes controllong fat deposition in two genetically diverse beef cattle breeds fed high or low silage diets. BMC Vet. Res. 2013; 9(118): 1-16.

CUI, X. *et al.* (2017). RNA-Seq analysis on chicken taste sensory organs: An ideal system to study organogenesis. Sci Rep 7(1):9131.

DE SMET, S.; Raes, K.; Demeyer, D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. Animal Research, v. 53, p. 81–98, 2004.

DHANOA, B.S. *et al.* Update on the Kelch-like (KLHL) gene Family. Hum Genomics 7, 13 (2013). https://doi.org/10.1186/1479-7364-7-13.

DILEO, M. V. *et al.* Correlation Network Analysis (WGCNA) Applied to the tomato fruit metabolome. Plos One, San Francisco, USA, v. 6, n.10, p. 1-10, Oct. 2011.

DINIZ, W. J. S. *et al.* Iron Content Affects Lipogenic Gene Expression in the Muscle of Nellore Beef Cattle. Plos One. 11 (2016) 1-19.

DU, M. *et al.* Meat Science and muscle biology symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. Journal of Animal Science, 91(3), 1419-1427. 2013.

FEITOSA, F. L. B. *et al.* Genetic correlation estimates between beef fatty acid profile with meat and carcass traits in Nellore cattle finished in feedlot. Journal of Applied Genetics, v. 58.

FILTEAU, M, *et al.* Gene Coexpression networks reveal key drivers of phenotypic divergence in Lake whitefish. Mol Biol Evol. 2013;30(6):1384–96.

FONSECA, L. F. S. *et al.* Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. BMC Genomics, v. 18, n. 1, 2017. 1-12. Disponível em: http://hdl.handle.net/11449/179421.

FONSECA, L. F. S. *et al.* Gene expression profiling and identification of hub genes in Nellore cattle with different marbling score levels. Genomics. 112 (2020) 873-879.

FORTES, M.R. *et al.* (2016). Transcriptome analyses identify five transcription factors differentially expressed in the hypothalamus of post-versus prepubertal Brahman heifers. J Ani Sci. 94(9): 3693-3702.

GONÇALVES, T. M. *et al.* Gene Co-expression Analysis Indicates Potencial Pathways and Ragulators of Beef Tenderness in Nellore Cattle, Frontiers in Genetics. 9 (2018).

GRIFFITH, M. *et al.* Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. PLOS one Computacional Biology. v.6, p.1-20, 2015.

HAUSMAN, G. J. *et al.* Intermuscular and intramuscular adipose tissues: Bad vs. Good adipose tissues. Adipocytes. 3(4), 242-255. 2014.

HE, H. *et al.* Expression, SNV identification, linkage disequilibrium, and combined genotype association analysis of the muscle-specific gene CSRP3 in Chinese cattle. Gene. 2014 Feb 1;535(1):17-23. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.014. Epub 2013 Nov 23. PMID: 24279998.

HOPKINS, D.L. *et al*. (2000) A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. Meat Sci 56:19–22.

INOUE, K. *et al.* Genetic parameters for fatty acid composition and feed efficiency traits in Japanese Black cattle. Animal, v. 5, p. 987–994, 2011.

JIANG, Z. *et al.* Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle, Int J Biol Sci. 5 (2009) 528-542.

KELLY, M. J. *et al.* Genetic variation in fatty acid composition of subcutaneous fat in cattle. Animal Production Science, v. 53, p. 129–133, 2013.

KOGELMAN, L. J. A. *et. al.* Identification of co-expression gene networks, regulatory genes and pathways for obesity based on adipose tissue RNA sequencing in a porcine model. BMC Med Genet. 2014;7(1):57.

KOOHMARAIE, M. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. Proc Recip Meat Conf. 1995;48:69–75.

LADEIRA, M. M. *et al.* Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. Animal, p. 1-13, 2018.

LADEIRA, M.; *et al.* Nutrigenomics and Beef Quality: A Review about Lipogenesis. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 6, p. 918-938, 2016.

LANGFELDER, P.; Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics, London, GBR, v. 9, p. 559-571, Dec. 2008.

LI, Y. *et al.* A global perspective on FOXO1 in lipid metabolismo and lipid-related diseases. Prog. Lipid Res. 2017; 66: 42-9.

LIM, D. *et al.* Gene co-expression analysis to characterize genes related to marbling trait in Hanwoo (Korean) cattle. Asian Australas J Anim Sci. 2013;26(1):19–29.

LISTER, R. *et al.* Highly integratednsingle-base resolution maps of epigenome in Arabidopsis. Cell, Cambridge, GBR, v. 133, n. 3, p. 523-536, May. 2008.

LÔBO, R. B. *et al.* Progresso científico em melhoramento animal no Brasil na primeira década do século XXI. Revista brasileira de zootecnia (Online), v.39, p. 223-235, 2010.

MARTINS, T. S. *et al.* Molecular Factors Underlying the 38 Deposition of Intramuscular Fat and Collagen in Skeletal Muscle of Nellore and Angus Cattle. PLoS ONE, v. 10, e0139943, 2015.

MATEESCU, R.G. *et al.* Genetic parameters for sensory traits in longissimus muscle and their associations with tenderness, marbling score, and intramuscular fat in Angus cattle. Journal Animal Science, 2015; (93)21-27.

MATEESCU, R.G. *et al.* Genome-wide association study of concentrations of iron and other minerals in Longissimus dorsi muscle of Angus cattle. Journal of Animal Science, v.91, p.3593-3600, 2013.

MAXIME SASSEVILLE, F.K. *et al.* Characterization of Novel Phosphodiesterases in the Bovine Ovarian Follicle, Biology of Reproduction. 81 (2009) 415-425.

MEDRANO, J. F. *et al.* Comparative analysis of bovine milk and mammary gland transcriptome using RNA-Seq. In: WORLD CONGRESS OF GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 9., Leipzig, GER, 2010.

MEIRELLES, S. L. *et al.* Efeitos de ambiente e estimativa de parâmetros genéticos para características de carcaça em bovinos da raça Canchim criados em pastagem. Revista brasileira de zootecnia (Online), v. 39, p. 1437-1442. 2010.

MIAR Y. *et al.* (2014) Estimation of genetic and phenotypic parameters for ultrasound and carcass merit traits in crossbred beef cattle. Can J Anim Sci 94(2):273–280.

MONTOJO, J. *et al.* GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop, *Bioinformatics*, Volume 26, Issue 22, 15 November 2010, Pages 2927–2928, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq562.

MORTAZAVI, A. *et al*. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods, New York, USA, v. 5, n.7, p. 621-628, Jul. 2008.

MUKUND, K., Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 12 (2020) e1462.

MUNIZ, M. M. M. *et al.* Use of gene expression profile to identify potentially relevant transcripts to Myofibrillar Fragmentation Index trait. Functional & Integrative Genomics, v. 25, p. 1, 2020.

OLIVEIRA, P.S.N. *et al.* miRNAs related to fatty acids composition in Nellore cattle. Journal of Animal Science, supl. Supplement 5; Champaign Vol. 94, (Oct 2016): 164. DOI:10.2527/jam2016-0341.

OLIVIERI, B. F. *et al.* Differentially expressed genes identified through RNA-seq with extreme values of principal components for beef fatty acid in Nelore cattle. JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, v. 25, p. 1, 2020.

OLSON, D.G. *et al*. (1976) Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. J Food Sci 41:1036.

PAGE, B.T. *et al.* Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. Journal of Animal Science, v.80, p.3077- 3085, 2002.

PAZ, C. C. P.; Luchiari Filho, A. Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. Pecuária de corte. N.101, p. 58-63, 2000.

PICKWORTH, C. L. *et al.* Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. J. Ani. Sci. 2010; 89(2): 355-66.

PITCHFORD, W. S. *et al.* Genetic variation in fatness and fatty acid composition of crossbred cattle. Journal of Animal Science, v. 80, p. 2825-2832, 2002.

RILEY, D.G. *et al.* Estimated genetic parameters for palatability traits of steaks from Brahman cattle. Journal Animal Science, 2003; (81):54-60.

ROSEN, B. D. *et al.* De novo assembly of the cattle reference genome with single-molecule sequencing. GigaScience, v. 9, n. 3, p. giaa021, 2020.

SANTOS SILVA, D. B. *et al.* Prediction of hub genes associated with intramuscular fat content in Nelore cattle. BMC GENOMICS JCR, v. 20, p. 1, 2019.

SANTOS SILVA, D.B., *et al.* Spliced genes in muscle from Nelore Cattle and their association with carcass and meat quality. *Sci Rep* 10, 14701 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-71783-4.

SCARDONI, G. *et al.* Analyzing biological network parameters with CentiScaPe, *Bioinformatics*, Volume 25, Issue 21, 1 November 2009, Pages 2857–2859, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp517.

SCHENKEL, F.S. *et al.* Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. Journal of Animal Science, v.84,p.291-299, 2006.

SEVANE, N. *et al.* Polimorfismos em doze genes candidatos estão associados a características de crescimento, perfil lipídico muscular e qualidade da carne em onze raças de gado europeias, Mol Biol Rep. 41 (2014) 4721-4731.

SHACKELFORD, S.D. *et al.* Heritibilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigorcalpastatinactivity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. Journal of Animal Science, Champaign, 1994; 72(2): 857-863.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 2003;13(11):2498–504.

SILVA-VIGNATO, B. *et al.*, Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits

of Nellore cattle, BMC Genomics. 18 (2017) 1-13.

SMITH, T. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits Genetics and Molecular Research.2009; 8(1):39-46.

SPARKS, J.D., Dong H.H. FOXO1 and hepatic lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 2009; 20 (3): 217-26.

SUDHAGAR, A. *et al.* (2018). Transcriptome Analysis Based on RNA-Seq in Understanding Pathogenic Mechanisms of Diseases and the Immune System of Fish: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci 19(1):245.

SUN S. *et al.* (2020) Systematic evaluation of the physicochemical properties and the volatile flavors of yak meat during chilled and controlled freezing-point storage. J Food Sci Technol 57:1351–1361. https://doi.org/10.1007/s13197-019- 04169-8.

TIZIOTO, P.C. *et al.* Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nellore cattle. Meat Science, v. 96,p.436- 40, 2014.

TIZIOTO, P.C. *et al.* Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. Physiological Genomics Published. 2013; 45(21): 1012-1020.

TOLEDO, Karina. Em busca de alvos terapêuticos, cientistas mapeiam rede de interação gênica. Pesquisa FAPESP. 2013. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/em-busca-de-alvos-terapeuticos-cientistas-mapeiam-rede-de-interacao-genica/>. Acesso em: 2 de ago. de 2022.

WICKRAMASINGHE, S. *et al.* RNA-Sequencing: A tool to explore new frontiers in animal genetics. Livestock Science, [S.I.], v. 166, p. 206-216, Aug. 2014.

WOOD, J. D. *et al.* Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. Meat Sci. 2008; 78(4): 343-58.

WOODS, V. B.; Fearon, A. M. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. Livestock Science, v. 126, n.1-3, p.1-20, 2009.

XING, Y. Q. *et al.* The regulation of FOXO1 and its role in disease progression, Life sciences, 193 (2018) 124-131.