

# AVANÇOS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE ZEBUÍNOS PARA MACIEZ DA CARNE

Luiz L Coutinho<sup>1</sup>, Bárbara Silva-Vignato<sup>1</sup>, Aline SM Cesar<sup>1</sup>, Mirele D Poleti<sup>2</sup>, Vinicius H da Silva<sup>1</sup>, Carolina P Goes<sup>1</sup>, Anna Carolina Fernandes<sup>1</sup>, Graciela Paulin<sup>1</sup>, Luan Gaspar Clemente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP

<sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA/USP

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, totalizando 214,7 milhões de cabeças e, sendo responsável por 15,3% da produção mundial de carnes [1]. O rebanho brasileiro é composto majoritariamente por animais zebuínos (*Bos indicus*), principalmente bovinos da raça Nelore. As raças zebuínas se destacam por possuírem boa relação músculo:osso, excelente acabamento de carcaça e por produzirem carne magra, o que é bastante vantajoso sob o ponto de vista da saúde humana. Porém, em relação à maciez, animais *Bos indicus* tendem a produzir carne menos macia e com menor conteúdo de gordura intramuscular quando comparados às raças taurinas [2, 3].

A maciez de um corte cárneo é o atributo sensorial que mais afeta a satisfação do consumidor. Essa característica pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, como raça, idade, gênero, tipo de músculo, tempo de maturação, processamento e método de cocção. Somando-se a isso, algumas propriedades fisiológicas do músculo também exercem efeito sobre a maciez, como taxa e velocidade da glicólise *post-mortem*, pH final, comprimento do sarcômero após o estabelecimento do *rigor mortis*, atividade das enzimas do complexo das calpaínas, proteólise das proteínas miofibrilares, quantidade e solubilidade do tecido conjuntivo e, conteúdo de gordura intramuscular [4, 5].

Em relação às alterações fisiológicas que ocorrem no músculo após a morte do animal, a glicólise anaeróbica e o *rigor mortis* são essenciais para qualidade da carne. Brevemente, o



processo de conversão do músculo em carne se inicia com a interrupção do suprimento de oxigênio para as células, quando os músculos entram em metabolismo anaeróbico para manter a geração de ATP. A glicólise anaeróbica faz com que o glicogênio seja transformado em ácido pirúvico e este, em ácido láctico. O lactato formado fica então acumulado dentro das células, causando a queda do pH. Como consequência do esgotamento das reservas de energia ocorre o *rigor mortis*, um estado no qual as miofibrilas entram em estado de contração irreversível, através da formação das pontes cruzadas entre miosina e actina [5, 6]. Esses processos são fundamentais para determinar o comprimento do sarcômero, a atividade das proteínas miofibrilares, o espaçamento entre as miofibrilas, a capacidade de retenção de água da carne e o pH final, pontos-chave no estabelecimento da maciez [5].

Além do metabolismo *post-mortem*, outro ponto essencial para o amaciamento da carne ocorre durante a maturação, e consiste na proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas [7]. Neste sentido, o sistema das calpaínas é responsável por 90% ou mais do amaciamento proteolítico que ocorre durante os dez primeiros dias de armazenamento da carne [8]. As calpaínas são proteases produzidas pelos músculos na forma de enzimas ativadas pelo cálcio. Logo após o abate, os níveis citosólicos de cálcio começam a se elevar devido a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, ativando as calpaínas. Inicialmente estas enzimas estão ligadas a seu inibidor, a calpastatina, porém conforme o pH da carne diminui no processo de glicólise anaeróbica, as calpaínas ativadas hidrolisam a calpastatina causando o amaciamento da carne [6].

Ao longo dos anos, diversos estudos tentaram explicar os mecanismos que levam alguns animais a produzirem carne mais macia que outros, principalmente entender as diferenças entre os grupos genéticos *Bos taurus* e *Bos indicus* [9, 10]. Inicialmente, os estudos que visavam comparar a maciez da carne entre essas subespécies eram voltados à mensuração da atividade das enzimas calpaína e calpastatina, associando a maior dureza da



carne de animais zebuínos a uma maior atividade enzimática da calpastatina [9, 11]. Em meados dos anos 2000, a investigação de mutações pontuais nos genes da calpaína e da calpastatina ganharam destaque [12-14]. Mais recentemente, com o advento das ciências ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, etc.) foi possível compreender mais profundamente os mecanismos moleculares que orquestram o processo de amaciamento da carne em animais Nelore e, estudar melhor as diferenças genéticas entre animais zebuínos e taurinos. Portanto, o principal objetivo dessa revisão é abordar o uso das ferramentas ômicas em estudos sobre a maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

## FERRAMENTAS ÔMICAS

### Marcadores moleculares e genes candidatos

A investigação da arquitetura genética de características zootécnicas de interesse configura-se uma excelente oportunidade para melhor compreensão da regulação dos fenótipos economicamente importantes [15]. Para tanto, utilizar marcadores moleculares, isto é, polimorfismos genéticos resultantes de variações na sequência de nucleotídeos de um determinado segmento de DNA [16] e que, estão associados à uma característica específica funcional, é de fundamental importância. Tais variações podem ocorrer em um gene, ou ainda, em uma região próxima do gene que codifica a característica em questão, que, portanto, devido à proximidade entre eles, estão em desequilíbrio de ligação [17].

Uma estratégia que tem sido utilizada para associar genes com características de interesse econômico na produção animal é o estudo de genes candidatos. Ou seja, genes de ação biológica conhecida que estão envolvidos com o desenvolvimento/fisiologia de uma característica de interesse [18]. Um dos exemplos bem-sucedidos da aplicação desta estratégia é o gene da Miostatina



(MSTN), associado à formação da dupla musculatura em bovinos [19].

As principais limitações desta estratégia são, o limitado conhecimento dos genes que controlam características de interesse e o fato de que características de natureza quantitativa normalmente são controladas por vários genes de pequeno efeito. Dificuldades também existem em estabelecer o efeito preciso do gene candidato, já que a determinação da variante causal para um gene de efeito menor pode não ser facilmente definida [20].

Ao longo dos anos diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de compreender os mecanismos responsáveis pela maciez da carne. Evidências sugerem que a proteólise das proteínas miofibrilares e proteínas associadas seja o principal mecanismo envolvido no amaciamento da carne durante a maturação, sendo o sistema das calpaínas o principal alvo dos estudos [21].

No ano 2000, Casas et al. [22] identificaram um QTL (*Quantitative Trait Loci*) na porção final da região telomérica do cromossomo bovino 29 com efeito na maciez da carne em *Bos taurus*. No mesmo ano, Smith et al. [23] verificaram que a variação no gene da calpaína (*CAPN1*) estava associada à maciez da carne em bovinos. Somando-se a isso, o gene *CAPN1* foi considerado candidato para o QTL previamente identificado por Casas et al. [22].

Page et al. [12] foram os pioneiros em caracterizar e associar variações na sequência de nucleotídeos do gene *CAPN1* associadas à maciez da carne. Essas variações seriam causadas por substituições nucleotídicas de uma citosina por uma guanina e de uma guanina por uma adenina nas posições 316 e 530 dos éxons 9 e 14, respectivamente. Em 2004, Page et al. [13] avaliaram o efeito dos marcadores associados ao sistema proteolítico da calpaína/calpastatina – CAPN316 e CAPN530 – na maciez da carne bovina em populações comerciais, observando maior proporção de alelos favoráveis para esse fenótipo em animais taurinos. Corroborando esses estudos, Casas et al. [24] também



verificaram uma associação entre SNPs localizados no gene da calpaína com a maciez da carne em animais *Bos indicus*.

Schenkel et al. [25] identificaram um polimorfismo associado ao gene da calpastatina (*CAST*), caracterizado pela substituição de uma guanina por uma citosina, que teve seu efeito associado à maciez da carne e à outras características de qualidade de carne e de carcaça em uma população de bovinos cruzados. Além destes, outros estudos têm sido conduzidos no sentido de detectar e avaliar o efeito de polimorfismos genéticos associados aos genes do sistema das calpaínas, em características de qualidade de carne e carcaça de bovinos Nelore [26-30].

Curi et al. [26] estudaram o efeito dos marcadores localizados nos genes da calpaína (*CAPN4751*) e da calpastatina (*CAST/Ddel*) na maciez da carne de animais Nelore e cruzados, atestando a eficiência destes marcadores para o melhoramento genético de animais da raça Nelore. Posteriormente, Pinto et al. [27] igualmente estudaram o efeito de polimorfismos localizados nos genes da calpaína e da calpastatina em bovinos Nelore, reafirmando o potencial do uso desses marcadores em programas de melhoramento genético na raça Nelore.

Em 2018, Braz et al. [29] trabalhando com uma população de 1.657 bovinos Nelore, identificaram duas regiões associadas à maciez da carne localizadas nos genes *ASAP1* e *CAPN1*. Os efeitos dos haplótipos na força de cisalhamento (FC) variaram de -0,44 a 0,80 kg na região do gene *CAPN1* e, de -1,03 a 1,52 kg na região do gene *ASAP1*. Em 2019, este mesmo grupo de pesquisa [30] encontrou oito SNPs, localizados nos cromossomos 3, 4, 9, 10 e 11, que estavam associadas a maciez da carne em uma população de 3.161 bovinos Nelore. O SNP *rs134499129* (cromossomo 3) foi o que mais explicou a variância genética aditiva da FC (0,072 kg<sup>2</sup>) e, o *rs41623448* (cromossomo 10) apresentou o maior efeito de substituição alélica (0,73 ± 0,09 kg). Além disso, os autores também identificaram 33 regiões de QTL associadas a maciez nesta população de animais Nelore, dentre os genes



identificados nessas regiões destacam-se o *CAPN1*, *SUCLG1* e *NOS1AP*.

Estes trabalhos comprovam a eficiência do uso de marcadores moleculares localizados em genes envolvidos no sistema das calpaínas, associados à maciez da carne em animais Nelore e, nos auxiliam a compreender os mecanismos genéticos que levam estes animais a produzirem uma carne menos macia que bovinos de origem taurina. Somando-se a isso, esses estudos abrem caminho para a validação de outros marcadores associados à maciez da carne em bovinos Nelore, como os localizados nos genes *ASAP1*, *SUCLG1* e *NOS1AP* [29, 30].

## **GWAS**

Desde os anos 90, o mapeamento de QTL tem sido uma ferramenta importante, a qual era baseada em marcadores do tipo microssatélites [31]. No entanto, nos dias de hoje com o advento das tecnologias de sequenciamento do genoma completo e a disponibilidade de painéis de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *single nucleotide polymorphism*) distribuídos por todo o genoma, a identificação de QTL tem sido baseada em marcadores do tipo SNP. Essa identificação tem sido realizada por meio de estudos de associação ampla do genoma (*genome-wide association study*, GWAS), os quais se baseiam na proposta de predição simultânea dos efeitos dos marcadores sem o uso de testes de significância para marcadores individuais e foi apresentado pela primeira vez por [32, 33].

O GWAS possibilita a identificação de associação entre *locos* e características fenotípicas em nível populacional, por meio de testes de hipóteses, permitindo explicar maior proporção da variabilidade genética e redução da chamada herdabilidade perdida (*missing heritability*). Nesses estudos de associação ampla tem sido considerada a análise de desequilíbrio de ligação em nível populacional, usando todos os *locos* marcadores simultaneamente, o que tem demonstrado melhores resultados. O GWAS, como



muitos outros modelos de estudo, apresenta desafios como a escolha cuidadosa e estratégica de uma população homogênea para o estudo e a contabilização da estratificação da população. Além disso, os modelos estatísticos devem ser escolhidos cuidadosamente para minimizar as chances de associações falsas [33].

O GWAS resultou na identificação de centenas de QTLs associados à características de interesse econômico na área de produção animal (<http://www.animalgenome.org/QTLdb>) tais como: desempenho, rendimento de carcaça, crescimento, eficiência alimentar, maciez, quantidade de gordura subcutânea e intramuscular, entre outras [22, 34-40]. Em relação à maciez da carne, McClure et al. [41], trabalhando com cinco diferentes raças bovinas (Angus, Hereford, Charolais, Limousin e Simental), identificaram 79 regiões genômicas associadas à força de cisalhamento (FC) em pelo menos três das raças estudadas, porém apenas oito regiões foram detectadas em todas as raças. Os autores detectaram QTL na região dos genes *CAPN1* (Calpaína 1) e *CAST* (Calpastatina) associados à FC nas cinco raças estudadas, os quais explicaram 1,02 e 1,85% da variação fenotípica da FC, respectivamente.

Para animais da raça Nelore, Tizioto et al. [36] identificaram um QTL em regiões próximas do gene da subunidade grande da Calpaína 2 (*CAPN2*), quatro na região do gene da Calpaína 5 (*CAPN5*) e dois em genes da família do colágeno (*COL15A1* e *COL23A1*). No entanto, nenhum SNP associado à FC foi encontrado na região do gene da Calpastatina em animais da raça Nelore [36, 42]. Outra importante região identificada em bovinos Nelore, que foi associada à maciez da carne, foi a região do gene *PLAG1* [42]. De acordo com Magalhães et al. [42] o gene *PLAG1* tem um importante efeito pleiotrópico e pode ser um excelente gene candidato de grande efeito, por atuar em diferentes características fenotípicas como maciez, crescimento e eficiência alimentar e, ser fator de transcrição para o hormônio do crescimento *IGF-2* [43, 44]. Carvalho et al. [45] identificaram 18 regiões genômicas, as quais



explicaram mais de 1% do total da variância genética aditiva na maciez da carne em Nelore, a partir de um conjunto de dados de 909 animais e 463.995 SNPs. Dentre os genes candidatos localizados nestas regiões se destacam *SLC2A9*, *FRAS1*, *ANXA3*, *FAM219A*, *DNAI*, *AVEN*, *SHISA7*, *UBE2S*, *CDC42EP5*, *CNTN3*, *C16orf96*, *UBALD1*, *MGRN1* e *SNORA1*, corroborando com os estudos previamente realizados por Tizioto et al. [36]. Dessa forma, os resultados de GWAS sugerem que, para bovinos Nelore, a maciez da carne é controlada por vários genes de efeito pequeno, e alguns deles parecem ser específicos da raça. Essas pesquisas colaboram para melhor compreensão da arquitetura genética envolvida no fenótipo da maciez da carne em animais Nelore.

### **Variações estruturais**

A alta complexidade do genoma está normalmente associada a variações estruturais (*structural variants*, SVs), as quais muitas vezes possuem definições e classificações ambíguas. De modo geral, translocações, número de cópias de segmentos genômicos (*copy number variations*, CNVs) e inversões englobam, até certo ponto, a maioria das classes de SVs formalmente descritas na literatura. SVs são de fundamental importância para a evolução de famílias gênicas, e, portanto, das espécies, pois diferentes genes parálogos e ortólogos advêm de duplicações e posterior seleção natural [46]. Dessa forma, a seleção artificial em animais domésticos pode também fazer uso de variações estruturais para aumentar a frequência de polimorfismos reconhecidamente associados a características de interesse.

SVs têm sido predominantemente associadas a doenças, principalmente aquelas relacionadas ao desenvolvimento cognitivo humano tais como esquizofrenia e autismo [47]. Contudo, um número crescente de estudos tem associado diferentes SVs também a fenótipos de interesse em animais domésticos, como bovinos [48]. Por exemplo, a deleção total ou parcial do gene *KIT* causa diferentes padrões de cor na pelagem de variadas raças de





bovinos, tais como *White park* e *Galloway* [49]. Correlatamente, a translocação parcial do mesmo gene, do cromossomo 6 para o 29, é responsável pela pelagem “*color-sided*” em bovinos da raça *Belgian blue* [50]. Portanto, embora as mais diferentes classes de SVs possam ser associadas à fenótipos de interesse, CNVs são tecnicamente mais fáceis de detectar e caracterizar, sendo um bom indicativo de variantes estruturais mais complexas [51] tais como as translocações. CNVs podem ser identificados pela intensidade de sinal e nível de heterozigosidade advindo de algumas técnicas de genotipagem, tais como os microarranjos/painéis de SNP [52]. Tais técnicas de genotipagem têm um custo reduzido quando comparado ao sequenciamento, permitindo a caracterização de um número maior de animais com um mesmo investimento. Conseqüentemente, o poder estatístico de futuras análises de associação com fenótipos ou expressão gênica cresce.

CNVs advindos de painéis de SNP de alta resolução, com aproximadamente 770 mil marcadores, foram anteriormente utilizados para identificação de CNVs em animais da raça Nelore [53, 54]. A associação de CNVs com maciez da carne em 723 animais Nelore revelou genes candidatos associados a um intrínseco e complexo controle de moléculas de sinalização intracelulares (cAMP e cGMP), bem como o gene da enzima *PRKAB2* ligada ao transporte de cálcio no sarcolema e à expressão do gene da calpastatina [53].

De maneira geral, CNVs de Nelore possuem sobreposição com diversas regiões contendo SNPs previamente associadas à maciez de sua carne (i.e. QTLs), o que pode indicar que polimorfismos estruturais mais complexos que os SNPs encontrados podem conjuntamente contribuir para maciez [53]. CNVs são também associados com um orquestrado controle da expressão gênica, tanto de genes próximos como distais, de músculo esquelético em animais da raça Nelore [55]. Portanto, a variação fenotípica na maciez da carne de zebuínos advém de uma complexa rede de controle gênico, influenciada por polimorfismos de base única e estruturais de múltiplas bases.



## Transcriptômica

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de uma célula em uma etapa específica do desenvolvimento ou condição fisiológica. Ao longo dos anos, várias tecnologias foram desenvolvidas para estudar e quantificar o transcriptoma, incluindo técnicas de hibridização e métodos baseados em sequências específicas, como os *microarrays* e o sequenciamento *Sanger* [56, 57]. Atualmente, o RNA-Seq (*RNA Sequencing*), uma técnica de sequenciamento em larga escala do RNA, é o método mais utilizado para estudar o transcriptoma. A abordagem de sequenciamento por meio do RNA-Seq produz milhões de leituras de sequências curtas de DNA complementar (cDNA) que são mapeadas contra um genoma/transcriptoma de referência para obter um mapa transcricional na escala genômica, que consiste na estrutura da transcrição e nível de expressão de cada gene.

O RNA-Seq tem sido utilizado em estudos de expressão gênica, na identificação de novas espécies de RNA, na descoberta de variações de sequência nas regiões transcritas (SNP), identificação de isoformas de *splicing* e, análise de redes de co-expressão gênica [58-60]. Esta técnica vem sendo aplicada com sucesso na bovinocultura de corte para estudar os mecanismos biológicos que controlam diferentes fenótipos de interesse em raças ou populações distintas [61-64].

Em relação a maciez da carne, Bongiorno et al. [65], utilizaram o RNA-Seq para compreender os mecanismos biológicos que levam a diferenças na maciez da carne entre as raças Maremmana (*Bos primigenius*) e Chianina (*Bos taurus*). Entre os genes diferencialmente expressos identificados, os autores ressaltaram alguns genes da família *TRIM* (*tripartite motifs*), envolvidos no crescimento, diferenciação celular e regeneração do músculo esquelético; e, genes relacionados à concentração de cálcio, sódio e potássio no músculo esquelético (*SCN2B*, *SLC9A7* e *KCNK3*). Em bovinos da raça Nelore, Fonseca et al. [3], também



identificaram genes envolvidos no transporte de cálcio, sódio e potássio, relacionados à maciez da carne.

Em 2018, Gonçalves et al. [63] visando compreender melhor os mecanismos que levam ao amaciamento da carne de bovinos Nelore, realizaram sequenciamento em larga escala do RNA e análise de redes de co-expressão gênica. Como resultado, genes que codificam proteínas ribossomais, ubiquitinas, mioglobinas e enolases, e genes envolvidos nos processos de proteólise, sinalização do cálcio e apoptose, foram destacados neste estudo. Em 2019, Diniz et al. [64] igualmente empregaram análise de co-expressão gênica ao estudar a associação entre a concentração de minerais no músculo esquelético de bovinos Nelore e atributos da qualidade da carne. Dentre os módulos de gene encontrados, àquele associado a maciez estava enriquecido principalmente para vias metabólicas relacionadas a síntese e degradação de proteínas, como as vias de sinalização mTOR, AMPK e via da proteólise mediada por ubiquitina. Esses trabalhos abrem caminho para identificação de novos potenciais genes candidatos associados à maciez da carne, além de auxiliarem na compreensão dos mecanismos moleculares que regulam essa característica em bovinos da raça Nelore.

### **Proteômica e metabolômica**

Na última década, estratégias proteômicas vem sendo extensivamente estudadas e empregadas na ciência animal em vista que proteínas e enzimas determinam a diversidade fenotípica a partir de um conjunto de genes comum. As recentes inovações tecnológicas no campo de separação (eletroforese e cromatografia) e identificação de proteínas (espectrometria de massas), e bioinformática [66, 67] foram fundamentais para os avanços nesta área. Na ciência da carne, a proteômica permite aprofundar o nosso conhecimento dos processos biológicos que dirigem a produção, com forte impacto econômico na melhoria da qualidade do produto final, e direcionando para descoberta de biomarcadores



para maciez da carne com potenciais aplicações pela indústria [68, 69].

A proteômica visa a caracterização das proteínas presentes em uma célula, tecido ou um organismo, incluindo estudo de abundância, estrutura, funções, interações e modificações de proteínas sob uma determinada situação [70]. As pesquisas em proteômica quantitativa utilizam abordagens baseadas em gel (uni e bidimensional) e livres de gel, sendo que os estudos de proteômica para maciez da carne, comparando amostras de carne mais e menos macia, tem utilizado principalmente a eletroforese bidimensional (2-DE) combinada a espectrometria de massas para separar e identificar as proteínas com abundância diferencial [71].

O processo de amaciamento da carne acontece nas fibras musculares, cujo os constituintes são proteínas que sofrem a ação das proteases [66]. Portanto, a proteólise das proteínas miofibrilares e citoesqueléticas são os fatores primários influenciando a variabilidade da maciez da carne bovina [72]. Devido a predominância de animais zebuínos no rebanho brasileiro e as restrições atribuídas a essa raça em relação a maciez da carne, diferenças no perfil proteico muscular em bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) com valores contrastantes para força de cisalhamento (FC) foram avaliadas por Carvalho et al. [28]. Esse estudo demonstrou o envolvimento das proteínas de choque térmico de 27 kDa e 70 kDa (HSP27 e HSP70-1) na maciez da carne. Os autores relataram maior abundância da HSP27 e menor abundância da HSP70 no grupo de menor FC, além de terem identificado proteínas estruturais como miosina (MLC1/MLC3, MLC2), tropomiosina (TPM1), e actina (ACTA1) também com menor abundância no mesmo grupo.

Um estudo de metaloproteínas em músculo de bovinos Nelore identificou as proteínas piruvato quinase (PK) e albumina relacionadas a variação da maciez da carne entre os animais [73]. Rosa et al. [74] compararam o perfil proteico muscular de uma população de bovinos Nelore com genótipos contrastantes para os marcadores nos genes da Calpaína 1 (CAPN4751) e Calpastatina



(UOGCAST), previamente descritos por White et al. [14] e Schenkel et al. [25], e reportaram algumas proteínas com abundância diferencial significativa para o efeito da interação entre os marcadores, incluindo isoformas de miosina (MYL2, MYLPF, e MYH6), actina (ACTA1), troponina-T (TNNT3), proteínas de choque térmico (HSP27), e proteínas do metabolismo energético (TPI1, CKM, ENO3, UQCRC1, TRIM72). Entre essas, ressalta-se a maior abundância da HSP27 no grupo de animais com ambos os genótipos favoráveis para maciez da carne, corroborando os resultados de Carvalho et al. [28].

Um estudo do proteoma e fosfoproteoma comparando o perfil proteico dos músculos de zebuínos e taurinos reportaram maior abundância de tropomiosina (TPM1), troponina-T (TNN3), miosina (MYL1), malato desidrogenase citoplasmática (MDH1), alfa-enolase (ENO1), e proteína regulada por glicose de 78 kDa (HSPA5) em bovinos Nelore. Entretanto, os músculos de bovinos Angus tiveram maior abundância de proibitina (PHB), HSP70 - mitocondrial (HSP9), e HSP70 membro 6 (HSPA6) [75]. Em relação ao fosfoproteoma, esses mesmos autores constataram que bovinos Nelore tiveram maior fosforilação da MYLPF, ACTA1, TPI1 (triosefosfato isomerase) e proteína épsilon 14-3-3 (YWHAE), enquanto os animais Angus maior fosforilação da fosfoglicomutase 1 (PGM1) e TNNT3.

Embora alguns avanços estejam sendo realizados na área de proteômica em maciez da carne, a complexidade dessa característica se reflete nos diferentes resultados observados entre os estudos realizados para identificar potenciais biomarcadores. Os estudos nessa área são avançados em animais taurinos [76], devendo ainda serem melhor explorados em animais zebuínos, uma vez que as diferenças entre raças têm efeito evidente na qualidade da carne. Além disso, diferentes técnicas devem ser empregadas. Um estudo de Bjarnadóttir et al. [77] comparando as proteínas identificadas como diferencialmente abundantes entre os grupos de carne bovina macia e dura na raça Norwegian Red, observaram uma baixa sobreposição dos resultados obtidos pela



quantificação absoluta e relativa por marcação isobárica (iTRAQ) e a análise de eletroforese 2-DE, apesar de compartilharem semelhantes funções. Entretanto, com as recentes investigações já é possível obter algumas certezas sobre a bioquímica da maciez da carne em zebuínos, incluindo o envolvimento das proteínas de choque térmico (HSPs); a função das enzimas glicolíticas no *post-mortem*; a degradação ou alteração de estado de proteínas miofibrilares.

Uma próxima etapa para melhor entender esse processo de amaciamento da carne é integrar análises do metabolismo, a qual consiste em estudar os produtos finais dos processos regulatórios celulares, isto é, pequenas moléculas dentro da faixa de 1.500 Daltons [78]. Análises metabólicas comparando bovinos Maremmana e Chianina, evidenciaram que carne mais macia tem maior acúmulo de produtos finais e intermediários do metabolismo glicolítico, incluindo fosfoenolpiruvato, lactato, NADH, NAD<sup>+</sup> [79].

Recentemente, um estudo de metabolômica usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) demonstrou diferenças no perfil de metabólitos entre as carnes de aves, suínos e bovinos das raças Wagyu e Holstein. Metabólitos como ácido málico, maltose, trealose, arabitol, isomaltose, N-acetilserina e inositol foram mais abundantes na carne de bovinos Wagyu em relação a Holstein, podendo estar relacionado a maciez devido ao alto grau de marmorização em bovinos Wagyu [80]. Em bovinos Nelore, a suplementação da dieta dos animais com extrato de erva mate resultou em uma carne mais macia e em um aumento do conteúdo de ácido linoleico conjugado, inosina monofosfato, creatina e carnosina na carne fresca [81].

Análises metabolômicas usando espectroscopia de prótons por ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN) identificaram 19 metabólitos correlacionados com propriedades sensoriais da carne de bovinos Nelore e cruzados Angus x Nelore, sendo que carnosina e betaína foram os principais metabólitos correlacionados com a maciez da carne [82]. A metabolômica está sendo utilizada para investigar alguns fatores que afetam qualidade de carne, como a



origem geográfica de bovinos [83, 84], sistemas de alimentação [85], e a relação entre maturação e sabor da carne [86, 87]. No entanto, a comparação do perfil metabólico entre carne macia e dura, ainda não foi muito explorada, particularmente em animais *Bos indicus*.

## **APLICAÇÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

### **Seleção Genômica**

Uma vez que marcadores associados à maciez de carne são conhecidos, é possível desenvolver uma seleção genética assistida por estes marcadores (*marker-assisted selection*, MAS). Contudo, para características complexas envolvendo múltiplos marcadores, tais como a maciez da carne, o planejamento do MAS pode ser laborioso e os resultados podem ser decepcionantes [88]. Uma alternativa é a seleção genômica envolvendo uma população referência e um grande número de marcadores [33], a qual tende a fazer um melhor uso da informação genômica para programas de melhoramento. Na seleção genômica, a população de referência possui genótipos e fenótipos mensurados, mas a população de teste possui apenas os genótipos. Assim, animais da população teste podem ter seu potencial genético estimado apenas por seus marcadores genéticos, mesmo sem fenótipos mensurados ou progênie existente. Isso tende a diminuir muito custos relacionados à avaliação de progênie e deixar o intervalo entre gerações consideravelmente menor. Em animais da raça Nelore, a maciez da carne obteve boa acurácia de predição genômica [89], indicando que a seleção genômica tende a ser uma alternativa promissora para alcançar animais zebuínos com qualidade de carne superior.

### **Edição gênica**

Após anos de investigação focada na busca de variantes associadas a diversas características de interesse econômico, o



atual cenário científico está voltado para a compreensão de como tais variantes afetam a expressão de seus genes correlatos. A necessidade de interligar a genética quantitativa clássica à genômica funcional tornou-se realidade devido ao desenvolvimento de métodos *high-throughput*, permitindo uma análise sistemática do genoma, além de visar a melhoria da produção de gado de corte [90].

Nesse contexto, técnicas de edição gênica têm sido utilizadas. Em 2014, Luo et al. [91] realizaram com sucesso, a produção de bezerros com deleção para o gene *Miostatina* (MSTN), relacionado com a inibição do desenvolvimento do músculo esquelético [92], utilizando ZNFs (*Fok1-based Zinc-Finger Nucleases*). Já no ano seguinte, houve a produção de bovinos *knockout* para o mesmo gene utilizando a ferramenta TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) [93], demonstrando a eficácia da edição gênica para a melhoria de características de interesse econômico.

Mais recentemente, CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) tem atenuado as dificuldades de investigação acerca da função de variantes. Especificamente, a metodologia CRISPR/Cas9 utiliza-se de uma nuclease com alta especificidade para provocar uma quebra guiada na dupla fita de DNA que, posteriormente, pode ser reparada naturalmente pela célula ou facilitar a utilização de mecanismos acessórios para inserção de genes-repórter ou modificação de bases na região de interesse [94]. Esta ferramenta já é amplamente utilizada no meio acadêmico ao redor do globo e foi aplicada a vários modelos e com diversas finalidades [94].

Recentes estudos já demonstraram a eficácia na produção de animais modificados utilizando a injeção de CRISPR/Cas9 em embriões de ovelhas, coelhos e cabras com foco em genes associados à produção de carne [95-97]. Apesar de também já ser possível obter bovinos modificados [98], não há relatos de variantes associados a qualidade da carne. No entanto, em um encontro recente da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões





ocorrido em meados de agosto/2019 na Bahia, um grupo argentino apresentou dados de sucesso com 100% de embriões bovinos deletados também para o gene MSTN [99].

Outro mecanismo atualmente em estudo é o envolvimento de SNPs em regiões não codificantes, que podem afetar a expressão gênica por localizar-se em *enhancers* ou atuar na interação, com outras variantes responsáveis pelo efeito causal na expressão de genes-alvos. Neste sentido, com a ferramenta CRISPR/Cas9 também é possível alterarmos as variantes e entendermos a interrelação entre essas variantes e os mecanismos funcionais de genes e fenótipos. Neste quesito, há uma lacuna de conhecimento, indicando a necessidade de investirmos esforços na área e, conseqüentemente, significando um importante passo e avanço para o início da produção em grande escala de animais de corte geneticamente melhorados.

### **Aprendizado de máquinas**

Aprender com informações é a preocupação central do aprendizado de máquina (*machine learning*, ML), alcançada pela aplicação de um ou vários modelos a um grande conjunto de dados. Tal parte é denominada de treinamento e pode ser subdividida entre treinamento supervisionado, nos casos onde o aprendizado ocorre através de exemplos existentes, como genótipos e fenótipos correspondentes, e treinamento não supervisionado, como nos casos onde estão disponíveis somente dados de genotipagem [100].

Diferentes tipos de algoritmos estão atualmente disponíveis, e várias proposições são constantemente levantadas. Dentre os principais, pode-se citar os algoritmos de aprendizado de máquina por regressão linear, máquina de vetor de suporte, k-vizinhos mais próximos, regressão logística, árvore de decisão, florestal aleatória, o aprendizado ingênuo de Bayes e redes neurais profundas [100].

Uma das primeiras tentativas da aplicação de aprendizado de máquina no melhoramento genético foi realizado na previsão



genômica. Os resultados iniciais mostram que os métodos de aprendizado de máquina, superam, em desempenho, os métodos tradicionais quando a arquitetura genética subjacente era complexa, ou seja, quando as características eram controladas por dominância e/ou epistasia [101].

Além disso, aplicações no estudo de associação ampla do genoma também obtiveram relativo sucesso. Alguns estudos mostraram que os métodos de ML podem ser utilizados para a realização do GWAS, com maior eficiência na identificação de um subconjunto de SNPs com um link direto para genes candidatos [101].

A aplicação direta do aprendizado de máquina no melhoramento animal ainda está incipiente e carece de maiores investimentos e estudos, no entanto, pode ser utilizada em contextos subjacentes. Os recentes desenvolvimentos em tecnologias modernas, como sistemas automatizados de geração de imagens digitais e genotipagem em larga escala, possibilitaram a coleta e o monitoramento contínuo de uma grande quantidade de dados (*big data*) em nível do animal, a um custo razoável, tornando tais conjuntos vastos, de difícil visualização e análise, em programas de computador comuns. No entanto, esses dados nem sempre são "limpos", pois podem conter valores ausentes, *outliers* e pontos de dados indesejados, vieses estes que podem ser atenuados através do aprendizado de máquina.

Escalante [102], demonstrou que a aplicação de modelos de aprendizado de máquina são bem sucedidos na identificação de *outliers* nos dados e podem ser aplicados para filtrar e editar dados antes da avaliação genética, além de possuírem maior precisão na imputação de genótipo, em casos onde nem todos os marcadores são genotipados, e há a necessidade de se prever os genótipos dos marcadores ausentes [103].



## CONCLUSÃO

Com o advento das ciências ômicas foi possível aprofundar os conhecimentos moleculares acerca da maciez da carne em bovinos. Foram revelados genes candidatos, QTLs, variações estruturais, transcritos e proteínas que ainda não haviam sido explorados. Genes relacionados ao transporte e concentração de cálcio, codificadores de ubiquitinas, proteínas de choque térmico e proteínas do metabolismo energético se mostraram importantes na regulação da maciez da carne em Nelore, nos proporcionando um novo olhar sobre essa característica e robustez aos dados gerados em anos de pesquisa. Apesar de revelarem importantes genes, proteínas e até mesmo metabólitos, a aplicação prática desses estudos em programas de melhoramento genético ainda é lenta, demonstrando a necessidade de investimento de pessoal e financeiro nas pesquisas emergentes e futuras aplicações. No presente momento, a técnica de seleção genômica tem se mostrado bastante promissora ao utilizar informações genômicas na produção de bovinos Nelore com qualidade de carne superior.

## REFERÊNCIAS

1. ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORES DE CARNE: Perfil da Pecuária no Brasil: Relatório Anual 2019. São Paulo, SP. In. <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>, acesso em 27 dez. 2019.
2. Costa D, Abreu JBR, Mourão RdC, Silva JCGd, Rodrigues VC, Sousa JCDd, Marques RAFdS: Características de Carcaça de Novilhos Inteiros Nelore e F1 Nelore x Holandês. *Ciência Animal Brasileira* 2007, 8(4):685-694.
3. Fonseca LFS, Gimenez DFJ, dos Santos Silva DB, Barthelson R, Baldi F, Ferro JA, Albuquerque LG: Differences in global gene expression in muscle tissue of Nelore cattle with divergent meat tenderness. *BMC Genomics* 2017, 18.



4. Zhao C, Tian F, Yu Y, Luo J, Hu Q, Bequette BJ, Baldwin Vi RL, Liu G, Zan L, Scott Updike M *et al*: Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. *Mol Biol Rep* 2012, 39(4):4185-4193.
5. Warner RD, McDonnell CK, Bekhit AED, Claus J, Vaskoska R, Sikes A, Dunshea FR, Ha M: Systematic review of emerging and innovative technologies for meat tenderisation. *Meat Sci* 2017, 132:72-89.
6. Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, Delday M: Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc* 2003, 62(2):337-347.
7. Alves DD, Mancio AB: Maciez da carne bovina - Uma revisão. *Revista da FZVA* 2007, 14(1):193-216.
8. Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, Koohmaraie M, Goll DE: Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J Anim Sci* 1995, 73(5):1351-1367.
9. Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse JD, Hunt MC, Klemm RD: Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 1990, 68(9):2716-2728.
10. Restle J, Vaz FN, Quadros ARBd, Müller L: Características de Carcaça e de Carne de Novilhos de Diferentes Genótipos de Hereford x Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia* 1999, 28(6):1245-1251.
11. Rubensam JM, Felício PE, Termignoni C: Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1998, 18(4):405-409.
12. Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, Crawford AM, Wheeler TL, Koohmaraie M, Keele JW *et al*: Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci* 2002, 80(12):3077-3085.
13. Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, White SN, Bennett GL, Keele JW *et al*: Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci* 2004, 82(12):3474-3481.



14. White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC, Jr., Johnson DD, Keele JW, Smith TP: A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci* 2005, 83(9):2001-2008.
15. Andersson L, Georges M: Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 2004, 5(3):202-212.
16. Gibbs RA, Taylor JF, Van Tassell CP, Barendse W, Eversole KA, Gill CA, Green RD, Hamernik DL, Kappes SM, Lien S *et al*: Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 2009, 324(5926):528-532.
17. Dekkers JC: Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci* 2004, 82 E-Suppl:E313-328.
18. Bryne PF, McMullen MD: Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. *Probe* 1996, 7:24-27.
19. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J *et al*: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 1997, 17(1):71-74.
20. Haegeman A, Williams JL, Law A, Van Zeveren A, Peelman LJ: Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. *Anim Genet* 2003, 34(5):349-353.
21. Koohmaraie M: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci* 1996, 43s1:193-201.
22. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M: Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci* 2000, 78(3):560-569.
23. Smith TP, Casas E, Rexroad CE, 3rd, Kappes SM, Keele JW: Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci* 2000, 78(10):2589-2594.



24. Casas E, White SN, Riley DG, Smith TP, Brenneman RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase CC, Jr.: Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J Anim Sci* 2005, 83(1):13-19.
25. Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW: Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci* 2006, 84(2):291-299.
26. Curi RA, Chardulo LA, Mason MC, Arrigoni MD, Silveira AC, de Oliveira HN: Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nelore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Anim Genet* 2009, 40(4):456-462.
27. Pinto LF, Ferraz JB, Meirelles FV, Eler JP, Rezende FM, Carvalho ME, Almeida HB, Silva RC: Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nelore cattle. *Genet Mol Res* 2010, 9(3):1431-1442.
28. Carvalho ME, Gasparin G, Poleti MD, Rosa AF, Balieiro JC, Labate CA, Nassu RT, Tullio RR, Regitano LC, Mourao GB *et al*: Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nelore beef cattle, a *Bos indicus* breed. *Meat Sci* 2014, 96(3):1318-1324.
29. Braz CU, Taylor JF, Decker JE, Bresolin T, Espingolan R, Garcia DA, Gordo DGM, Magalhães AFB, Albuquerque LG, Oliveira HN: Polymorphism analysis in genes associated with meat tenderness in Nelore cattle. *Meta Gene* 2018, 18:73-78.
30. Braz CU, Taylor JF, Bresolin T, Espingolan R, Feitosa FLB, Carvalheiro R, Baldi F, de Albuquerque LG, de Oliveira HN: Sliding window haplotype approaches overcome single SNP analysis limitations in identifying genes for meat tenderness in Nelore cattle. *BMC Genet* 2019, 20(1):8.
31. Lipkin E, Mosig MO, Darvasi A, Ezra E, Shalom A, Friedmann A, Soller M: Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics* 1998, 149(3):1557-1567.
32. Whittaker JC, Thompson R, Denham MC: Marker-assisted selection using ridge regression. *Genet Res* 2000, 75(2):249-252.



33. Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 2001, 157(4):1819-1829.
34. Bolormaa S, Hayes BJ, Savin K, Hawken R, Barendse W, Arthur PF, Herd RM, Goddard ME: Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. *J Anim Sci* 2011, 89(6):1684-1697.
35. Dikmen S, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ: Genome-wide association mapping for identification of quantitative trait loci for rectal temperature during heat stress in Holstein cattle. *PLoS One* 2013, 8(7):e69202.
36. Tizioto PC, Decker JE, Taylor JF, Schnabel RD, Mudadu MA, Silva FL, Mourão GB, Coutinho LL, Tholon P, Sonstegard TS *et al*: Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. *Physiol Genomics* 2013, 45(21):1012-1020.
37. Ishii A, Yamaji K, Uemoto Y, Sasago N, Kobayashi E, Kobayashi N, Matsuhashi T, Maruyama S, Matsumoto H, Sasazaki S *et al*: Genome-wide association study for fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Anim Sci J* 2013, 84(10):675-682.
38. Cole JB, Waurich B, Wensch-Dorendorf M, Bickhart DM, Swalve HH: A genome-wide association study of calf birth weight in Holstein cattle using single nucleotide polymorphisms and phenotypes predicted from auxiliary traits. *J Dairy Sci* 2014, 97(5):3156-3172.
39. Cesar AS, Regitano LC, Mourao GB, Tullio RR, Lanna DP, Nassu RT, Mudado MA, Oliveira PS, do Nascimento ML, Chaves AS *et al*: Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle. *BMC Genet* 2014, 15:39.
40. de Oliveira PS, Cesar AS, do Nascimento ML, Chaves AS, Tizioto PC, Tullio RR, Lanna DP, Rosa AN, Sonstegard TS, Mourao GB *et al*: Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. *BMC Genet* 2014, 15:100.
41. McClure MC, Ramey HR, Rolf MM, McKay SD, Decker JE, Chapple RH, Kim JW, Taxis TM, Weaber RL, Schnabel RD *et al*: Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner-Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. *Anim Genet* 2012, 43(6):662-673.
42. Magalhaes AF, de Camargo GM, Fernandes GAJ, Gordo DG, Tonussi RL, Costa RB, Espigolan R, Silva RM, Bresolin T, de Andrade WB *et al*: Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in Nelore Cattle. *PLoS One* 2016, 11(6):e0157845.



43. Fortes MR, Kemper K, Sasazaki S, Reverter A, Pryce JE, Barendse W, Bunch R, McCulloch R, Harrison B, Bolormaa S *et al*: Evidence for pleiotropism and recent selection in the PLAG1 region in Australian Beef cattle. *Anim Genet* 2013, 44(6):636-647.
44. Saatchi M, Schnabel RD, Taylor JF, Garrick DJ: Large-effect pleiotropic or closely linked QTL segregate within and across ten US cattle breeds. *BMC Genomics* 2014, 15:442.
45. Carvalho ME, Baldi FS, Santana MHA, Ventura RV, Oliveira GA, Bueno RS, Bonin MN, Rezende FM, Coutinho LL, Eler JP *et al*: Identification of genomic regions related to tenderness in Nelore beef cattle. *Advances in Animal Biosciences* 2017, 8:s42-s44.
46. Ohta T: Evolution of gene families. *Gene* 2000, 259(1-2):45-52.
47. Morrow EM: Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2010, 49(11):1091-1104.
48. Clop A, Vidal O, Amills M: Copy number variation in the genomes of domestic animals. *Anim Genet* 2012, 43(5):503-517.
49. Brenig B, Beck J, Floren C, Bornemann-Kolatzki K, Wiedemann I, Hennecke S, Swalve H, Schutz E: Molecular genetics of coat colour variations in White Galloway and White Park cattle. *Anim Genet* 2013, 44(4):450-453.
50. Durkin K, Coppieters W, Drogemuller C, Ahariz N, Cambisano N, Druet T, Fasquelle C, Haile A, Horin P, Huang L *et al*: Serial translocation by means of circular intermediates underlies colour sidedness in cattle. *Nature* 2012, 482(7383):81-84.
51. Carvalho CM, Pehlivan D, Ramocki MB, Fang P, Alleva B, Franco LM, Belmont JW, Hastings PJ, Lupski JR: Replicative mechanisms for CNV formation are error prone. *Nat Genet* 2013, 45(11):1319-1326.
52. Carter NP: Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 2007, 39(7 Suppl):S16-21.
53. Silva VH, Regitano LC, Geistlinger L, Pertille F, Giachetto PF, Brassaloti RA, Morosini NS, Zimmer R, Coutinho LL: Genome-Wide Detection of CNVs and Their Association with Meat Tenderness in Nelore Cattle. *PLoS One* 2016, 11(6):e0157711.





54. da Silva JM, Giachetto PF, da Silva LO, Cintra LC, Paiva SR, Yamagishi ME, Caetano AR: Genome-wide copy number variation (CNV) detection in Nelore cattle reveals highly frequent variants in genome regions harboring QTLs affecting production traits. *BMC Genomics* 2016, 17:454.
55. Geistlinger L, da Silva VH, Cesar ASM, Tizioto PC, Waldron L, Zimmer R, Regitano LCA, Coutinho LL: Widespread modulation of gene expression by copy number variation in skeletal muscle. *Sci Rep* 2018, 8(1):1399.
56. Devonshire AS, Sanders R, Wilkes TM, Taylor MS, Foy CA, Huggett JF: Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. *Methods* 2013, 59(1):89-100.
57. Wang Z, Gerstein M, Snyder M: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009, 10(1):57-63.
58. Langfelder P, Horvath S: WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:559.
59. Cirulli ET, Singh A, Shianna KV, Ge D, Smith JP, Maia JM, Heinzen EL, Goedert JJ, Goldstein DB: Screening the human exome: a comparison of whole genome and whole transcriptome sequencing. *Genome Biol* 2010, 11(5):R57.
60. Hrdlickova R, Toloue M, Tian B: RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2017, 8(1):10.1002/wrna.1364.
61. Cesar AS, Regitano LC, Koltjes JE, Fritz-Waters ER, Lanna DP, Gasparin G, Mourão GB, Oliveira PS, Reecy JM, Coutinho LL: Putative regulatory factors associated with intramuscular fat content. *PLoS One* 2015, 10(6):e0128350.
62. Tizioto PC, Coutinho LL, Decker JE, Schnabel RD, Rosa KO, Oliveira PS, Souza MM, Mourão GB, Tullio RR, Chaves AS *et al*: Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. *BMC Genomics* 2015, 16:242.
63. Gonçalves TM, de Almeida Regitano LC, Koltjes JE, Cesar ASM, da Silva Andrade SC, Mourão GB, Gasparin G, Moreira GCM, Fritz-Waters E, Reecy JM *et al*: Gene Co-expression Analysis Indicates Potential Pathways and Regulators of Beef Tenderness in Nelore Cattle. *Front Genet* 2018, 9.



64. Diniz WJS, Mazzoni G, Coutinho LL, Banerjee P, Geistlinger L, Cesar ASM, Bertolini F, Afonso J, de Oliveira PSN, Tizioto PC *et al*: Detection of Co-expressed Pathway Modules Associated With Mineral Concentration and Meat Quality in Nelore Cattle. *Front Genet* 2019, 10:210.
65. Bongiorno S, Gruber CE, Bueno S, Chillemi G, Ferre F, Failla S, Moiola B, Valentini A: Transcriptomic investigation of meat tenderness in two Italian cattle breeds. *Anim Genet* 2016, 47(3):273-287.
66. Lana A, Zolla L: Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *J Proteomics* 2016, 147:85-97.
67. Picard B, Gagaoua M: Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. *Food Res Int* 2020, 127:108739.
68. Bendixen E: The use of proteomics in meat science. *Meat Sci* 2005, 71(1):138-149.
69. Pan S, Zhang H, Rush J, Eng J, Zhang N, Patterson D, Comb MJ, Aebersold R: High throughput proteome screening for biomarker detection. *Mol Cell Proteomics* 2005, 4(2):182-190.
70. Anderson NL, Anderson NG: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998, 19(11):1853-1861.
71. Paredi G, Sentandreu MA, Mozzarelli A, Fadda S, Hollung K, de Almeida AM: Muscle and meat: new horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective. *J Proteomics* 2013, 88:58-82.
72. Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J: How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal* 2016, 2016:3182746.
73. Baldassini WA, Braga CP, Chardulo LA, Vasconcelos Silva JA, 2nd, Malheiros JM, de Albuquerque LG, Fernandes TT, Padilha Pde M: Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nelore breed (*Bos indicus*). *Food Chem* 2015, 169:65-72.
74. Rosa AF, Moncau CT, Poleti MD, Fonseca LD, Balieiro JCC, Silva SLE, Eler JP: Proteome changes of beef in Nelore cattle with different genotypes for tenderness. *Meat Sci* 2018, 138:1-9.



75. Rodrigues RT, Chizzotti ML, Vital CE, Baracat-Pereira MC, Barros E, Busato KC, Gomes RA, Ladeira MM, Martins TD: Differences in Beef Quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. *PLoS One* 2017, 12(1):e0170294.
76. Picard B, Gagaoua M: Chapter 11 - Proteomic investigations of beef tenderness. In: *Proteomics in Food Science: from farm to fork*. Edited by Colgrave. London: Academic Press; 2017: 177-197.
77. Bjarnadottir SG, Hollung K, Hoy M, Bendixen E, Codrea MC, Veiseth-Kent E: Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *J Anim Sci* 2012, 90(6):2035-2043.
78. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, 13(4):263-269.
79. D'Alessandro A, Rinalducci S, Marrocco C, Zolla V, Napolitano F, Zolla L: Love me tender: an Omics window on the bovine meat tenderness network. *J Proteomics* 2012, 75(14):4360-4380.
80. Ueda S, Iwamoto E, Kato Y, Shinohara M, Shirai Y, Yamanoue M: Comparative metabolomics of Japanese Black cattle beef and other meats using gas chromatography-mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 2018:1-11.
81. de Zawadzki A, Arrivetti LOR, Vidal MP, Catai JR, Nassu RT, Tullio RR, Berndt A, Oliveira CR, Ferreira AG, Neves-Junior LF *et al*: Mate extract as feed additive for improvement of beef quality. *Food Res Int* 2017, 99(Pt 1):336-347.
82. Jung Y, Lee J, Kwon J, Lee KS, Ryu DH, Hwang GS: Discrimination of the geographical origin of beef by (1)H NMR-based metabolomics. *J Agric Food Chem* 2010, 58(19):10458-10466.
83. Shintu L, Caldarelli S, Franke BM: Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy. *Meat Sci* 2007, 76(4):700-707.
84. Carrillo JA, He Y, Li Y, Liu J, Erdman RA, Sonstegard TS, Song J: Integrated metabolomic and transcriptome analyses reveal finishing forage affects metabolic pathways related to beef quality and animal welfare. *Sci Rep* 2016, 6.



85. Graham SFK, T., Chevalier A, Gordon A, Farmer L, Elliot C, Moss B: The application of NMR to study changes in polar metabolite concentrations in beef longissimus dorsi stored for different periods post mortem. *Metabolomics* 2010, 6(3):395-404.
86. Graham SF, Farrell D, Kennedy T, Gordon A, Farmer L, Elliott C, Moss B: Comparing GC-MS, HPLC and (1)H NMR analysis of beef longissimus dorsi tissue extracts to determine the effect of suspension technique and ageing. *Food Chem* 2012, 134(3):1633-1639.
87. Goldansaz SA, Guo AC, Sajed T, Steele MA, Plastow GS, Wishart DS: Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLoS One* 2017, 12(5):e0177675.
88. Boichard D, Ducrocq V, Croiseau P, Fritz S: Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. *C R Biol* 2016, 339(7-8):274-277.
89. Magalhaes AFB, Schenkel FS, Garcia DA, Gordo DGM, Tonussi RL, Espigolan R, Silva RMO, Braz CU, Fernandes Junior GA, Baldi F *et al*: Genomic selection for meat quality traits in Nelore cattle. *Meat Sci* 2019, 148:32-37.
90. Yum SY, Youn KY, Choi WJ, Jang G: Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific. *J Anim Sci Biotechnol* 2018, 9:16.
91. Luo J, Song Z, Yu S, Cui D, Wang B, Ding F, Li S, Dai Y, Li N: Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PLoS One* 2014, 9(4):e95225.
92. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R *et al*: Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* 2003, 35(4):227-238.
93. Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB *et al*: Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res* 2015, 24(1):147-153.
94. Hsu PD, Lander ES, Zhang F: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014, 157(6):1262-1278.



95. Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Creneguy A, Brusselle L, Anegón I *et al*: Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One* 2015, 10(8):e0136690.
96. Guo R, Wan Y, Xu D, Cui L, Deng M, Zhang G, Jia R, Zhou W, Wang Z, Deng K *et al*: Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2016, 6:29855.
97. Tan W, Proudfoot C, Lillico SG, Whitelaw CB: Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res* 2016, 25(3):273-287.
98. de Oliveira VC, Moreira GSA, Bressan FF, Gomes Mariano Junior C, Roballo KCS, Charpentier M, Concordet JP, Meirelles FV, Ambrosio CE: Edition of TFAM gene by CRISPR/Cas9 technology in bovine model. *PLoS One* 2019, 14(3):e0213376.
99. Baston J, Fanti T, Moro L, Arnold V, Suvá M, Luzzani C, Olguin M, Miriuka S, Viale D, Vichera G: Generation of myostatin knock-out embryos crispr/cas9-assisted gene editing and somatic cell nuclear transfer. In: *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology (SBTE): 2019; Ilha de Comandatuba, BA, Brazil*; 2019: 664.
100. Shinde PP, Shah SA: A review of machine learning and deep learning applications. In: *4th International Conference on Computing, Communication Control and Automation (ICCUBEA)*. India; 2018.
101. Li B, Zhang N, Wang YG, George AW, Reverter A, Li Y: Genomic Prediction of Breeding Values Using a Subset of SNPs Identified by Three Machine Learning Methods. *Front Genet* 2018, 9:237.
102. Escalante HJ: A comparison of outlier detection algorithms for machine learning. *Programming and Computer Software* 2004.
103. Ventura RV, Miller SP, Dodds KG, Auvray B, Lee M, Bixley M, Clarke SM, McEwan JC: Assessing accuracy of imputation using different SNP panel densities in a multi-breed sheep population. *Genet Sel Evol* 2016, 48(1):71.