Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Integração de dados multi-ômicos para estudo de características de produção, carcaça e qualidade da carne em gado Nelore

Francisco José de Novais

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2021

Francisco José de Novais
Zootecnista

Integração de dados multi-ômicos para estudo de características de produção, carcaça e qualidade da carne em gado Nelore

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Tese apresentada para obtenção do título Doutor ou Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Novais, Francisco José de

Integração de dados multi-ômicos para estudo de características de produção, carcaça e qualidade da carne em gado Nelore / Francisco José de Novais. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

56 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Biologia de sistemas 2. Bioinformática 3. Bovino 4. Rede Bayesiana I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese as pessoas que me fazem querer viver a vida intensamente, em especial: Aos meus pais amados Lúcia e Benedito, pelo amor incondicional e inestimável, a toda educação e carinho que me fazem entender o que é ser humano, por exemplo de honestidade e humildade que hoje me definem como homem e a todo incentivo e esperança na busca dos meus sonhos; A minha esposa Évelin que é mais que uma amiga, um ser que trabalha para que eu evolua como ser humano, pelo apoio e incentivo que não limitam meus horizontes; Aos meus sogros Maria Sílvia e Jocimar que estão sempre a postos e com sorriso no rosto para tornar meu dia mais alegre; Aos meus irmãos de amizade e grandes companheiros Demétrio Godoy, Pedro Xavier, Bruna Petry e Gabriel Monteiro que durante esses anos de minha tese me inspiram pelo o equilíbrio entre a vida profissional e pessoal: vocês possuem influências diretas na minha vida

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, pela orientação, apoio e suporte, mais do que isso, por ter acreditado em mim para desenvolver essa pesquisa.

À **Profª. Drª. Aline Silva Melo Cesar**, pela cumplicidade e suporte na elaboração da tese e condução do trabalho; Ao **Prof. Dr. Gota Morota** (Virginia Tech) pelo suporte técnico que possibilitou a elobaração da tese.

Aos **Dr. Mehdi Momen** e **Dr. Haipeng Yu**, por terem me ensinado os conceitos de redes bayesianas e análises de fatores, pela ajuda nas análises, suporte e a todos os bons momentos. Sempre dispostos a ajudar, esse trabalho não teria sido realizado sem vocês!

A **Bruna Petry** e a **Dr. Gabriel Monteiro**, sou grato por todos os momentos e todo conhecimento compartilhado.

As **Drª. Mirela** e **Drª Bárbara**, pela capacidade técnica e compromisso com a qualidade do projeto.

Aos meus grandes companheiros Pedro Xavier, Bruno, Nicolas, Deraldo e Sabrina com quem compartilhei risadas e bons momentos nesses últimos anos. Ao povo do BIOCEMA, pelas discussões geradas e auxílio nos amadurecimentos de ideias em qualidade de carne, integração de dados, bioinformática, genética e genômica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado (proc. 88882.328657/2019-01 e 88887.481294/2020-00) e estágio de pesquisa no exterior (PRINT proc. 88887.367967/2019-00).

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) e a todos seus funcionários pela estrutura e serviços prestados a esse estudo.

SUMÁRIO

RESUMO **6**
ABSTRACT **7**
1. INTRODUÇÃO **9**
1.1. Hipótese 10
1.2. Objetivo Geral 10
1.3. Objetivos específicos 10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **11**
2.1. Importância da qualidade da carne na pecuária brasileira 11
2.2. Estudos moleculares e dados ômicos 12
2.3. Estudos moleculares para maciez da carne na raça Nelore 12
2.4. Biologia sistêmica e sua relavância 14
2.5. Integração de dados ômicos 14
2.6. Desafios na integração de dados ômicos 16
3. MATERIAL E MÉTODOS **17**
3.1. Animais e coleta dos dados fenotípicos 17
3.2. Material utilizado nas análises ômicas e de integração 18
3.3. Processamento dos dados de mRNA e análise WGCNA 18
3.4. Aquisição e Processamento dos dados de miRNA 19
3.5. Aquisição e Processamento dos dados proteômicos 19
3.6. Análise de fatores 20
3.7. Redes Bayesianas 21
4. RESULTADOS **23**
4.1. Resultados da análise de fatores exploratória e análise de fatores confirmatória bayesiana 25
4.2. Correlações entre as variáveis latentes 31
4.3. Redes Bayesianas 31
5. DISCUSSÃO **34**
5.1. Relações entre as variáveis latentes e suas características biológicas 34
6. CONCLUSÕES **38**
REFERÊNCIAS **40**
APÊNDICES **50**

RESUMO

Integração de dados multi-ômicos para estudo de característica de produção, carcaça e qualidade da carne em gado Nelore

Características complexas, como a qualidade da carne, são reguladas por diversas moléculas, tornando difícil sua compreensão. A integração de dados ômicos vêm sendo utilizada para entender essas características. Porém, ao usar uma abordagem de análise hierárquica, baseada no dogma central, ou concatenar apenas o enriquecimento de vias comuns perde-se informação por não considerar relações não convencionais que existem entre os dados ômicos e fenótipos. Nesse trabalho, fenótipos de produção, qualidade de carcaça e carne, dados transcriptômicos, de miRNA e proteômicos de 102 animais Nelore foram utilizados em abordagem utilizando análise de fatores e redes bayesianas, integrando diferentes dados ômicos e características complexas de relevância econômica. Um total de 14 variáveis latentes foram identificadas: 5 para dados de fenótipo, 3 para miRNA, 4 para proteína e 2 para dados de genes. Uma rede com 14 variáveis latentes e 17 conexões direcionadas entre elas foi gerada. As relações têm direção: das variáveis latentes de Carcass, Meat Quality, prot2 e prot4 para REA (força 100%, 100%, 99,8% e 86,10%, respectivamente); das variáveis latentes de Meat Quality, REA, mirna2 e blue para Fat Content (força 99,8%, 89,3%, 89% e 86,4%, respectivamente); de prot1 e mirna2 para prot5 (força 100% e 91,9%, respectivamente); de prot5 e Carcass para prot2 (força 99,2% e 93,1%, respectivamente). As variáveis latentes de proteínas sugerem novas hipóteses do impacto dessas na área de olho de lombo e musculosidade. A rede demonstra uma relação entre miRNAs e isoformas da proteína nebulina que não seriam encontrados em estudos utilizando um dado ômico único ou estratégias multi-níveis. A área de olho de lombo aparece como um nó central na rede, sendo influenciado pela Carcass, prot2, prot4 e Meat Quality, sugerindo essa como uma característica a ser utilizada como parâmetro de mesuração para qualidade da carne em frigoríficos, devido sua facilidade de mensuração. Assim, a análise de fatores aplicada foi capaz de identificar variáveis latentes, diminuindo a dimensionalidade e a complexidade dos dados. A rede bayesiana gerou relações entre variáveis latentes de diferentes tipos de dados, permitindo integrar dados ômicos e fenótipos complexos, idenficar a independência condicional e determinar como esses fatores se relacionam, o que permitiria seu uso para gerar novas hipóteses em estudos moleculares na área da qualidade de carne. Utilizando o uso conjunto da abordagem EFA, BCFA e BN com diferentes tipos de dados, foi possível integrar e fornecer novas hipóteses para estudos de características complexas permitindo explorar relações não convencionais.

Palavras-chave: Biologia de sistemas, Bioinformática, Bovino, Rede Bayesiana

ABSTRACT

Multi-omics data integration for the study of production, carcass and meat quality traits in Nellore cattle

Complex traits are regulated by different molecular levels, that dificults its comprehension. Multi-omics data integration has been applied to understand these traits. Therefore, omics data integration using a hierarchical analysis approach, based on central dogma, or considering just the common pathways enrichment may not recognize non-obvious relationships that exist among omics data. Here we applied an approach using Factor Analysis and Bayesian Network to integrate different omics data and complex traits (production phenotypes and meat quality parametres). A total of 14 latent variables were identified: 5 for phenotype data, 3 for miRNA, 4 for protein, and 2 for gene data. A network conteining 14 latent variables and 17 directed connexion was generated. The children nodes with more parents had direction: from Carcass, meat Quality, prot2 and prot4 latent variables to REA (strength 100%,100%, 99,8% and 86.10%, respectively); from Meat Quality, REA, mirna2 and blue latent variables to Fat Content (strength 99.8%, 89.3%, 89% and 86,4%, respectively); from prot1 and mirna2 to prot5 (strength 100% and 91.9%, respectively); from prot5 and Carcass to prot2 (strength 99.2% and 93.1%, respectively). Here, protein latent variables suggest hypotheses for the impact of these proteins on ribeye area. The network also shows a relationship among miRNAs and nebulin protein isoforms. Moreover, the ribeye area seems to be a contral node on network, with influences of Carcass, prot2, prot4 e Meat Quality, suggesting this trait as a feasible phenotype for meat quality, due the facility to measure it. The factor analysis identified latent variables, decreasing the dimensionality and complexity of data. The Bayesian network was capable to generate a net of relationships among latent variables from different types of data, allowing to integrate omics data and complex traits, identifying the conditional independences and how these factors relate. The approach EFA, BCFA and BN could be used to generate new hypotheses on molecular research in the meat quality area, by integration from different types of data, exploring non-conventional relations.

.

Keywords: Systems biology, Bioinformatics, Bovine, Bayesian network

1. INTRODUÇÃO

Fatores atribuidos à qualidade de carcaça e à qualidade de carne são considerados importantes por sua relevância econômica, sendo compostas por várias características como: a área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea e a maciez da carne. A área de olho de lombo é uma característica utilizada como indicador de composição da carcaça e de musculosidade, principalmente relacionada ao rendimento dos cortes de alto valor comercial, como a picanha e o contrafilé (FILHO, 2000; ABERLE et al., 2012). A espessura de gordura subcutânea, medida de acabamento externo, tem relevância no processamento da carne atuando como isolante térmico durante o processo de resfriamento da carcaça, evitando assim, problemas como o encurtamento pelo frio (cold shortening), perdas por gotejamento, perda de peso e escurecimento da carne (FILHO, 2000; ABERLE et al., 2012). Já a maciez da carne é um importante atributo para os consumidores por estar associado com a aceitabilidade, e principalmente a recompra da carne (RUST et al., 2008). As características de qualidade da carne são complexas e influenciadas pela dieta, manejo pré-abate, manejo pós-abate, métodos de processamento e estocagem da carne, fatores genéticos e a interação genótipo-ambiente (WHEELER et al., 2005; ADZITEY, 2011; GUERRERO et al., 2013; NJISANE; MUCHENJE, 2016). Por serem características complexas, os mecanismos biológicos envolvidos que geram a variabilidade fenotípica ainda não são complemente compreendidos. Nesse contexto, a abordagem de biologia de sistemas tem o propósito de elucidar o fluxo de informações moleculares, gerando uma visão holística para características complexas, o que permitiria a geração de novas hipóteses para estudos acerca destas (IDEKER; GALITSKI; HOOD, 2001). A genômica e os dados ômicos intermediários (como transcriptômica, proteômica, expressão de microRNA e metabolômica, por exemplo) têm provido nas últimas décadas a arquitetura molecular dessas características complexas, identificando genes, moléculas, biomarcadores, vias metabólicas e redes de co-expressão associados a fenótipos de relevância econômica na pecuária (TIZIOTO et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; CESAR et al., 2014, 2016; NOVAIS et al., 2019). Entretanto, estudos utilizando uma única fonte de informação ômica desconsidera a interação entre os diferentes dados moleculares, postulados no dogma central da biologia molecular (RITCHIE et al., 2015a).

Características complexas são reguladas por diferentes níveis moleculares, o que torna difícil sua compreensão. A comunidade científica vem utilizando estudos multi-níveis, que integram diferentes dados ômicos para compreender a biologia de características economicamente relevantes em pecurária (WIDMANN et al., 2013; SURAVAJHALA; KOGELMAN; KADARMIDEEN, 2016). Porém, a integração de dados ômicos utilizando abordagens como análises hierárquicas (para identificação de eQTL's, pQTL's, mQTL's) ou análises ômicas únicas, que consideram apenas o enriquecimento de vias em comum, acabam não identificando relações não obvias que existem entre os dados ômicos (MISRA et al., 2018). Assim, esforços para o desenvolvimento de abordagens de integração de dados ômicos têm sido propostos (HUANG; CHAUDHARY; GARMIRE, 2017).

A análise de fatores é uma abordagem de modelos probabilísticos que reduz a dimensionalidade de um conjunto de dados por meio de variáveis latentes (não mensuradas diretamente) para explicar as dependências entre características (MENG et al., 2016). Em pararelo, as abordagens de aprendizado de máquinas (em inglês, *machine-learning*), um ramo da inteligência artificial, são métodos de análise de dados que automatizam a construção de modelos analíticos. Dentre esses, a rede bayesiana (BN) tem o potencial de gerar redes de relacionamento entre fenótipos e moléculas por meio de modelo-grafo de distribuições de probabilidade multivariada que mostra relações de dependência condicional entre os diferentes dados (RODIN; BOERWINKLE, 2005). Fenótipos de produção, carcaça, qualidade de carne e dados multi-ômicos (transcriptômicos, proteômicos e expressão de miRNA) foram

utilizados em uma abordagem de análises de fatores e redes Bayesianas, explorando a capacidade da abordagem na geração de novas hipóteses e compreensão biológica de características complexas.

Damos aqui continuidade ao trabalho desenvolvido pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular na Agropecuária e Ambiente (BIOCEMA/ESALQ/USP) que realiza pesquisas nas áreas de melhoramento genético e biotecnologia animal, sob a tutela do prof. Luiz Lehmann Coutinho. As informações geradas no projeto temático "Bases moleculares da qualidade da carne em bovinos da raça Nelore", com apoio da Fundação de apoio à pesquisa do estado de São Paulo (Proc. FAPESP 12/23638-8, coordenado pela Drª. Luciana C.A. Regitano, da Embrapa, São Carlos/SP) que buscou identificar novos genes, funções biológicas e genes reguladores para a qualidade de carne usando abordagens de associação genômica (painel de SNPs e CNV), análise do genoma funcional (mRNA, miRNA), proteômica e metabolômica, agora são utilizadas como base para essa tese.

1.1. Hipótese

O presente trabalho tem por hipótese alternativa que a utilização concatenada de análises de fatores e redes Bayesianas, aplicada a diferentes fontes de dados moleculares e características complexas, gera uma rede reduzida de informações interrelacionadas que auxilia na geração de hipóteses para características complexas de relevância econômica para pecuária.

1.2. Objetivo Geral

A abordagem de análises de fatores e redes Bayesianas integra dados ômicos e fenótipos formando uma rede de conexões probabilística capaz de auxiliar na geração de novas hipóteses para características complexas com relevância econômica.

1.3. Objetivos específicos

a) Aplicar a metodologia de análise de fatores exploratória nos dados fenotípicos, transcriptômicos, proteômicos e de expressão de miRNA, idenficando variáveis latentes e diminuindo a dimensionalidade dos dados.

b) Aplicar a metodologia de análise de fatores confirmatória nos dados fenótipicos, transcriptômicos, proteômicos e de expressão de miRNA, confirmando os modelos probabilísticos dessas variáveis latentes e assumindo-os como novos fenótipos.

c) Aplicar a metodologia de redes bayesianas sobre essas variáveis latentes e gerar uma rede grafo com as dependências probabilísticas condicionais entre essas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da qualidade da carne na pecuária brasileira

O Brasil contribui com 25% da exportação mundial de carne bovina, tendo posição de destaque como maior produtor e exportador de carne do mundo (USDA, 2021). Em soma, há uma expectativa de que até 2024 a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado internacional (USDA, 2017). Assim, o país para se manter em destaque no cenário internacional deve acompanhar aumentos de demanda internos e externos (MAPA, 2016), baseado no aumento de produtividade e da qualidade da carne. Nesse contexto, a carne brasileira ainda é vista como de menor qualidade, principalmente por ser deficiente em características de qualidade como cor, sabor e maciez, prejudicando o acesso a mercados mais exigentes (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Atualmente, frigoríficos interessam-se por carcaças volumosas em músculos e com certo acabamento de gordura, para que durante o resfriamento: (i) seja evitado o encurtamento excessivo do sarcômero pelo frio, o que ocasiona a redução da maciez (SAVELL; MUELLER; BAIRD, 2005); (ii) as perdas de água sejam baixas mantendo o bom aspecto visual dos cortes (BONIN, 2012). Para o consumidor a gordura proporciona sabor, tornando importante sua presença subcutânea e intramuscular na carne (marmoreio). Além disso, aspectos físicos de textura, como a maciez, também são importantes (MÜLLER, 1987; RUST et al., 2008).

A maciez é um dos principais aspectos físicos da carne bovina, associado principalmente ao ato de recompra do alimento (RUST et al., 2008). De acordo com Weir (1960), a sensação de maciez ao paladar inclui textura e envolve basicamente três propriedades:(i) a facilidade inicial da carne penetrar pelo dente; (ii) a capacidade da carne de se quebrar em fragmentos menores; (iii) a quantidade de resíduos cárneos após a mastigação. O grau de maciez pode ser relacionado a três aspectos biológicos do músculo: (i) proteínas do tecido conjuntivo (principalmente colágeno, elastina e reticulina); (ii) proteínas da miofibrila (actina, miosina e tropomiosina); (iii) proteínas do sarcoplasma (LAWRIE, 2004).

Os principais fatores que contribuem para a complexidade da maciez da carne tem sido relacionados ao manejo pré-abate (DIKEMAN et al., 2005), ao post-mortem e ao pH final (SHACKELFORD et al., 1994), à ação de catepsinas, ao sistema calpaína/calpastatina, à protease (OUALI et al., 2006), ao conteúdo de colágeno, à degradação miofibrilar (SIFRE et al., 2005), e às proteínas de choque térmico (BERNARD et al., 2007; MORZEL et al., 2008). Apesar da importância da maciez na satisfação do consumidor, a indústria não incorpora essa característica no processo de classificação e remuneração de carcaças, por limitação do método de mensuração na linha de produção (RUST et al, 2008).

Metodologias físicas e químicas objetivas foram desenvolvidas para mensurar a maciez em comparação aos tradicionais painéis sensoriais. Os métodos físicos incluem o princípio de mensurar a força de cisalhamento (WARNER, 1928; WINKLER, 1939), de penetração (TRESSLER; BIRDSEYE; MURRAY, 1932; LOWE, 1934), compressão (SPERRING; PLATT; HINER, 1959) e alongamento da carne (WANG et al., 1956). Já os métodos químicos envolvem determinação do tecido conjuntivo ((LOWRY; GILLIGAN; KATERSKY, 1941; NEUMAN; LOGAN, 1950) e digestão enzimática (SMORODINTZEV, 1934).

Uma alternativa para inserção dessa característica no sistema produtivo nacional seria por meio da seleção de animais com maiores graus de maciez. Porém, uma herdabilidade de baixa a moderada é reportada para força de cisalhamento, sendo de 0,11 a 0,53 para raças taurinas (SHACKELFORD et al., 1994; WULF et al., 1996; ZWAMBAG et al., 2013) e 0,11 a 0,19 para raça Nelore (TIZIOTO et al., 2013; CASTRO et al., 2014;

MAGALHÃES et al., 2016). Por isso, entender os mecanismos fisiológicos por meio das informações ômicas poderia impulsionar a compreensão da variação genética e fenotípica da maciez da carne, de forma a incorporá-la dentro da cadeia produtiva da carne, seja na forma de seleção de animais seja por meio de biomarcadores associados a essa.

2.2. Estudos moleculares e dados ômicos

A adição do sufixo "ômicas", que é uma neologia da língua inglesa (Omics), a um termo que conota um conjunto de moléculas (genes, proteínas) vem sendo utilizado para se referir a técnicas moleculares de obtenção de informação massiva de moléculas que dão funcionalidade a um organismo (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Hasin, Seldi e Lusis (2017) resumem definições e características dos diferentes dados ômicos que podem ser utilizados, dentre estes, genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e microbiômica. Esses dados ômicos são comumente estudados de forma isolada para procurar sua associação com determinado fenótipo de interesse, revelando sua importância e contribuição no metabolismo do mesmo. Essa abordagem, entretanto, não considera as interações entre diferentes biomoléculas, reconhecidas pelo dogma central da biologia molecular. O dogma central da biologia molecular é uma teoria, proposta por Francis Crick em 1970, que descreve o fluxo de informações genéticas do DNA para o RNA, e após, para as proteínas que ocorre em um sistema biológico e leva à determinação do *"status"* celular.

O dogma central pode ser pensado como o primeiro passo teórico para a integração de dados. Além disso, a importância desse conceito só aumentou nas últimas décadas, principalmente após o sequenciamento de todo o genoma humano em 2001, com o Projeto Genoma Humano *("Initial sequencing and analysis of the human genome*", 2001). Além das melhorias em técnicas de alto rendimento (por exemplo, sequenciamento de próxima geração (VAN VLIET, 2010), espectrometria de massa (EDWARDS; RUPAREL; JU, 2005)), que permitiram acesso econômico a medições de diferentes níveis moleculares. Essas melhorias tecnológicas, juntamente com a disponibilidade de diversos repositórios de dados acessíveis, como *The Cancer Genome Atlas Project* (TCGA) (WEINSTEIN et al., 2013) ou *The Encyclopedia of DNA Elements Project* (*THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM*, 2012), levam ao que pode ser chamado de "Revolução Ômica" (KANDPAL; SAVIOLA; FELTON, 2009). No entanto, apesar dessa grande quantidade de informações, existe agora a necessidade de métodos analíticos adequados, de forma a melhorar a integração multi-ômicos (NARDINI; DENT; TIERI, 2015), permitindo explorar adequadamente toda essa quantidade massiva de dados.

2.3. Estudos moleculares para maciez da carne na raça Nelore

Nas últimas décadas, o entendimento de características complexas deram-se principalmente aos avanços tecnológicos na geração de informações moleculares de diferentes níveis do sistema biológico: incluindo plataformas *microarrays* com conjuntos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (BIER et al., 2007), sequenciamento de DNA (METZKER, 2010), sequenciamento de RNA e seus níveis de expressão (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011), padrões de metilação (LAIRD, 2010), estudo *untargeted* de proteínas (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013) e de metabólitos (SHULAEV, 2006).

Estudos utilizando informações genômicas para maciez vem auxiliando no esforço de encontrar uma maneira indireta de inseri-la na indústria. Tizioto e colaboradores (2013), realizando estudo de associação ampla (GWAS) para a força de cisalhamento em animais da raça Nelore encontraram 56 genes candidatos para maciez da carne e QTL's de efeitos pequenos. Os SNP's *CAPN4751* (localizado no gene *CAPN1*), *UOGCAST1* e *WSUCAST* (localizados no gene CAST), foram descritos como possíveis marcadores genéticos para maciez possuindo efeitos por substituição alélica em bovinos Nelore (PINTO et al., 2010). Já, Magalhães e coautores (2016) realizando GWAS em 1630 animais Nelore reportaram SNPs nos cromossomos 5,7,10,14 e 21 associados para maciez da carne e que explicam 3,8% da variação genética aditiva. Esses polimorfismos presentes nos genes *PLAG1, SLC27A2, RB1CC1, HDC, LYPLA1, XKR4 e TMEM68* estão relacionados com crescimento e desenvolvimento muscular.

Silva e colaboradores (2016), detectaram em bovinos Nelore 2.649 regiões de variações no número de cópias do DNA (CNV) sendo, 236 regiões associadas à maciez da carne. Essas regiões repetidas englobariam genes que desempenham funções em processos proteolíticos, que possuem contribuição para a maciez da carne (NOWAK, 2011; LI; XU; ZHOU, 2012). Outras abordagens ômicas que não utilizam sequências de DNA também têm sido utilizadas na busca do entendimento da maciez da carne.

Carvalho et al. (2014) utilizaram 138 animais que foram avaliados por força de cisalhamento e separados em dois grupos de 6 animais divergentes para maciez. A abundância de proteínas no músculo *longissimus thoracis* dos animais selecionados foram quantificadas por espectrômetro de massas, e 13 proteínas foram diferencialmente expressas. Essas proteínas incluem proteínas estruturais (*alpha actin-1, MLC1, MLC3, MLC2F* e *tropomyosin*), proteínas de choque térmico (*HSPB1* e *HSP70*), envolvidas no metabolismo (*beta-LG, ACBD6* e *Complex III subunit I*). Em outro estudo, contendo 155 animais da raça Nelore que foram genotipados para os genes *CAPN4751* e *UOGCAST,* o genótipo CC foi associado a maior maciez da carne em relação ao animais com genótipo TT em ambos genes (ROSA et al., 2018). Esses autores também relataram 8, 11 e 19 proteínas com efeito provindo do polimorfismo no gene *CAPN4751, UOGCAST* e das interações entre os dois genes, respectivamente. Dentre esses estão proteínas como miosina *(MYL1, MYL2, MYLPF* e *MYL6B)*, actina (*ACTA1* e *CAPZβ*), troponina (*TNNT1* e *TNNT3*) e proteínas de choque térmico (*HSPB6, HSPB1* e *HSP70-2*).

Kapperler et al. (2019), em trabalho utilizando 37 animais em dois grupos divergentes ranqueados por maciez da carne aos 14 dias de maturação, idenficaram os miRNAs bta-mir-182 e bta-mir-183 como mais expressos no grupo de baixa maciez, e o bta-mir-338 como mais expresso no grupo de alta maciez. Os autores idenficaram importantes vias metabólicas relacionadas a maciez, como processos apoptóticos e do sistema capaína-calpastatina, evidenciando a ação desses miRNAs no processo de proteólise. Gonçalves et al. (2018), por meio da técnica de sequenciamento de RNA mensageiro total (RNA-seq), idenficaram 22 transcritos diferencialmente expressos em 2 grupos divergentes para maciez da carne contendo 14 animais Nelore cada. Esses transcritos provindos de genes já descritos em processos como sinalização de cálcio, apoptose e proteólise. O trabalho ainda utiliza-se da metodologia *Regulatory Impact Factor* (HUDSON; REVERTER; DALRYMPLE, 2009) identificando os miRNAs bta-mir-133a-2 and bta-mir-22 como candidatos reguladores para maciez da carne.

Esses estudos mostram a importância de mecanismos genéticos no controle da maciez da carne e vêm contribuindo de forma significativa no entendimento desse fenótipo. Porém, dada a complexidade da característica, fica limitada a compreensão, a partir da análise de um único tipo de informação ômica, de como esses mecanismos moleculares se relacionam para explicarem a variabilidade da característica pela ação aditiva e ambiental.

2.4. Biologia sistêmica e sua relavância

A crescente disponibilidade de dados que descrevem características complexas desafiou o dogma central da biologia molecular, gerando teorias alternativas que deram novas perspectivas ao campo da integração de dados multi-ômicos. A investigação mais aprofundada dos processos bioquímicos, permitida pelo advento de tecnologias recentes, revelou interações moleculares que não foram levadas em consideração, originalmente, por Crick. Os exemplos são: transcrição reversa (síntese de DNA por meio de molde RNA (BROSIUS, 1999, 2003), processamento de RNA pós-transcrição (HOUSE; LYNCH, 2008) e modificação de proteína pós-tradução (por exemplo, metilação de proteínas (LEE et al., 2005), cis- e trans-*splicing* (SALEH; PERLER, 2006)). Com base nessas descobertas, que em 2009, James Shapiro reformulou o dogma central, afirmando, por exemplo, que o fluxo de informações de uma camada molecular para as outras não é unidirecional e/ou hierárquica. O pesquisador também afirmou que cada elemento do genoma interage direta ou indiretamente com muitos outros componentes ômicos. Poucos anos depois, em 2012, Denis Noble propôs uma teoria de que não há hierarquia em sistemas biológicos, ou seja, não se pode assumir que um organismo é completamente definido apenas por seu genoma. Noble mostrou que os sistemas de feedback entre as camadas moleculares não só existem, mas são partes necessárias dos processos biológicos.

De acordo com Ritchie e colaboradores (2015), cada tipo de dado molecular, compreendendo variações de sequência de DNA, de expressão gênica, concentração de proteínas e metabólitos, tem sido considerado independentes para analisar processos biológicos. A biologia sistêmica se baseia no conceito de que as características são uma consequência da complexa interação entre genes, proteínas, células e tecidos, assim a visão compreensiva sobre uma característica de interesse econômico pode ser melhorada a partir da integração de dados (VOY, 2011; MISRA et al., 2018). A combinação de múltiplos dados moleculares pode compensar a perda ou incerteza de informações provindas dos dados em separado e, evidenciar os genes e vias metabólicas inconsistentes que podem gerar resultados falso positivos (RITCHIE et al., 2015a).

Há, de forma prática, duas estratégias aplicadas aos métodos de integração de dados, que podem ser categorizados como análises multi-níveis e análises meta-dimensionais. Nas análises multi-nível os modelos, que descreverão a variabilidade fenotípica, são construídos usando somente dois tipos de dados em escalas diferentes por vez, por exemplo, polimorfismos em DNA e expressão gênica (SCHADT et al., 2005). Nessa estratégia, a hipótese assumida é hierárquica e linear, de tal modo que a variação do DNA lidera a alteração de expressão gênica, que leva mudanças na expressão de proteína ou metabólitos que alteram o fenótipo, ou seja, uma hipótese etiológica. Já nas análises meta-dimensionais, as escalas dos dados são combinadas simultaneamente, considerando a complexidade entre os níveis moleculares para predizer dado fenótipo (KIM et al., 2015; YUGI et al., 2016). De tal forma que a hipótese considera que a variação molecular dos diversos níveis que contribuem para a característica não seja linear e sim, interativa e complexa.

2.5. Integração de dados ômicos

O campo da integração de dados multi-ômicos (*multi-omics*, em inglês) está se modificando de estudos multi-níveis para estudos meta-dimensionais. Ou seja, as metodologias estatísticas estão sendo aprimoradas para incluir mais de dois tipos de dados ômicos e levar em consideração as relações entre eles. Nesta seção, explora-se uma visão geral das metodologias estatísticas que estão na base das técnicas de integração simultânea. Essas

metodologias foram geralmente propostas para atender aos requisitos de integração de ômicas par a par, ainda considerando a importância da integração multi-nível e baseada no conhecimento biológico. Outro aspecto importante a se considerar é como as informações sobre o fenótipo serão usadas durante a integração. Com isso em mente, as metodologias estatísticas podem ser divididas em abordagens supervisionadas ou não supervisionadas.

Abordagens de integração supervisionada consideram os grupos a que a amostra pertence (por exemplo, doença / normal, controle / tratamento) (HUANG; CHAUDHARY; GARMIRE, 2017), utilizando essa informação para descobrir interações genótipo-fenótipo (WANG; GU, 2016) e para aprender algo mais sobre o processo biológico estudado. Por outro lado, as abordagens de integração não supervisionada visam realizar uma inferência dos dados sem ter acesso aos grupos que cada amostra pertence. Huang, Chaudhary e Garmire (2017) trazem uma revisão sobre os métodos aplicados em cada umas dessas abordagens.

Do ponto de vista matemático, os dados ômicos medidos são considerados como matrizes $X_1, \ldots, X_k$ de dimensão $n \times p_k$. Em que n representa o número de amostras p_i (sendo $i = 1 \ldots k$) é o número de características biológicas coletadas em cada ômica X_i. A fatoração de variáveis latentes e redes são ferramentas matemáticas frequentemente utilizadas como ponto de partida para o desenvolvimento de métodos integrativos.

A fatoração de variáveis latentes concentra-se em projetar variações que ocorrem em diferentes camadas biológicas reduzindo assim a dimensão dos dados. Este objetivo é obtido pela fatoração das matrizes $X1, \ldots, Xk$ em *Loadings* F_i (de dimensão $n \times r$) e fatores Q_i (de dimensão $p_i \times r$, também chamadas de variáveis latentes) adicionados a um termo de erro:

$$X_i = F_i Q_i^T + E \quad \therefore i = 1 \ldots k$$

O número de colunas r de F_i e Q_i, sendo $r < p_i$, representa o número de componentes latentes usados para construir a nova matriz de baixa dimensão. A partir desse modelo, diferentes métodos podem ser desenvolvidos de acordo com a relação multi-ômica que se busca. A maneira como essas interações são calculadas e quais restrições devem ser impostas devem ser consideradas para construir um modelo.

Outra abordagem, as redes do tipo grafo representam uma ferramenta poderosa no contexto da integração de dados, uma vez que são capazes de conter informações heterogêneas e de alta dimensão. Uma rede G é definida pelo par $G = (V, E)$, onde $V = (v_1, \ldots, V_n)$ é um conjunto de nós (variáveis) enquanto $E = \{e_{ij}, i, j = 1, \ldots, n\}$, é um conjunto de arestas conectando os nós V, onde e_{ij} representa a conecção entre os nós v_i e v_j. Um peso (força) w_{ij} pode ser associado à aresta e_{ij} para descrever a importância da conexão. As redes podem caracterizar interações complexas, identificando assim mecanismos ligados a diferentes tipos de informação (HUANG; CHAUDHARY; GARMIRE, 2017) e associados ao fenótipo de interesse. As redes também podem ser empregadas como fonte de conhecimento prévio, na geração de novas hipóteses, descrevendo processos e funções biológicas (WANG; GU, 2016), auxiliando na interpretação dos dados.

As abordagens baseadas em rede para integração de dados multi-ômicos tiram proveito de algoritmos da teoria dos grafos, como processos de difusão (CUN; FROHLICH, 2014; WANG et al., 2014) ou extração de sub-rede (LI et al., 2011; MOSCA; MILANESI, 2013). De acordo com o que os nós e arestas representam, bem como o tipo de interações intermediárias pesquisadas, as arestas podem ser construídas de diferentes maneiras (WANG et al., 2015). As redes bayesianas, por exemplo, permitem o uso de informações *a priori* para capturar dependências condicionais entre eventos probabilísticos (PE'ER, 2005): probabilidades são usadas para definir as relações entre os nós (ALTEROVITZ et al., 2007). Finalmente, as redes de correlação, como as geradas pelo método Weighted

Correlation Network Analysis (WGCNA) (LANGFELDER; HORVATH, 2008), são baseadas na correlação (ou na significância da correlação) entre os nós.

2.6. Desafios na integração de dados ômicos

Os principais desafios da integração de dados multi-omics são a heterogeneidade dos dados e a complexidade das interações inter e intraômica. A heterogeneidade de dados refere-se a medições de plataformas diferentes que geralmente não são feitas na mesma escala ou têm distribuições diferentes. Os métodos estatísticos devem, portanto, garantir que os resultados não sejam tendenciosos para ômicas com maior dimensão ou maior variância. Este problema pode ser superado padronizando os dados ou reduzindo-os, deixando somente informações revelantes por meio de abordagens de seleção de recursos (HIRA; GILLIES, 2015). As interações e co-variações de interômicas devem ser reveladas sem perder informações que são intrínsecas em dado particular (sem causar alterações intraômicas). Resultados biologicamente significativos podem ser suportados por sinais mais fracos envolvendo mais ômicas ou fortemente induzidos por um único tipo de dado. Assim, os algoritmos de integração multi-ômica devem ser capazes de modelar as relações intra e interômicas significativas, para fornecer uma visão completa do problema em questão. A relevância desses desafios é intensificada quando os métodos de integração são estendidos para suportar mais de dois dados ômicos, casos que serão considerados nesta tese. Apesar da combinação de mais níveis biológicos implicar em traçar um quadro mais completo de características complexas e economicamente relevantes, também se aumenta a complexidade para sua interpretação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e coleta dos dados fenotípicos

Um total de 386 novilhos da raça Nelore, filhos de 32 touros representativos das principais linhagens comercializadas no Brasil, nascidos em 2009, 2010 e 2011 e confinados na Empresa Brasileira de Pesquisa Pecuária (EMBRAPA) Sudeste, localizado na cidade de São Carlos/SP (Proc. FAPESP 12/23638-8) foram inicialmente considerados nesse estudo. Os animais foram criados em confinamento sob mesma dieta, condições ambientais e abatidos quando haviam atingido 5 milímetros (mm) de espessura de gordura subcutânea, com médias de peso e idade de 383,2 Kg e 734 dias, respectivamente (CESAR et al., 2014).

Anteriormente ao abate, avaliações de carcaça foram feitas por ultrassonografia e obtidos por um técnico de campo treinado e seguindo o conjunto de padrões do Conselho de Protocolos de Ultrassonografia (UGC; www.ultrasoundbeef.com). Um aparelho ultrasom Aquila Pie Medical (Aquila, Esaote Pie Medical, Inc., Masstricht, Holanda) equipado com um transdutor linear longo de 172mm em uma frequência de 3,5 megahertz (MHz) foi utilizado para mensurar a área de olho de lombo inicial (REAi) e a espessura de gordura subcutânea inicial (BFTi), obtidas por imagens transversais do músculo *Longissimus dorsi* (LD) entre as entre a 12ª e 13ª costela. As imagens foram armazenadas e mensuradas em extensão *Open Data Transfer* (ODT) no visualizador Eview (*Echo Image*. Viewer), versão 1 (Aquila, Esaote Pie Medical, Inc., Masstricht, Holanda). Os detalhes das avaliações da qualidade da carne foram previamente descritos por Nascimento, et al.. (2016). Brevemente, durante o abate os órgãos viscerais foram removidos e coração, rim, fígado e as gorduras ignais, perirenais e pélvicas pesados. As carcaças foram pesadas e resfriadas por 24 horas à 5 ºC. Após, as carcaças foram novamente pesadas e a profundidade de carcaça foi mensurada na 5ª costela, de cima pra baixo, compreendendo a distância entre o esterno até metade da espinha onde passa a medula óssea.

Após o abate, bifes foram embalados a vácuo e utilizados para posterior mensuração da força de cisalhamento (SF, em Kg), espessura de gordura subcutênea final (BFTf, em mm), área de olho de lombo final (REAf, em cm²), parâmetros de cor: L* (luminosidade); a* (coordenada vemelho/verde); e b* (coordenada amarelo/azul), índice de fragmentação miofibrilar (IMF), pH às 24 horas, umidade, capacidade de retenção de água e perda por cocção e gordura intramuscular (MFI, mensurada por extrato etéreo).

Resumidamente, BFTf foi mensurada utilizando uma régua milimetrada (FILHO, 2000), os parâmetros de cores (L*, a* e b*) foram mensurados, após os bifes ficarem expostos ao oxigênio atmosférico por 30 minutos, utilizando-se um colorímetro modelo Hunter lab MiniScan XE Universal Software v. 4.10 (*Hunter Associates Laboratory*, Reston, VA, Estados Unidos), fonte de luz D65, e padrão-observador 10º. O pH do músculo foi mensurado em 3 (três) diferentes pontos do bife por meio do instrumento de mensuração Testo pH modelo 230 (Testo, Lenzkirch, Alemanha). A REAf foi calculada utilizando o sistema geométrico de uma grade com quadros de 1 cm². Para MFI, aproximadamente 100g de amostras, sendo previamente moídas, foram liofilizadas utilizando-se um extrator Ankom XT20 (*ANKOM Technology* , Macedon, NY, Estados Unidos) seguindo procedimento Am 5-04 (HORWITZ, 2000).

Para o estudo de maciez da carne, a metodologia descrita por Wheeler, Koohmaraie e Shackelford (1995) foi aplicada. O fenótipo de força de cisalhamento (SF) foi medido a partir de bifes de 2,54 cm de espessura, coletados 24 horas após o abate, na seção transversal do músculo *Longissimus dorsi* entre a 12ª e 13ª costela. Após, foram embalados a vácuo e mantidos a 2 °C em câmara fria (Macquay Heatcraft do Brasil Ltda., São José dos

Campos, SP, Brasil) para maturação de 24 horas (SF), sete e quatorze dias (TIZIOTO et al., 2013). Então, os bifes foram pesados e cozidos em forno combinado modelo TC06 (Tedesco, Caxias do Sul, RS, Brasil), à 170 °C até que a temperatura no centro de cada amostra, controlada por termopares ligados ao programa de computador FE- MUX (Flyever, São Carlos, SP, Brasil), atingisse 70 °C. Após 24 horas, a medida da SF foi realizada nas amostras armazenadas 4 ºC, com analisador de textura TA – XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK), acoplado a uma lâmina de Warner-Bratzler com espessura de 1.016 milímetros, que determina a força necessária para cortar o cilindro de carne, sendo a mesuração considerada como a força média para cortar 3 cilindros de cada bife.

3.2. Estrutura de Tecnologia da informação utilizado nas análises ômicas e de integração

Todas as análises e integrações foram realizadas no servidor SGI do BIOCEMA contendo 1.5Tb de memória RAM, 28Tb de disco, 96 processadores físicos com HyperThreading habilitado, resultando em 192 processadores lógicos. Sistema operacional Debian GNU/Linux 9 (stretch), com ampla coleção de programas de análise de bioinformática instalados.

3.3. Processamento dos dados de mRNA e análise WGCNA

O RNA total de 200 novilhos foi extraído a partir de 100 mg do músculo *L. dorsi* utilizando TRIzol® (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras apresentando integridade de RNA (RIN) abaixo de 7 foram removidas nas análises subsequentes. As etapas de preparo das bibliotecas e sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômica da ESALQ, em Piracicaba/SP, Brasil. O tamanho médio das bibliotecas de cDNA foi estimado utilizando *Agilent Bioanalyzer* 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) e quantificados utilizando PCR com kit KAPA *Library Quantification* (KAPA Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Esses dados provêm de trabalho realizado por Cesar, et al (2018).

Um total de 2 µg de RNA de cada amostra foi utilizado para preparação da biblioteca de DNA complementar (cDNA), de acordo com o protocolo descrito em *TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 guide* (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). As bibliotecas foram sequenciadas pelo *HiSeq2500 ultra-high-throughput sequencing system* (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) com o kit *TruSeq SBS kit v3-HS* (200 ciclos), como descrito em CESAR et al. (2015). Após o sequenciamento, sequencias referentes aos adaptadores e os *reads* de baixa-complexidade foram filtrados e removidas. Para checagem da qualidade dos dados sequenciados foi utilizado o *software* The FastQC versão 0.10.1 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/).

O alinhamento dos *reads* com o genoma de referência *Bos taurus taurus* versão ARS-UCD1.2 (Disponível na base de dados Ensembl: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.1) e a contagem de reads foram obtidas pela ferramenta STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) versão 2.7 (DOBIN; GINGERAS, 2015) com arquivo de anotação de gene Ensembl (*release* 95, janeiro de 2019). Nesse estudo foi utilizado *reads* mapeados em cromossomos conhecidos e excluídos aqueles com contagem zero em todas as amostras. Utilizando o pacote R EdgeR (CHEN et al., 2018b) os dados foram filtrados e somente contagens diferentes de zero em pelo menos 70% das amostras e com *Counts per Million* (CPM) maior que 5 (cinco) foram mantidos. Por fim, as contagens foram normalizadas utilizando-se pacote R DESEq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e efeitos de *batches* (ou seja,

processados juntos no mesmo equipamento, ao mesmo tempo) foram removidos utilizando o pacote R LIMMA (RITCHIE et al., 2015b).

Análises de agrupamento por co-expressão gênica foram realizadas utilizando o pacote R *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA) (LANGFELDER; HORVATH, 2008). Os parâmetros aplicados foram *soft threshold* igual a 6 e o critério de topologia de escala livre (R^2) igual a 0.8. Os módulos contend ao menos 30 genes foram mantidos. Para a análise de fatores confirmatória foram considerados genes que possuiam *module membership* (MM) > 0.95 e *gene significance* com p-valor < 0,001. O enriquecimento funcional dos genes pertencente aos módulos que passaram na filtragem foi realizado utilizando-se o *software* MetaCore ("MetaCore MetaCore Login | Clarivate. Disponível em: https://portal.genego.com/ Acessado dia 08 de junho de 2021") para elucidar processos e vias metabólicas representado pelos genes dos módulos.

3.4. Aquisição e Processamento dos dados de miRNA

Esses dados provêm do trabalho realizado por Kappeler et al. (2019). Resumidamente, biobliotecas de micro-RNAs foram construidas a partir de 1 µg de RNA total de cada amostra por meio do kit de preparação de amostras *Illumina TruSeq small RNA Sample Prep Kit* (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a determinação da qualidade da biblioteca foi utilizado o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) e qPCR com o kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) empregado na quantificação. O sequenciamento desses miRNAs foi performado usando kit Miseq Reagent 3 adaptado com 150 ciclos em aparelho *Illumina Miseq Sequencing System* (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos). As leituras obtidas foram single reads de 36 pares de bases (pb). O *software* Illumina CASAVA versão 1.8 foi empregado para gerar as sequências dos arquivos brutos fastq. A qualidade do sequenciamento foi obtida por meio do programa FastQC versão 0.9.5 (ANDREWS, 2010).

Adaptadores e *reads* de baixa qualidade foram retirados por meio do programa Cutadapt versão 1.2.1(MARTIN, 2011). Os *reads* remanecentes foram então processados segundo manual de análises do programa mirDeep2 (FRIEDLÄNDER et al., 2012). Então, as sequências foram alinhadas com genoma de referência *Bos taurus taurus* versão ARS-UCD1.2 e alinhamentos com os primeiros 18 nucleotídeos correspondentes (*seed region*) foram mantidos. Após, miRNAs foram filtrados e mantidos se possuissem contagens diferentes de zero em pelo menos 70% das amostras e CPM maior que 5 (cinco) utilizando o pacote R EdgeR (CHEN et al., 2018b). As contagens de miRNAs foram normalizadas utilizando o pacote R DESEq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e os efeitos de *batches* removidos utilizando LIMMA (RITCHIE et al., 2015b).

3.5. Aquisição e Processamento dos dados proteômicos

Amostras de 500µg de bifes congelados de 106 animais foram moidos em nitrogênio líquido e depois transferidos para eppendorfes e liofizados para minimizar a degradação de proteínas. As amostras foram homogenizadas em 2,5 mL em tampão de lise contendo 8 M de Uréia, 2 M de Tiuréia, 1% ditiotreitol (DTT), 2% de zwitteriônico (CHAPS) e 1% de inibidor de Protease (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) em um homogenizador ULTRA-TURRAX® IKA em gelo por 2 minutos. Os extratos foram agitados por 30 minutos em gelo, logo após, centrigurados por 30 minutos a 4 ºC a 10.000 x g. Os supernadantes foram coletados e a

concentração total de proteína foi determinada pelo kit PlusOne 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Chigado, IL, Estados unidos). Por fim, armazenados a -80 ºC para análises posteriores.

Os extrados foram desalinizados com 3-kDa cutoff Amicon® Ultra centrifugal filter (Millipore, Irlanda), e o tampão de lise com solução de 50 mM de bicarbonato de amônia e 2 M de Uréia foi utilizado como lavagem por 5 vezes. A concentração da solução protéica foi quantificada utilizando-se kit *Bradford Protein Assay Kit* (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Para digestão das proteínas, 50 µg de proteínas de cada amostras foi denaturada com 25 µL de 0.2% RapiGest SF (Waters Corporation, Milfort, MA, Estados Unidos) por 15 minutos a 80 ºC , após reduzido com 2.5 µL de 100 mM DTT por 30 minutos a 60 ºC, e alquilado com 2.5 µL de 300 mM de Iodoacetamida (AA) em temperatura ambiente em sala escura por 30 minutos. A digestão enzimática foi realizada com Tripsina (Madison, WI, Estados Unidos) em proporção enzima:proteina 1:100 (p/p) por 16 minutos a 37 ºC. Então, a digestão foi interrompida com a adição de 10 µL de 5% (V/V) de ácido trifluoracético e incubado por 90 minutos a 37 ºC , hidrolisando o RapiGest SF (YU et al., 2003). A solução, agora de peptídeos, foi então centrifugada a 18.000 x g por 30 munitos a 6 ºC. Após, o supernadante foi transferido para novos ensaios, secados em centrífuga a vácuo e amarzenados e -20 ºC.

Análises bidimensionais qualitativas e quantitativas foram realizadas em nanoUPLC tandem nanoESI-HDMSE, ambas por 1 hora em fase reversa em gradiente na fase móvel de 7% a 40% (v/v) acetonitrilo (0.1% v/v ácido fórmico) e 500 $nL*min^{-1}$ em um aparelho nanoACQUITY UPLC 2D *Technology system* (GILAR et al., 2005). Uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm, 75 µm x 15 cm em pH 3 foi utilizada como fase estacionária. A condutância de íons foi ativada em nitrogênio gasoso, operando a 40 $\Omega/\Delta\Omega$ (LALLI et al., 2013). A resolução efetiva da condutância dos íons foi >1,5 M FWHM (SILVA et al., 2014). A ionização das amostras foi realizada usando uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters, Manchester, Reino Unido) no modo iônico positivo nanoESI (+). O espectrômetro de massas tandem (MS/MS) com espetro em solução *[Glu1]-Fibrinopeptide B human* (Glu-Fib) (100 $fmol*uL^{-1}$) foi utilizado em *lock mass* na fonte do NanoLockSpray. A aquisição dos dados foi obtida por meio do espectrômetro de massas Synapt G2-S HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) em amplitude de massa-carga de 50 a 2000 m/z.

Os dados do espectrômetro de massas foram adquiridos pelo programa vendor da Waters, o MassLynx versão 4.1, e o processamento foi realizado por meio do programa Progenesis QI para proteômica (QIP) versão 2.0 (Nonlinear Dynamics, Reino Unido). Após, foram realizadas as etapas de pré-processamento que incluem: alinhamento das corridas, identificação dos picos, correção do tempo de deriva dos íons, mensuração das abundâncias dos ínos, normalização, quantificação, identificação dos peptídeos e proteínas e análises estatísticas descritivas. Então, foram realizadas as etapas de processamento que incluem: tolerância automática para ínos precursores e produtos baseados na idenficação dos peptídeos com distribuição normal (GEROMANOS et al., 2009), identificação de peptídeos com sítios internos de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteína como modificador fixo, e oxidação de metionina como modificador variável. A qualidade dos dados foi avaliada de acordo com Souza, Guest e Martins-De-Souza (2017), e as proteínas foram mantidas se detectadas e idenficadas em pelo menos 80% de presença nas amostras. As proteínas idenficadas foram utilizadas como informações de entrada no banco de dados Uniprot da NCBI (https://www.uniprot.org/) para análise funcional. Esses dados foram obtidos em trabalho desenvolvido por Poleti et al. (2018).

3.6. Análise de fatores

A Análise Fatorial Exploratória (EFA) foi aplicada para construir as estruturas que foram utilizadas na Análise Fatorial Confirmatória (CFA). O EFA foi aplicado para pesquisar as estruturas provindas de variáveis latentes (também chamada de fatores) que contribuem para as características mensuradas, já que nesse trabalho não foram consideradas infomações *a priori* das relações entre as variáveis em estudo. A análise para determinar a estrutura das variáveis latentes foi realizada nos dados de fenótipo, perfil de expressão de miRNA e proteômica. Primeiro, o pacote R Caret (KUHN, 2008) foi usado para verificar a colinearidade e as características ou mensurações (*features*) com correlação > 0,9 foram removidos. Em seguida, o teste Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) foi aplicado para verificar se os dados eram adequados para EFA, e KMO> 0,7 foi considerado aceitável, usando o pacote Psych R (REVELLE, 2017).

O modelo EFA é dado por uma função das variáveis latentes:

$$Y = \Lambda F + \varepsilon ,$$

onde Y é uma matriz de características p x n; Λ é uma matriz p x q dos *loadings* dos fatores que indicam a relação comum entre as características e as variáveis latentes; F é uma matriz q x n de escores das variáveis latentes; e ε é uma matriz vetor p x n dos efeitos em comum não explicados pelas variáveis latentes. A matriz de variância-covariância d eY é:

$$\Sigma = \Lambda \Phi \Lambda' + \Psi ,$$

onde ∑ é uma matriz variância-covariância p x p das características mensuradas, Φ é a variância dos escores dos fatores, e Ψ é uma matriz diagonal p x p das variâncias únicas. Os elementos Λ, Φ e Ψ são os parâmetros do modelo a ser estimado pelos dados. Assumindo F ~ $\mathcal{N}$ (0, I), os parâmetros Λ e Ψ foram estimados pela maximização logarítimica de $\mathscr{L}$ (Λ, Ψ|Y) por meio do pacote R psych juntamento com a rotação varimax (KAISER, 1958). Anteriormente, uma análise de fatores paralela (*parallel analysis*) foi necessária para calcular o número de fatores. Posteriormente, os *loadings* dos *features* > |0,55, em cada fator, foram considerados pertencentes a variável latente associada e incluídos nos modelos estruturais para CFA.

A análise de fatores confirmatória bayesiana (BCFA) foi aplicada a todos os dados, concatenados a partir dos modelos das estruturas obtidos no EFA. O BCFA foi utilizado conforme descrito em (YU et al., 2019). Resumidamente, BCFA foi aplicado a todos os dados concatenados, contendo os fenótipos, proteínas e miRNA com as estruturas obtidas no EFA, e os genes dos módulos provindos do WGCNA. O pacote R blavaan (MERKLE; ROSSEEL, 2018) foi usado em 3 cadeias de Markov Monte Carlo, cada cadeia com 6.000 amostragens e parâmetros de *burn-in*. Em seguida, as médias posteriores dos escores dos fatores foram estimadas e mantidas para posterior análise.

3.7. Redes Bayesianas

O aprendizado das estruturas probabilisticas condicionais foram realizadas com o pacote R "bnlearn" (SCUTARI, 2010), e aplicada para estudar a dependência probabilística entre as variáveis ômicas e fenótipos latentes. A rede bayesiana (BN) dada por:

$$BN = (G, X_V) ,$$

que representa um grafo acíclico direto (DAG = (V, E)) com nós (V) conectados por uma ou mais arestas (E) por meio de suas dependências condicionais e vetores aleatórios $X_V = (X_1, \dots, X_K)$, em que k são variáveis aleatórias. A probabilidade conjunta de distribuições é, portanto, dada por:

$$P(X_V) = \prod_{v=1}^{k} P\,(X_V \,|P_a(X_V)$$

onde $P_a(X_V)$ expressa um conjunto de nós paternos relacionados a um nó filho X_v. Um método *Bootstrap* para validação da força dos arcos em uma rede Bayesiana estruturada foi aplicado no mesmo pacote R. Os algoritmos baseados em pontuação (Hill Climbing e Tabu) e híbridos (Max-Min Hill Climbing e General 2-Phase Restricted Maximization) foram usados para realizar o aprendizado das estruturas. Os arcos com valor > 0,8 de resistência do arco (força) foram considerados significativos e mantidos no gráfico. As redes candidatas foram comparadas com base no método Bayesiano de critério de informação (BIC) e a pontuação equivalente Bayesiana Gaussiana (BGe). O BIC considera a qualidade do ajuste e a complexidade do modelo, e o BGe visa maximizar a probabilidade posterior das redes. No bnlearn, a pontuação BIC é redimensionada em -2, o que indica que o BIC maior se refere a um modelo preferido. O BIC é um parâmetro instrinseco do conjunto de dados utilizados e não pode ser interpretado ou utilizado como parâmetro de comparação para outro conjunto de dados.

4. RESULTADOS

Neste estudo, classificamos os fenótipos em três categorias. A categoria de características de produção que inclui peso corporal pré-confinamento (BWi), peso corporal pós-confinamento (BWf), espessura de gordura subcutânea inicial (BFTi) e área de olho de lombo inicial (REAi). Categoria de características da carcaça, incluindo espessura de gordura subcutânea final (BFTf), área de olho de lombo final (REAf), peso da carcaça quente (Carcass_hot), peso de carcaça fria (Carcass_cold), profundidade da carcaça (Carcass_depth), peso da gordura renal (fat_kidney) e peso da gordura pélvica (Fat_pelvis). A terceira categoria refere-se a características relacionadas a qualidade da carne, que inclui os fenótipos: força de cisalhamento em coletado no tempo 24 horas (SF), pH coletado no tempo 24 horas (pH), umidade da carne (moisture), água livre (water_free), capacidade de retenção de água (w_ret_cap), perda de peso no cozimento (cook_loss), parâmetros de cores mensurados na carne (L*, a* e b*), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e porcentagem de gordura intramuscular (IMF).

A correlação de Pearson (figura 1) mostra que 3 fenótipos apresentam multicolinearidade (correlação> 90%) e foram removidos para análise posterior, porque as variáveis em uma matriz de correlação devem ser intercorrelacionadas, mas se a correlação for muito alta, isso causaria dificuldades na determinação da contribuição única das variáveis para um fator (RIETVELD; HOUT, 1993). As características removidas foram BWf, Carcass_hot e water_free. Em relação a water_free e w_ret_cap, a correlação -1 é devido ambas as características representarem informações opostas e complementares (PEARCE et al., 2011).

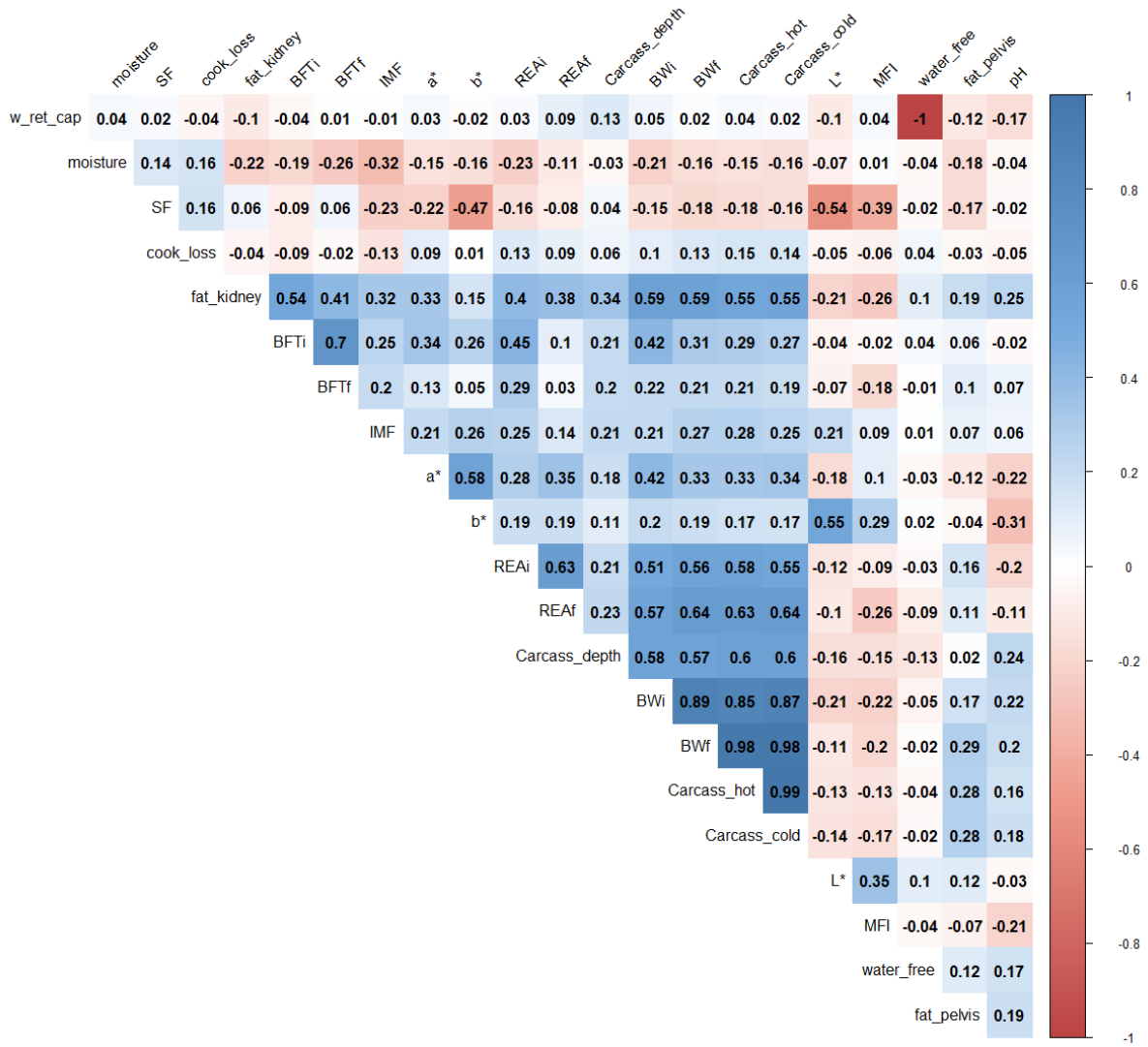

Figura 1. Correlação entre os 22 fenótipos utilizados. O grau de intencidade da cor corresponde ao valor reportado de correlação entre as características, sendo azul escuro representando 1 e vermelho escuro representando -1. BWi: peso corporal pré-confinamento; REAi: área de olho de lombo inicial por ultrassonografia; REAf: área de olho de lombo final mensurado na carcaça; BFTi: espessura de gordura subcutânea initial por ultrassonografia; BFTf: espessura de gordura subcutânea final mensurado na carcaça; SF: força de cisalhamento; MFI: índice de fragmentação miofibrilar; L*, a*, b*: parâmetros de cor; e IMF: porcentagem de gordura subcutânea.

Os dados provindos do RNAseq contendo 13.023 genes após garantia de qualidade, processamento e normalização foram utilizados e o método WGCNA identificou 20 módulos. O WGCNA foi aplicado para identificar genes importantes dos módulos, como estratégia para reduzir a dimensionalidade dos dados e utilizar os módulos contendo esses genes assumindo-os como fatores latentes para a BCFA. Para tal, apenas dois módulos apresentaram MM > 0,95 e significância do gene p-valor <0,001. O módulo azul contendo 7 genes e o módulo marrom com 4 genes (Apêndice A).

De 465 miRNAs, um total de 192 miRNAs foram elegíveis para análise após a filtragens e normalização aplicada. Um animal foi excluído como um outlier e, após a normalização, o pacote LIMMA foi aplicado para remover os efeitos de efeitos de *bacthes* (Figura 2).

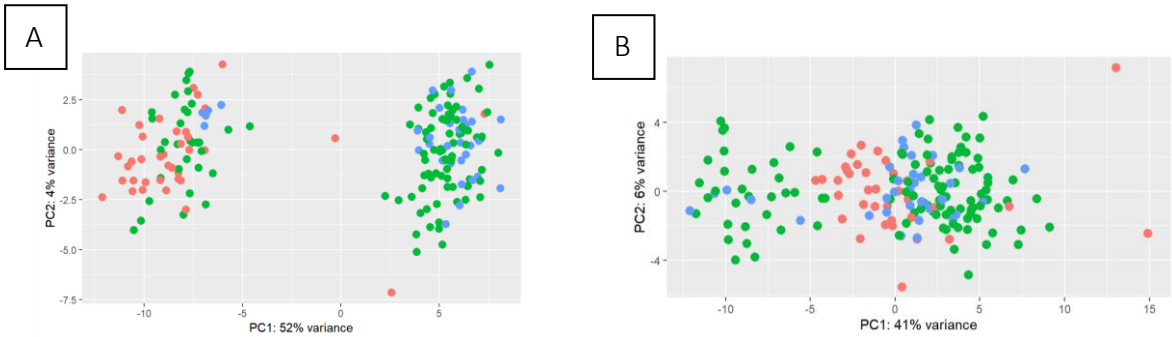

Figura 2. Análise de Componente Princial (PCA). Efeito de contagem total. PCA antes (A) e depois (B) da normalização dos efeitos de *batches*. As contagens totais referem-se ao número total de leituras por amostra. Amostras com maior número total de leituras: maior que a média + 1 dp (azul); Amostras com menor número total de leituras: menor do que o valor médio – 1 dp (vermelho); Amostras com o número total médio de leituras: entre -1 dp > média <+ dp (verde).

Após a normalização, uma análise de componentes principais (PCA) revelou um agrupamento entre as amostras (figura 2A). Apesar do processo de normalização por DESEq2 ter normalizado por efeitos estocásticos, parece que não conseguiu lidar com dois efeitos relacionados a corrida e ao número total de leituras por amostra em diferentes *batches*. Em seguida, o pacote LIMMA foi utilizado para remover os efeitos identificados, permitindo o uso de dados de miRNA nas análises posteriores (Figura 2B). Na figura 2 destacam-se cores para número total de amostras, permitindo melhor vizualição do agrupamento em função desse efeito.

Os dados proteômicos provindos de 106 animais geraram, após garantia de qualidade dos dados, 159 proteínas. Um PCA foi aplicado e um efeito de corrida no equipamento foi identificado (Figura 3A). Esse efeito foi superado normalizando cada dado separadamente em função da corrida, e posteriormente concatenados (Figura 3B).

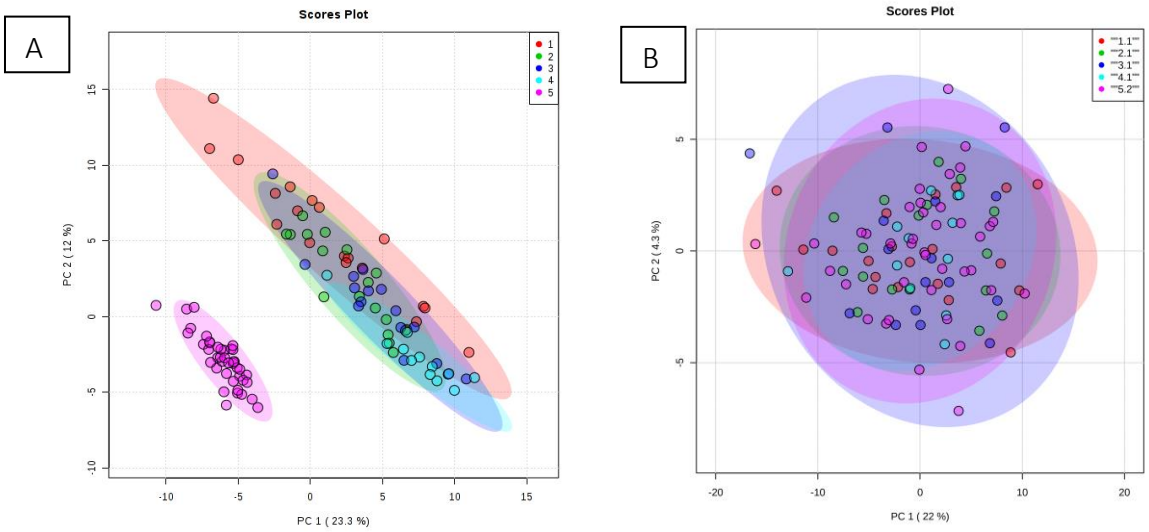

Figura 3. Análise de Componente Princial (PCA) dos dados antes e após normalizados separadamente. PCA com todos os animais normalizados juntos (A) e PCA com os animais normalizados em função da corrida no equipamento (B). As cores representam as diferentes corridas no equipamento.

4.1. Resultados da análise de fatores exploratória e análise de fatores confirmatória bayesiana

As análises foram realizadas em 102 animais, que compõem o subconjunto de animais que possuem os dados de fenótipos, miRNA, mRNA e proteínas. Os dados de fenótipos, miRNA e proteínas foram submetidos à Análise Exploratória de Fatores (EFA), separadamente. A análise fatorial exploratória (EFA) pode ser aplicada para reduzir os dados sem qualquer suposição prévia de associações entre os dados observados e a estrutura latente (fatores). A análise paralela sugeriu que os dados do fenótipo, miRNA e proteína eram compostos por 5, 10 e 8 variáveis latentes, respectivamente.

O modelo BCFA agrupou os fenótipos, miRNA e proteína nas variáveis latentes subjacentes na estrutura obtida da análise anterior (EFA), assumindo que essas variáveis latentes determinam os fenótipos observados e os dados ômicos. Isso permitiu estudar a propriedade de cada variável latente em cada um dos diferentes tipos de dados. Um modelo de medição derivado de BCFA avaliando as variáveis latentes para fenótipos, miRNA, proteína e mRNA são mostrados nas figuras 4 e 5.

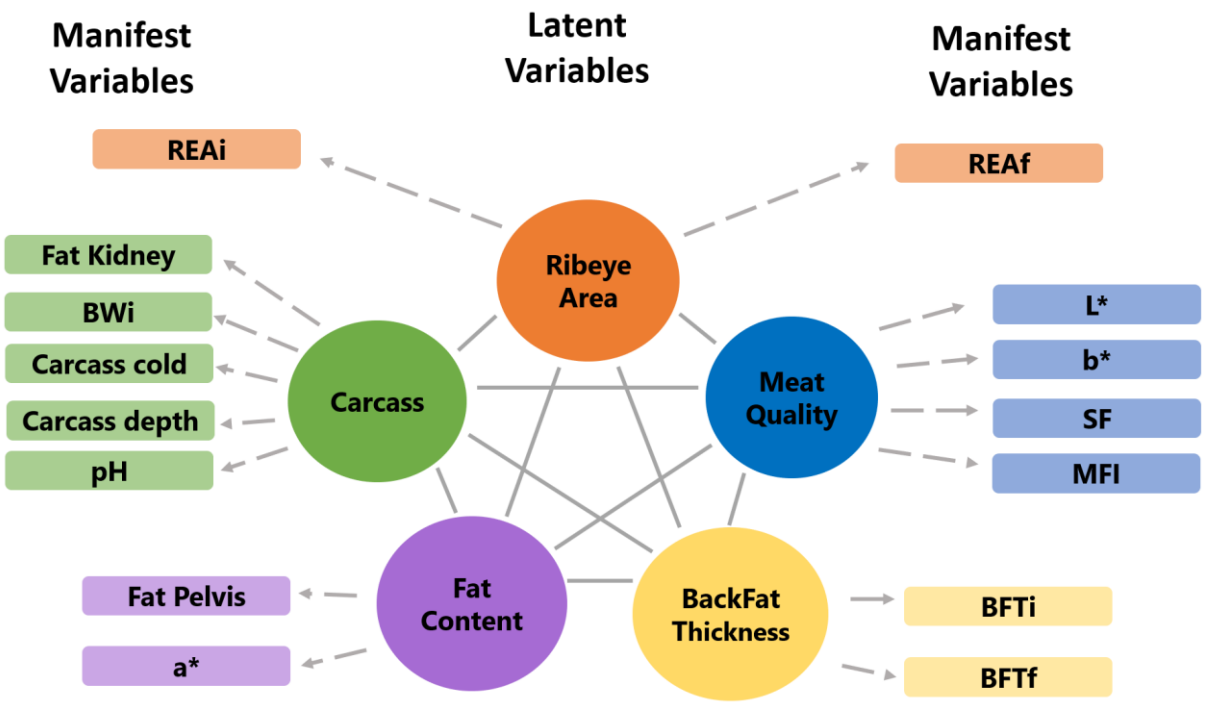

Figura 4. Relação entre cinco variáveis latentes e os respectivos 15 fenótipos observados. BWi: peso corporal inicial em confinamento; REAi: área de olho do lombo inicial por ultrassonografia; REAf: área de olho de lombo final mensurado na carcaça; BFTi: espessura de gordura subcutânea por ultrassonografia; BFTf: espessura de gordura subcutânea mensurado na carcaça; SF: força de cisalhamento; MFI: Índice de Fragmentação Miofibrilar; L*, a*, b*: parâmetros de cor mensurados na carne. Os fatores foram nomeados em Ribeye área: Área de Olho de Lombo; Meat Quality: qualidade da carne; BackFat Thickness: espessura de gordura subcutânea; Fat Content: teor de gordura; e Carcass: carcaça.

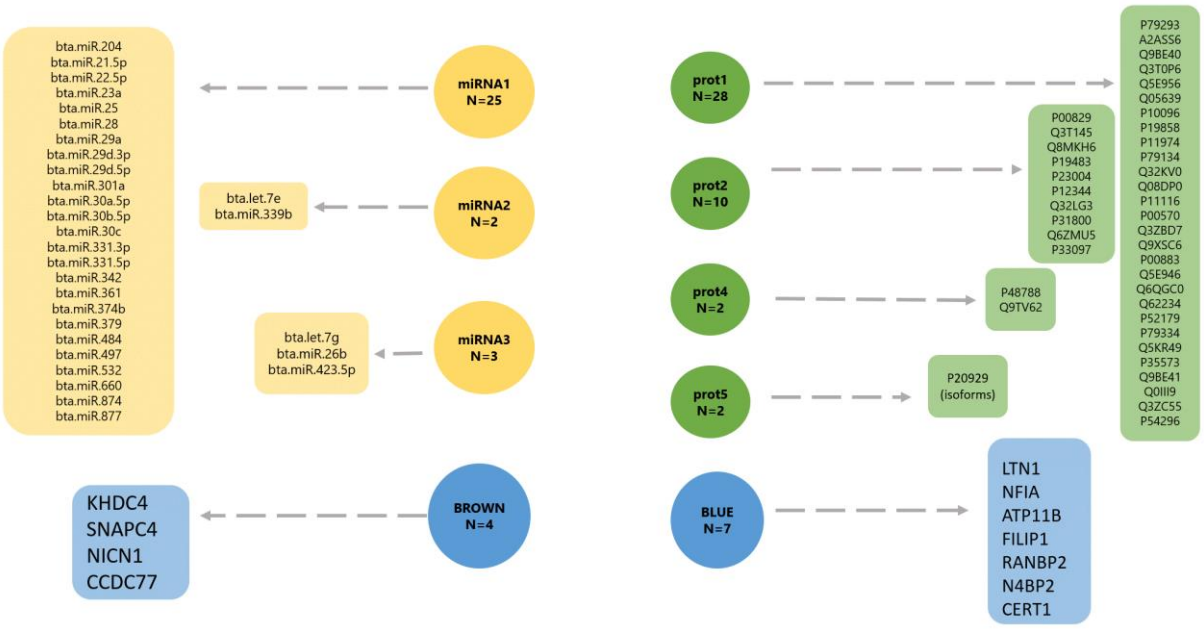

Figura 5. Relação entre variáveis latentes para miRNA (amarelo), proteínas (verde) e mRNA (azul) e características observadas que os compõem. N representa o número total de moléculas em cada variável latente.

Os 5 fatores latentes do fenótipo mostraram fortes contribuições para os fenótipos observados, com coeficientes de regressão padronizados variando de 0,989 a 0,986 para o fator BackFat Thickness, -0,993 a 0,956 para o fator Meat Quality, 0,654 a 1 para o fator Carcass, 0,942 a 0,992 para Fat Content e 0,973 a 0,991 para o fator Ribeye Area. As 7 variáveis latentes para miRNA e proteína também mostraram fortes contribuições para com as moléculas que as compõem, com coeficientes de regressão padronizados variando de -0,999 a 0,999 para o fator mirna1, -0,971 a 0,979 para o fator mirna2, -0,914 a 0,989 para o fator mirna3, 0,842 a 0,990 para o fator prot1, 0,774 a 0,973 para o fator prot2, 0,963 a 0,997 para o fator prot4 e 0,976 a 0,990 para o fator prot5.

A variável latente BackFat Thickness tem contribuição positiva para o BFTi e BFTf (0,989 e 0,986, respectivamente; Tabela 1), indicando que maiores valores para o fator latente podem ser interpretados como uma maior espessura de gordura subcutânea. A variável latente Meat Quality tem uma contribuição positiva para a Força de Cisalhamento (0,956; Tabela 1), e uma contribuição negativa para as cores do parâmetro b*, L* e MFI (-0,993, -0,959 e -0,785, respectivamente; Tabela 1) indicando que valores mais baixos dessa variável latente podem ser interpretados como carne mais macia. O fator Carcass mostrou as maiores contribuições positivas para as características que descrevem a carcaça (por exemplo, peso da carcaça fria, 1; profundidade da carcaça, 0,990; peso ao conteúdo de gordura renal, 0,987; e pH da carne em 24h, 0,863), sugerindo que este variável latente é uma adequada representação das características relacionadas a carcaça. O fator Ribeye Area tem contribuição positiva para o REAf e REAi (0,991 e 0,973, respectivamente; Tabela 1), indicando que maiores valores para essa variável latente podem ser interpretados como uma maior área de olho de lombo.

O fator mirna1 tem uma contribuição positiva para com 18 miRNAs (0,876, 0,999; Tabela 1) e uma contribuição negativa para 7 miRNAs (-0,995, -0,999, respectivamente; Tabela 1). A variável latente mirna2 tem uma contribuição positiva de miRNA 'bta.let.7e' (0,979; Tabela 1) e uma contribuição negativa de miRNA 'bta.miR.339b' (-0,971, respectivamente; Tabela 1). O fator mirna3 tem uma contribuição positiva de 2 miRNAs, o 'bta.let.7g' (0,889), o 'bta.miR.26b' (0,987) e uma contribuição negativa do miRNA 'bta.miR.423,5p' (-0,914). O fator latente

prot1, prot2, prot4 e prot5 tem uma contribuição positiva para todas as proteínas com: 28 proteínas (0,842 a 0,990), 10 proteínas (0,774 a 0,973), 2 proteínas (0,976 a 0,997) e 2 proteínas (0,976 a 0,990), respectivamente.

Tabela 1. Loadings dos fatores padronizado, obtido na análise de fatores confimatória bayesiana. PSD refere-se ao desvio padrão posterior desses *loadings* padronizados. Proteínas estão codificadas por sua correspondência no banco de dados UniprotKB, os miRNAs estão codificados por sua correspondência no banco de dados miRBase e os genes codificados por sua correspondência no banco de dados Ensembl.

Variável Latente	**Fenótipos mensurados**	**loadings**	**PSD**
Backfat Thickness	BFTi	0.989	0.041
Backfat Thickness	BFTf	0.986	0.023
Meat Quality	Shear_force	0.956	0.048
Meat Quality	L*	-0.959	0.138
Meat Quality	b*	-0.993	0.059
Meat Quality	MFI	-0.785	0.422
Carcass	BWi	0.654	0.146
Carcass	Carcass_cold	1.000	0.000
Carcass	Carcass_depth	0.990	0.094
Carcass	fat_kidney	0.987	0.143
Carcass	pH	0.863	42.062
Fat deposition	fat_pelvis	0.942	0.084
Fat deposition	a*	0.992	0.023
Ribeye Area	REAi	0.973	0.020
Ribeye Area	REAf	0.991	0.013
prot1	P79293	0.842	0.269
prot1	A2ASS6	0.966	0.097
prot1	Q9BE40	0.953	0.123
prot1	Q3T0P6	0.972	0.087
prot1	Q5E956	0.954	0.125
prot1	Q05639	0.968	0.093
prot1	P10096	0.969	0.092
prot1	P19858	0.898	0.233
prot1	P11974	0.978	0.076
prot1	P79134	0.950	0.127
prot1	Q32KV0	0.971	0.089
prot1	Q08DP0	0.964	0.100
prot1	P11116	0.942	0.147
prot1	P00570	0.990	0.059
prot1	Q3ZBD7	0.979	0.073
prot1	Q9XSC6	0.971	0.088
prot1	P00883	0.989	0.058
prot1	Q5E946	0.974	0.083

prot1	Q6QGC0	0.957	0.113
prot1	Q62234	0.918	0.196
prot1	P52179	0.951	0.126
prot1	P79334	0.981	0.070
prot1	Q5KR49	0.916	0.197
prot1	P35573	0.970	0.094
prot1	Q9BE41	0.983	0.067
prot1	Q0III9	0.965	0.098
prot1	Q3ZC55	0.970	0.092
prot1	P54296	0.981	0.070
prot2	P00829	0.882	0.296
prot2	Q3T145	0.877	0.351
prot2	Q8MKH6	0.866	0.370
prot2	P19483	0.906	0.305
prot2	P23004	0.805	0.479
prot2	P12344	0.937	0.252
prot2	Q32LG3	0.973	0.206
prot2	P31800	0.774	0.535
prot2	Q6ZMU5	0.910	0.302
prot2	P33097	0.865	0.368
prot4	P48788	0.997	0.050
prot4	Q9TV62	0.963	0.138
prot5	P20929	0.976	0.066
prot5	P20929	0.990	0.048
mirna1	bta.miR.204	0.876	0.195
mirna1	bta.miR.21.5p	0.994	0.029
mirna1	bta.miR.22.5p	0.991	0.041
mirna1	bta.miR.23a	-0.996	0.034
mirna1	bta.miR.25	0.996	0.048
mirna1	bta.miR.28	0.995	0.034
mirna1	bta.miR.29a	0.996	0.039
mirna1	bta.miR.29d.3p	0.997	0.019
mirna1	bta.miR.29d.5p	0.996	0.013
mirna1	bta.miR.301a	0.994	0.026
mirna1	bta.miR.30a.5p	-0.999	0.021
mirna1	bta.miR.30b.5p	0.993	0.090
mirna1	bta.miR.30c	0.996	0.052
mirna1	bta.miR.331.3p	0.997	0.012
mirna1	bta.miR.331.5p	-0.996	0.022
mirna1	bta.miR.342	0.997	0.025

mirna1	bta.miR.361	-0.995	0.047
mirna1	bta.miR.374b	-0.998	0.015
mirna1	bta.miR.379	-0.999	0.002
mirna1	bta.miR.484	0.989	0.049
mirna1	bta.miR.497	0.999	0.010
mirna1	bta.miR.532	0.991	0.064
mirna1	bta.miR.660	0.996	0.030
mirna1	bta.miR.874	-0.996	0.018
mirna1	bta.miR.877	0.995	0.014
mirna2	bta.let.7e	0.979	0.558
mirna2	bta.miR.339b	-0.971	0.295
mirna3	bta.let.7g	0.989	0.466
mirna3	bta.miR.26b	0.987	0.213
mirna3	bta.miR.423.5p	-0.914	0.226
blue	LTN1	0.999	2.086
blue	NFIA	0.998	2.785
blue	ATP11B	0.999	2.329
blue	FILIP1	0.999	2.762
blue	RANBP2	0.998	3.441
blue	N4BP2	0.998	1.831
blue	CERT1	0.999	4.513
brown	KHDC4	0.998	1.466
brown	SNAPC4	0.998	1.286
brown	NICN1	0.999	0.961
brown	CCDC77	0.999	1.236

Posteriormente, foram estimadas as médias posteriores dos escores dos fatores, que refletem a contribuição das variáveis latentes para cada animal (Apêndice B). Esses escores de fator calculados a partir de BCFA foram considerados novos fenótipos utilizados para as análises posteriores.

4.2. Correlações entre as variáveis latentes

Para compreender as relações entre as variáveis latentes, aplicamos uma correlação de Pearson (Figura 6).

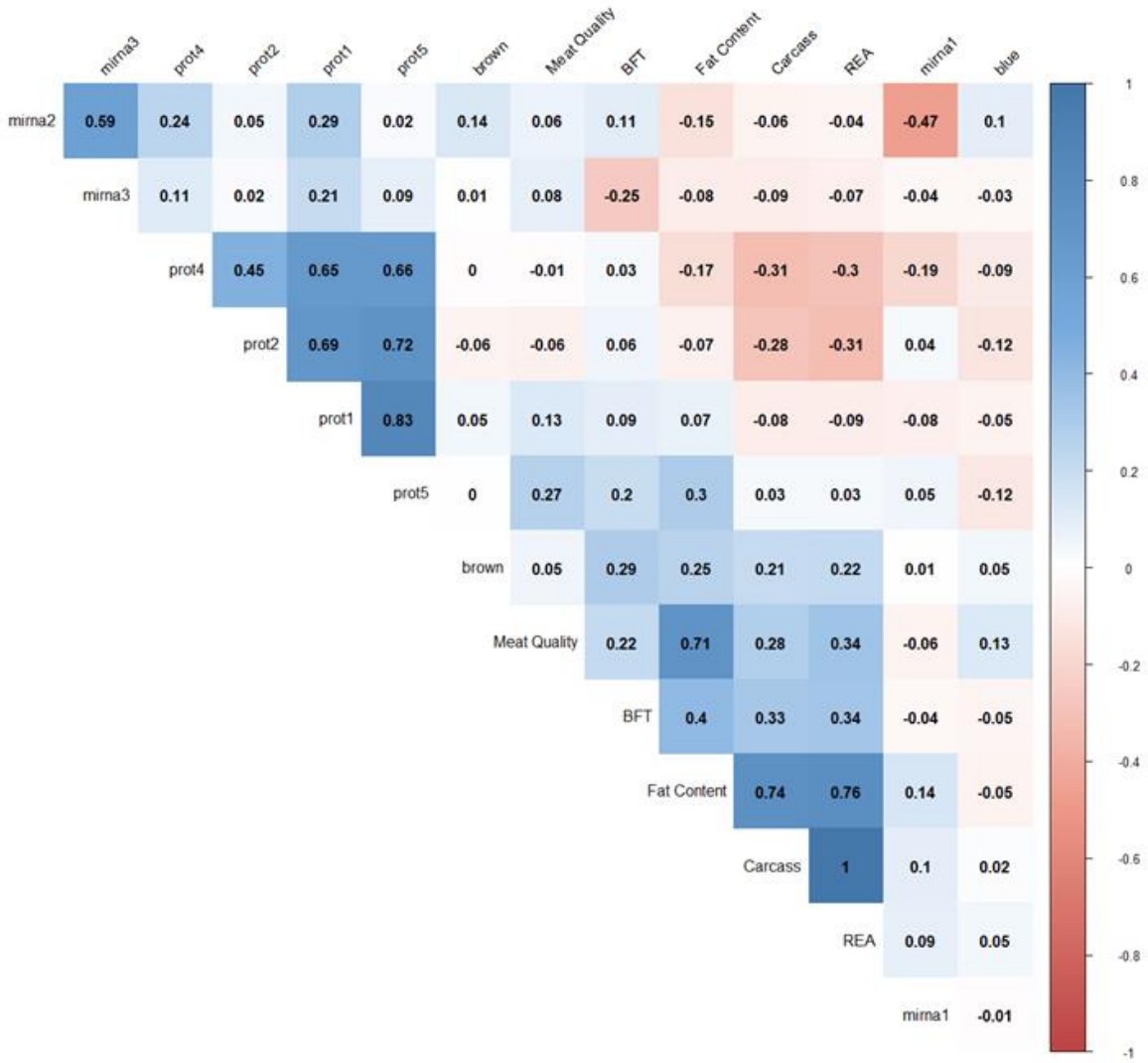

Figura 6. Gráfico de correlação de Pearson das 14 variáveis latentes. O grau de sombreamento e o valor relatado correspondem à correlação entre cada par de variáveis latentes. BFT: fator BackFat Thickness; REA: fator Ribeye Area.

Correlações negativas foram observadas entre mirna1 e mirna2 (-0,47); entre REA e prot4 (-0,33); REA e prot2 (-0,3); entre Carcass e prot4 (-0,31); Carcaça e prot2 (-0,28); entre BFT e mirna3 (-0,25). Já correlações positivas são observadas entre todos os fatores de proteína; fator Meat Quality e Fat Content (0,71); Fat Content e Carcass (0,74); Fat Content e REA (0,76). A variável latente REA e Carcass teve correlação de 1. Esses resultados sugerem que os níveis de proteínas podem ter um impacto sobre esses fatores Carcass, REA e Fat Content.

4.3. Redes Bayesianas

Para inferir as interrelações das variáveis latentes, foi realizada a BN. A rede bayesiana sugeriu o gráfico mais favorável em termos de BIG (1801,31) e BGe (1903,46) utilizando algoritmo Hill-Climbing no método *based-*

score (Figura 7) com 17 conexões direcionadas entre as 14 variáveis latentes. As estruturas da BN foram redefinidas pelo modelo médio provindo de um *bootstrapping* com reamostragem de 1.000 redes para identificar as estruturas locais. Os números nas arestas mensuram a incerteza da aresta, compondo a força e a direção (dentro dos parênteses). A força é indicativa da frequência da relação presente entre os nós e a direção mensura a frequência da direção condicionada observada nessa relação.

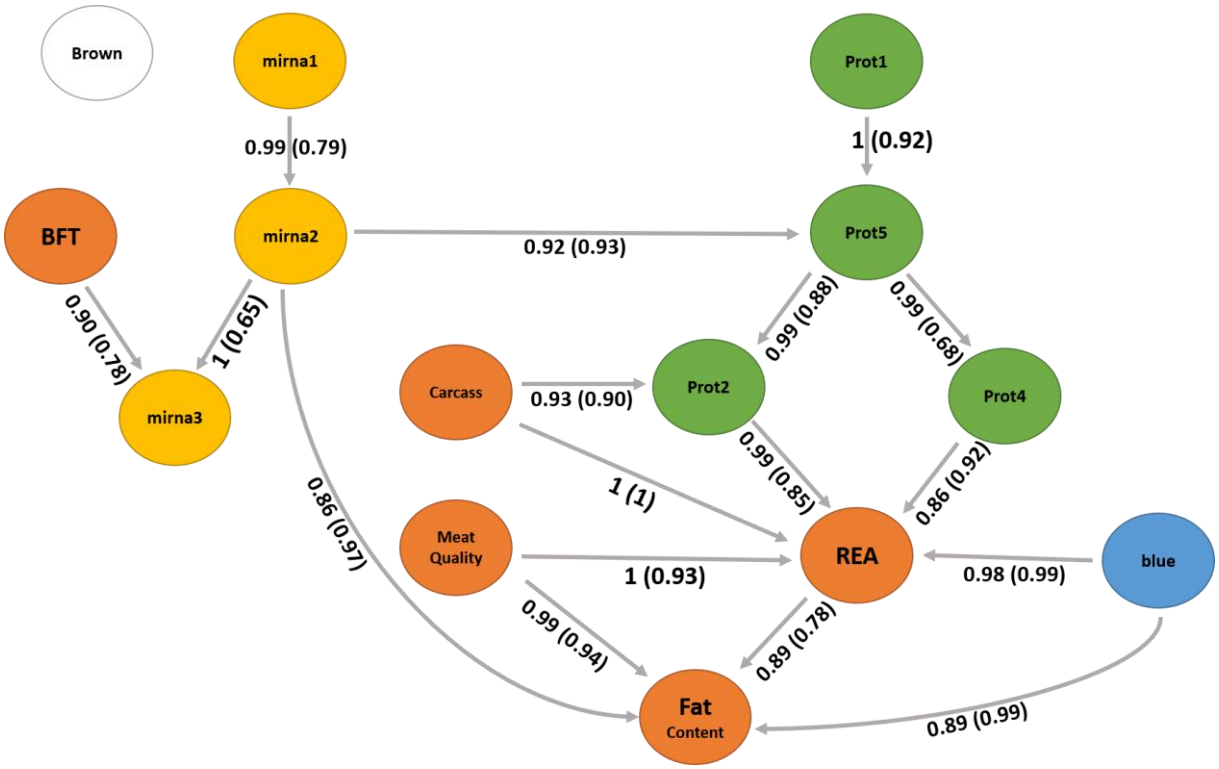

Figura 7. Rede bayesiana de independência condicional entre variáveis latentes baseada em dois algoritmos do *score-based* (Hill Climbing e TABU). A qualidade da estrutura foi avaliada por reamostragem bootstrap e média do modelo em 1.000 replicações. Nós laranja: Variáveis latentes do fenótipo; Nós amarelos: variáveis latentes de miRNA; Nós verdes: Variáveis latentes de proteínas; Variáveis latentes azuis: Módulos de expressão gênica (WGCNA). Os números nas arestas correspondem a força e direção (entre parênteses).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo realizamos a integração de dados multi-ômicos com fenótipos de carcaça e qualidade da carne, explorando relações não-convencionais que possibilitam a geração de novas hipóteses em estudos de qualidade da carne. Nessa tese aplicamos as análises de fatores exploratórias e confirmatórias, e posteriormente, redes bayesianas acessando as independências condicionais envolvendo as variáveis latentes subsequentes as características complexas e dados moleculares. Em primeiro lugar, a análise de fatores foi usada para reduzir as dimensões dos conjuntos de dados através da construção de variáveis latentes (fatores ou módulos), a partir de características correlacionadas (DE LOS CAMPOS; GIANOLA, 2007). Essas variáveis latentes podem facilitar e apresentar significado biológico maior do que as características medidas em uma população (YU et al., 2019, 2020). Em seguida, aplicamos a BN, como modelo gráfico probabilístico, para representar as dependências condicionais entre o conjunto de variáveis latentes por meio de um gráfico acíclico direcionado (DAG) (NEAPOLITAN; OTHERS, 2004).

Os pesquisadores Yu et al. (2019) e Momem et al. (2021) aplicando estratégia similar em estudos no campo da agricultura foram capazes de obter novas compreensões aplicadas ao melhoramento genético de plantas ao utilizarem variáveis latentes provindas de características complexas. Leal-Gutiérrez, et al (2018) estudaram o potencial de se utilizar variáveis latentes, obtidas por meio da análise de equação estrutural, em características de carcaça e qualidade de carne. Os autores foram capazes de diminuir a complexidade dos dados e identificar mecanismos biológicos como proteólise *post-mortem* de proteínas estruturais, proliferação celular, diferenciação de adipócitos, e deposição de gordura. Já Yu, et al. (2020) aplicando análise de fatores a um conjunto de dados de temperamento bovino, foram capazes de revelar variáveis latentes e entender as relações dessas.

Nessa tese, conseguimos gerar uma rede com 14 variáveis latentes e 17 conexões direcionadas entre elas. Além disso, esta abordagem elucida relacionamentos diretos e indiretos entre as variáveis latentes, com relações já descritas na literatura que suportam os resultados, como discutidos a seguir. Já as relações intra e interômicas não descritas permitem a possibilidade para explorar novas hipóteses a partir desses relacionamentos. Notar-se-á, nessa discussão, uma deficiência na exploração das relações envolvendo miRNAs, dado a falta de conhecimento de seu impacto em características de relevância econômica em bovinos. No entanto, vale ressaltar um cuidado essencial para interpretar a rede como um efeito causal, já que para a inferência de casualidade em BN é necessário mais suposições, ou seja, o número de características teria de ser muito maior que comumente mensurado em um experimento, contendo milhares de observações (PEARL, 2009).

5.1. Relações entre as variáveis latentes e suas características biológicas

A variável latente Carcass, composta principalmente por peso da carcaça fria, profundidade de carcaça e conteúdo de gordura renal (Tabela 1), pode ser interpretada como a representação geral da carcaça com níveis mais elevados indicando carcaça maior e mais pesada. Sua relação direta e indireta com a variável latente REA (figura 7), variável latente que representa a área do olho de lombo (força 1 e direção 1) sugere o impacto da carcaça na área de olho de lombo. Essa relação traz uma informação já descrita no ramo da ciência da carne que evidencia a área de olho de lombo como uma característica indicadora da musculosidade. Aass (1996) relata uma correlação fenotípica positiva (0,26) entre a profundidade da carcaça e a área do olho de lombo, corroborando com nossos achados. Os

pesquisadores Dinkel e Busch (1973) também estimam uma correlação positiva entre a taxa de crescimento e rendimento de carcaça impactando positivamente (0,32) a área de olho de lombo. Repara-se na figura 6 uma correlação de Pearson de magnitude 1, o que seria mais uma evidência da representatividade da área de olho de lombo com a musculosidade, tamanho de carcaça e rendimento de cortes.

A carcaça ainda tem uma relação direta com a variável latente prot2 (força 0,931 e direção 0,950), que também impacta a REA (força 0,998 e direção 0,859), e indireta com Fat Content. A prot2 correlaciona-se negativamente com Carcass e REA (-0,28 e -0,31, respectivamente, figura 7). Nesse caso, a variável latente apresenta proteínas em que a menor expressão dessas contribuem para um maior valor para Carcass e REA. A variável latente prot2 é composta por 10 proteínas (Tabela 1, ver apêndice C), incluindo a UQCRC2 relacionada a proteólise (GO: 0006508); ATP5F1A e ATP5F1B relacionados com o transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0042776, GO: 0015986); TNNT1 e TRIM72 relacionados com a contração muscular (GO: 0006936), regulação da contração muscular (GO: 0006937), organização do sarcômero (GO: 0045214) e desenvolvimento de órgãos musculares (GO: 0007517); GOT1 e GOT2 relacionados com processo biossintético e catabólico de aspartato (GO: 0006532, GO: 0006533), resposta celular ao estímulo de insulina (GO: 0032869), homeostase de ácidos graxos (GO: 0055089), processo catabólico de glutamato em aspartato (GO: 0019550) , processo biossintético de glicerol (GO: 0006114) e processo metabólico de oxaloacetato (GO: 0006107); e MDH1 e MDH2 relacionados com o processo metabólico de carboidratos (GO: 0005975), processo metabólico do malato (GO: 0006108), processo metabólico NADH (GO: 0006734), processo metabólico de oxaloacetato (GO: 0006107), ciclo do ácido tricarboxílico (GO: 0006099) e respiração aeróbica (GO: 0009060).

A proteína subunidade B1 do complexo ATP sintase F (0) (ATP5F1) é positivamente correlacionada com o parâmetro de cor da carne a*, que impacta a descoloração da carne (YU et al., 2017). Nossos resultados mostram uma relação indireta da prot2 na Fat Content, que é composta pelo parâmetro a*, sugerindo uma nova evidência do potencial dessa proteína estar influenciando parâmetros de cores na carne. Além dessa, a prot2 é composta principalmente de enzimas envolvidas com o metabolismo energético que já foram relatadas como proteínas candidatas para maciez da carne. A Aspartato aminotransferase (GOT1) foi considerada uma proteína candidata para a previsão da maciez da carne (BOUDON et al., 2020). Rodrigues et al. (2017) relataram que o gado Nelore tem uma abundância maior de Malato desidrogenase (MDH1) em comparação com Angus. Esta enzima é importante na gliconeogênese que catalisa a oxidação de malato a oxaloacetato, sendo relevante para as características de qualidade da carne porque enzimas envolvidas no metabolismo energético afetam como o pH decai no *post-mortem*, alterando a conversão do músculo em carne. O gene da proteína Ubiquinol-Citocromo C Redutase Core Protein 2 (UQCRC2), que é um importante promotor de energia para o desenvolvimento das funções celulares, já foi descrito como mais expresso em grupos de carne tenra em comparação ao grupo de carne macia em gado Nelore (MUNIZ et al., 2021). A degradação das proteínas da troponina T1 (TNNT1), uma proteína estrutural, durante a *post-mortem* é associada à maciez da carne (ZAKRYS-WALIWANDER et al., 2012; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; WRIGHT et al., 2018). Em trabalho recente, os pesquisadores Rosa et al. (2018) em estudo com 155 animais da raça Nelore, identificaram mudanças no proteoma da carne em bovinos Nelore com diferentes genótipos para genes candidatos para maciez da carne (UOGCAST and CAPN475). Animais com genótipo CC em ambos os marcadores tinham carnes de menor força de cisalhamento em comparação a animais com genótipo TT. A proteína TNNT1 foi reportada como diferencialmente expressa entre os genótipos do marcador UOGCAST, sendo mais expressa nos genótipos CC. Nota-se que apesar de prot2 e Meat Quality serem variáveis independentes (Figura 7), ambas impactam a variável REA.

A variável latente Meat Quality, composta pela força de cisalhamento, índice de fragmentação miofibrilar e os parâmetros de cor L* e b* (Tabela 1), pode ser interpretada como a representação da maciez da carne, e níveis mais baixos desse fator indicariam uma maior maciez da carne. Sua relação é direta com a variável latente REA (força 1 e direção 0,932) e com Fat Content (força 0,998 e direção 0,943) (figura 7). Na figura 6 pode-se observar uma correlação positiva com REA e Fat Content de 0,34 e 0,71, respectivamente. Interpreta-se dessa relação que animais com menor qualidade de carne (valores maiores para Meat Quality) possuem maiores valores para REA e Fat Content. Isso traz uma sugestão de como a musculosidade está atrelada a qualidade da carne. Essa relação entre maciez, REA e conteúdo de gordura é ainda discutida na literatura (BONIN et al., 2020).

A variável prot4 também mostra uma relação com REA (força 0,861 e direção 0,927), este fator tem 2 proteínas (Tabela 1, ver Apêndice C): a TNNI2 e MYH4. A correlação dessas duas variáveis latentes é negativa (-0,3) o que indica que a maior expressão dessas proteínas está associadas a menores valores de área de olho de lombo. A isoforma de contração rápida Troponina I (TNNI2) é uma subunidade do complexo da troponina e desempenha um papel fundamental na regulação do cálcio durante a contração e relaxamento muscular. O gene TNNI2 foi associado ao pH, valor da cor da carne e conteúdo de gordura intramuscular em porcos (YANG et al., 2010). Já as cadeias pesadas de miosina são relevantes para a velocidade e força de contração muscular, MYH4 é uma das isoformas associadas aos tipos de fibras IIb em porcos (CHO et al., 2016) e hipertrofia de miotubos em bovinos de corte (BORDBAR et al., 2020). Esses resultados sugerem novas hipóteses do impacto dessas proteínas que compõem a variável prot4, as quais podem afetar área de olho de lombo e musculosidade.

O fator Prot5 é composto por nebulina (NEBU), que é um importante componente estrutural envolvido no envelhecimento da carne (OUALI; DEMEYER; SMULDERS, ; KOOHMARAIE et al., 1984). A degradação durante o *post-mortem* da nebulina tem sido associada à carne tenra em bovinos, cujos animais com menor degradação têm menor maciez da carne (ANDERSON; PARRISH, 1989; WU et al., 2014). Prot5 é um fator importante na rede de relações com o prot2 e prot4, correlacionando-se positivamente (0,72 e 0,66, respectivamente), e ainda possuindo um relacionamento indireto com REA e Fat Content.

A variável blue tem relação direta com REA (força 0,982 e direção 0,998) e Fat Content (força 0,89 e direção 0,994). O fator blue é composto pelos genes LTN1, NFIA, ATP11B, FILIP1, RANBP2, N4BP2, CERT1. O gene do fator nuclear IA (NFIA) foi estudado e indica ter potencial para estimular o acúmulo de lipídios em bovinos (CHEN et al., 2018a). De acordo com o enriquecimento por via no Metacore (Apêndice D), o gene RANBP2 está associado à proteólise. O gene CERT1 está relacionado com o transporte intracelular de colesterol e com o metabolismo dos esfingolipídios. Tem-se aqui uma lista de genes já descritos relacionados ao acúmulo e metabolismo de lipídeos, e proteólise, relacionando-se com a área de olho de lombo e teor de acúmulo de gordura pélvica.

A variável mirna3 é um nó filho da variável BFT (força 0,901 e direção 0,782) e da mirna2 (força 1 e direção 0,659). Correlaciona-se positivamente com o nó pai mirna2 (0,59) e negativamente com BFT (-0,25). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA que inibem a tradução ou induzem a degradação de mRNAs codificadores de proteínas que contêm sequências complementares aos miRNAs. O mirna3 é constituído por 3 miRNAs, bta.let.7g, bta.miR.26b e bta.miR.423.5p. O bta.let.7g é descrito em estudos relacionados com lactação e infecção em bovinos (MA et al., 2019; RANI; ONTERU; SINGH, 2020). O mirna2 é composto por 2 miRNAs, o bta.let.7e e o bta.miR.339b. Gu et. al. (2007) identificou a expressão de bta.let.7e no tecido adiposo em bovinos (GU; ELESWARAPU; JIANG, 2007). O bta.miR.339b foi encontrado em estudos relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e lactação (MA et al., 2019; RANI; ONTERU; SINGH, 2020). O mirna2 tem relação direta com o teor de gordura e com prot5 (Figura 7). Esses resultados permitem identificar novas relações para que estudos direcionados

a entender melhor as funções dessas características e sua associação com o metabolismo de gorduras e a proteína nebulina em bovinos de corte sejam realizados.

Elenca-se nessa discussão algumas informações já descritas na literatura que suportam as relações encontradas em nossa rede de conexão probabilística de dependência condicional. A rede gerada, por meio das variáveis latentes, foi capaz de identificar relações interômicas, trazendo simplicidade sem perder complexidade. Esse é um dos desafios encontrados em estudos dessa natureza, as metodologias geralmente propostas acabam tornando a interpretação dos resultados inviáveis, o que não foi o caso dessa tese. Aqui, sugere-se a inclusão de investigações adicionais para compreender as relações das moléculas e fenótipos impactadas pelas variáveis latentes REA, prot2, prot4, prot5, blue, Carcass, mirna3, mirna2, Fat Content. A rede demonstra uma relação entre miRNAs e isoformas da proteína nebulina que não seriam encontrados em estudos utilizando um dado ômico único ou estratégias multi-níveis. Por fim, a área de olho de lombo aparece como um nó central na rede, sendo influenciado pela Carcass, prot2, prot4 e Meat Quality, sugerindo essa como uma característica que poderia ser utilizada como parâmetro de mesuração relacionado a qualidade da carne em frigoríficos, devido sua facilidade de mensuração.

6. CONCLUSÕES

A análise de fatores aplicada nos dados foi capaz de identificar variáveis latentes, diminuindo a dimensionalidade e a complexidade dos dados. A rede BN foi capaz de gerar uma rede de relações entre variáveis latentes de diferentes tipos de dados, permitindo integrar dados ômicos e fenótipos complexos. Além disso, a rede gerada também foi capaz de identificar a independência condicional, determinando como esses fatores se relacionam, o que permitiria seu uso para gerar novas hipóteses em estudos moleculares na área da qualidade de carne. Desse modo fomos capazes, utilizando o uso conjunto da abordagem EFA, BCFA e BN com diferentes tipos de dados, de integrar e fornecer novas hipóteses, como a importância da área de olho de lombo ou relação entre miRNAs com proteínas. Permitindo assim, explorar relações não convencionais para características complexas de relevância econômica.

REFERÊNCIAS

AASS, L. Variation in carcass and meat quality traits and their relations to growth in dual purpose cattle. **Livestock Production Science**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030162269600005X>.

ABERLE, E. D. et al. **Principles of Meat Science**. 5th editio ed. Iowa, USA: Kendall Hunt Publishing, 2012.

ADZITEY, F. Effect of pre-slaughter animal handling on carcass and meat quality. **International Food Research Journal**, v. 18, 2011.

ALTELAAR, A. F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: Towards an integrative view of proteome dynamics. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 35–48, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3356>.

ALTEROVITZ, G. et al. Bayesian methods for proteomics. **PROTEOMICS**, v. 7, n. 16, p. 2843–2855, ago. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200700422>.

ANDERSON, T. J.; PARRISH, F. C. Postmortem Degradation of Titin and Nebulin of Beef Steaks Varying in Tenderness. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 748–749, maio 1989. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1989.tb04695.x>.

ANDREWS, S. **FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.** [s.l: s.n.].

BERNARD, C. et al. New Indicators of Beef Sensory Quality Revealed by Expression of Specific Genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5229–5237, jun. 2007.

BIER, F. F. et al. DNA Microarrays. In: [s.l: s.n.]p. 433–453.

BONIN, M. D. E. N. TESE- Avaliação de características de desempenho e qualidade de carne em linhagens e touros representativos da raça Nelore, utilizando ultrassonografia, análise de imagens e NIRS. 2012.

BONIN, M. de N. et al. Predicting the shear value and intramuscular fat in meat from Nellore cattle using Vis-NIR spectroscopy. **Meat Science**, p. 108077, fev. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917401930717X>.

BORDBAR, F. et al. Identification and validation of a novel candidate gene regulating net meat weight in Simmental beef cattle based on imputed next-generation sequencing. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 9, 28 set. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12870>.

BOUDON, S. et al. Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers. **Journal of Proteomics**, v. 217, p. 103685, abr. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391920300531>.

BROSIUS, J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. **Gene**, v. 238, n. 1, p. 115–134, set. 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111999002279>.

BROSIUS, J. The contribution of RNAs and retroposition to evolutionary novelties. **Genetica**, v. 118, n. 2–3, p. 99–116, jul. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12868601>.

CARVALHO, M. E. et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed. **Meat Science**, v. 96, n. 3, p. 1318–1324, mar. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174013006128>.

CASTRO, L. M. de et al. Quantitative genetic analysis for meat tenderness trait in Polled Nellore cattle. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 393–402, jun. 2014.

CESAR, A. S. et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nellore cattle. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 39, 2014. Disponível em: <http://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-15-39>.

CESAR, A. S. M. et al. Putative Regulatory Factors Associated with Intramuscular Fat Content. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128350, 4 jun. 2015. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128350>.

CESAR, A. S. M. et al. Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 961, 22 dez. 2016. Disponível em: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3306-x>.

CESAR, A. S. M. et al. Identification of putative regulatory regions and transcription factors associated with intramuscular fat content traits. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 499, 27 dez. 2018. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4871-y>.

CHEN, H.-J. et al. Expression levels of brown/beige adipocyte-related genes in fat depots of vitamin A-restricted fattening cattle1. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 9, p. 3884–3896, 7 set. 2018a. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/96/9/3884/5038194>.

CHEN, Y. et al. edgeR : differential expression analysis of digital gene expression data User ' s Guide. n. October 2018, p. 1–110, 2018b.

CHO, E. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the 5' upstream region of the porcine myosin heavy chain 4 gene with meat quality traits in pigs. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 3, p. 330–335, 13 mar. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/asj.12442>.

CONTRERAS-CASTILLO, C. J. et al. The effect of electrical stimulation on post mortem myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. **Meat Science**, v. 113, p. 65–72, mar. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174015301273>.

CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561–563, ago. 1970. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/227561a0>.

CUN, Y.; FROHLICH, H. netClass: an R-package for network based, integrative biomarker signature discovery. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1325–1326, 1 maio 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu025>.

DE LOS CAMPOS, G.; GIANOLA, D. Factor analysis models for structuring covariance matrices of additive genetic effects: a Bayesian implementation. **Genetics Selection Evolution**, v. 39, n. 5, p. 481, 2007. Disponível em: <http://www.gsejournal.org/content/39/5/481>.

DIKEMAN, M. E. et al. Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 10, p. 2461, 2005.

DINKEL, C. A.; BUSCH, D. A. Genetic Parameters among Production, Carcass Composition and Carcass Quality Traits of Beef Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 36, n. 5, p. 832–846, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1973.365832x>.

DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 51, n. 1, 3 set. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471250953.bi1114s51>.

EDWARDS, J. R.; RUPAREL, H.; JU, J. Mass-spectrometry DNA sequencing. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 573, n. 1–2, p. 3–12, jun. 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510705000230>.

FILHO, L. **Pecuária da carne bovina**. first edit ed. [s.l: s.n.]

FRIEDLÄNDER, M. R. et al. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 1, p. 37–52, jan. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr688>.

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 6, p. 1683–1695, mar. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200800562>.

GILAR, M. et al. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 14, p. 1694–1703, set. 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500116>.

GONÇALVES, T. M. et al. Gene Co-expression Analysis Indicates Potential Pathways and Regulators of Beef Tenderness in Nellore Cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 5 out. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00441/full>.

GU, Z.; ELESWARAPU, S.; JIANG, H. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 981–988, 6 mar. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2007.01.081>.

GUERRERO, A. et al. Some factors that affect ruminant meat quality: from the farm to the fork. Review - doi: 10.4025/actascianimsci.v35i4.21756. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 35, n. 4, 17 out. 2013. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/21756>.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 83, 5 dez. 2017. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1215-1>.

HIRA, Z. M.; GILLIES, D. F. A Review of Feature Selection and Feature Extraction Methods Applied on Microarray Data. **Advances in Bioinformatics**, v. 2015, p. 1–13, 11 jun. 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/abi/2015/198363/>.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th ed. ed. [s.l: s.n.]

HOUSE, A. E.; LYNCH, K. W. Regulation of Alternative Splicing: More than Just the ABCs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 3, p. 1217–1221, jan. 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820696120>.

HUANG, S.; CHAUDHARY, K.; GARMIRE, L. X. More is better: Recent progress in multi-omics data integration methods. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. JUN, p. 1–12, 2017.

HUDSON, N. J.; REVERTER, A.; DALRYMPLE, B. P. A Differential Wiring Analysis of Expression Data Correctly Identifies the Gene Containing the Causal Mutation. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 5, p. e1000382, 1 maio 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1000382>.

IDEKER, T.; GALITSKI, T.; HOOD, L. A new approach to decoding life: systems biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, n. 1, p. 343–372, set. 2001. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.2.1.343>.

Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35057062>.

KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, n. 3, p. 187–200, set. 1958. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF02289233>.

KANDPAL, R. P.; SAVIOLA, B.; FELTON, J. The era of 'omics unlimited. **BioTechniques**, v. 46, n. 5, p. 351–

355, abr. 2009. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113137>.

KAPPELER, B. I. G. et al. MiRNAs differentially expressed in skeletal muscle of animals with divergent estimated breeding values for beef tenderness. **BMC Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 1, 3 dez. 2019. Disponível em: <https://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12867-018-0118-3>.

KIM, D. et al. Predicting censored survival data based on the interactions between meta-dimensional omics data in breast cancer. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 56, p. 220–228, ago. 2015.

KOOHMARAIE, M. et al. Effects of Postmortem Storage on Muscle Protein Degradation: Analysis by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 292–293, jan. 1984. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13732.x>.

KUHN, M. Building Predictive Models in R Using the caret Package. **Journal of Statistical Software**, v. 28, n. 5, 2008. Disponível em: <http://www.jstatsoft.org/v28/i05/>.

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 3, p. 191–203, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2732>.

LALLI, P. M. et al. Baseline resolution of isomers by traveling wave ion mobility mass spectrometry: investigating the effects of polarizable drift gases and ionic charge distribution. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 9, p. 989–997, set. 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3245>.

LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 559, 29 dez. 2008. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-9-559>.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**. 1ª ed. [s.l.] Artmed, 2004.

LEAL-GUTIÉRREZ, J. D. et al. Structural Equation Modeling and Whole-Genome Scans Uncover Chromosome Regions and Enriched Pathways for Carcass and Meat Quality in Beef. **Frontiers in Genetics**, v. 9, 13 nov. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00532/full>.

LEE, D. Y. et al. Role of Protein Methylation in Regulation of Transcription. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 2, p. 147–170, abr. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2004-0008>.

LI, S.; XU, X.; ZHOU, G. The roles of the actin-myosin interaction and proteolysis in tenderization during the aging of chicken muscle. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 150–160, jan. 2012.

LI, W. et al. Integrative Analysis of Many Weighted Co-Expression Networks Using Tensor Computation. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 6, p. e1001106, 16 jun. 2011. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1001106>.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014. Disponível em: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8>.

LOWE, B. **Dissertation: "Mechanical Measurement of the Tenderness of Raw and Cooked Beef**. 1934. University of Chicago, 1934.

LOWRY, O. H.; GILLIGAN, D. R.; KATERSKY, V. M. THE DETERMINATION OF COLLAGEN AND ELASTIN IN TISSUES, WITH RESULTS OBTAINED IN VARIOUS NORMAL TISSUES FROM DIFFERENT SPECIES. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 139, p. 795, 1941.

MA, S. et al. Identification and characterization of differentially expressed exosomal microRNAs in bovine milk infected with Staphylococcus aureus. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 934, 5 dez. 2019. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-6338-1>.

MAGALHÃES, A. F. B. et al. Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in Nellore Cattle. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157845, jun. 2016.

MAPA. **PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO: Brasil 2015/16 a 2025/26**.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011. Disponível em: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>.

MENG, C. et al. Dimension reduction techniques for the integrative analysis of multi-omics data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 4, p. 628–641, 2016.

MERKLE, E. C.; ROSSEEL, Y. blavaan : Bayesian Structural Equation Models via Parameter Expansion. **Journal of Statistical Software**, v. 85, n. 4, 2018.

MetaCore MetaCore Login | Clarivate. Available at: https://portal.genego.com/ [Accessed June 8, 2021]. , [s.d.].

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, jan. 2010.

MISRA, B. B. et al. Integrated omics: tools, advances and future approaches. **Journal of Molecular Endocrinology**, n. 2016, p. R21–R45, 2018.

MOMEN, M. et al. Modeling multiple phenotypes in wheat using data-driven genomic exploratory factor analysis and Bayesian network learning. **Plant Direct**, v. 5, n. 1, 25 jan. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pld3.304>.

MORZEL, M. et al. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. **Meat Science**, v. 78, n. 3, p. 297–304, mar. 2008.

MOSCA, E.; MILANESI, L. Network-based analysis of omics with multi-objective optimization. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 12, p. 2971, 2013. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3mb70327d>.

MÜLLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaça de novilhos**. Santa Maria, Brasil: Imprensa Universitária, 1987.

MUNIZ, M. M. M. et al. Identification of novel mRNA isoforms associated with meat tenderness using RNA sequencing data in beef cattle. **Meat Science**, v. 173, p. 108378, mar. 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917402030810X>.

NARDINI, C.; DENT, J.; TIERI, P. Editorial: Multi-omic data integration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, 7 jul. 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcell.2015.00046/abstract>.

NASCIMENTO, M. L. et al. Feed efficiency indexes and their relationships with carcass, non-carcass and meat quality traits in Nellore steers. **Meat Science**, v. 116, p. 78–85, jun. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174016300134>.

NEAPOLITAN, R. E.; OTHERS. **Learning bayesian networks**. [s.l.] Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2004. v. 38

NEUMAN, R. E.; LOGAN, M. A. The determination of collagen and elastin in tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 186, n. 2, p. 549–56, out. 1950.

NJISANE, Y. Z.; MUCHENJE, V. Farm to abattoir conditions, animal factors and their subsequent effects on cattle behavioural responses and beef quality — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n. 6, p. 755–764, 9 set. 2016. Disponível em: <http://www.ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.16.0037>.

NOBLE, D. A theory of biological relativity: no privileged level of causation. **Interface Focus**, v. 2, n. 1, p. 55–64, 6 fev. 2012. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsfs.2011.0067>.

NOVAIS, F. J. et al. Identification of a metabolomic signature associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 8, 7 dez. 2019. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5406-2>.

NOWAK, D. Enzymes in Tenderization of Meat - The System of Calpains and Other Systems - a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 4, jan. 2011.

OUALI, A. et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 44–58, set. 2006.

OUALI, A.; DEMEYER, D.; SMULDERS, F. Editorial, In'Tissue proteinases and regulation of protein degradation as related to meat quality', eds. A. Ouali, DI Demeyer and FJM Smulders, ECCEAMST, Audet Tijdschriften, Nijmegen, pp. V-VI, 1995. [s.d.]

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 87–98, fev. 2011.

PE'ER, D. Bayesian Network Analysis of Signaling Networks: A Primer. **Science Signaling**, v. 2005, n. 281, p. pl4–pl4, 26 abr. 2005. Disponível em: <https://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/stke.2812005pl4>.

PEARCE, K. L. et al. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes — A review. **Meat Science**, v. 89, n. 2, p. 111–124, out. 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174011001434>.

PEARL, J. **Causality**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.

PINTO, L. F. B. et al. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1431–1442, 2010.

POLETI, M. D. et al. Longissimus dorsi muscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. **Journal of Proteomics**, v. 179, p. 30–41, maio 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439191830085X>.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. de M. 1.2. Produção brasileira de carne bovina. In: **Avaliação da Qualidade de Carnes-Fundamentos e Metodologias**. Viçosa-MG, Brazil: Editora UFV, 2007. p. 28–29.

RANI, P.; ONTERU, S. K.; SINGH, D. Genome-wide profiling and analysis of microRNA expression in buffalo milk exosomes. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100769, dez. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221242922031107X>.

REVELLE, W. R. **psych: Procedures for Personality and Psychological Research**, 2017. .

RIETVELD, T.; HOUT, R. van. **Statistical Techniques for the Study of Language and Language Behaviour**. [s.l.] DE GRUYTER MOUTON, 1993.

RITCHIE, M. D. et al. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 2, p. 85–97, 13 fev. 2015a. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrg3868>.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015b. Disponível em: <http://academic.oup.com/nar/article/43/7/e47/2414268/limma-powers-differential-expression-analyses-for>.

RODIN, A. S.; BOERWINKLE, E. Mining genetic epidemiology data with Bayesian networks I: Bayesian networks and example application (plasma apoE levels). **Bioinformatics**, v. 21, n. 15, p. 3273–3278, 1 ago. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bti505>.

RODRIGUES, R. T. de S. et al. Differences in Beef Quality between Angus (Bos taurus taurus) and Nellore (Bos taurus indicus) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170294, 19 jan. 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170294>.

ROSA, A. F. et al. Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. **Meat Science**, v. 138, p. 1–9, abr. 2018.

RUST, S. R. et al. Predicting beef tenderness using near-infrared spectroscopy1. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 211–219, 1 jan. 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/86/1/211/4788906>.

SALEH, L.; PERLER, F. B. Protein splicingIn Cis andIn Trans. **The Chemical Record**, v. 6, n. 4, p. 183–193, 2006. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.20082>.

SAVELL, J. W.; MUELLER, S. L.; BAIRD, B. E. The chilling of carcasses. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 449–459, jul. 2005.

SCHADT, E. E. et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 7, p. 710–717, jul. 2005.

SCUTARI, M. Learning Bayesian Networks with the {bnlearn} {R} Package. **Journal of Statistical Software**, v. 35, n. 3, p. 1–22, 2010.

SHACKELFORD, S. D. et al. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of animal science**, v. 72, n. 4, p. 857–63, abr. 1994.

SHAPIRO, J. A. Revisiting the Central Dogma in the 21st Century. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, n. 1, p. 6–28, out. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.04990.x>.

SHULAEV, V. Metabolomics technology and bioinformatics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 7, n. 2, p. 128–139, mar. 2006.

SIFRE, L. et al. Influence of the Spatial Organization of the Perimysium on Beef Tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8390–8399, out. 2005.

SILVA, V. H. da et al. Genome-Wide Detection of CNVs and Their Association with Meat Tenderness in Nelore Cattle. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157711, jun. 2016.

SILVA, W. M. et al. Label-free proteomic analysis to confirm the predicted proteome of Corynebacterium pseudotuberculosis under nitrosative stress mediated by nitric oxide. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1065, 2014. Disponível em: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-1065>.

SOUZA, G. H. M. F.; GUEST, P. C.; MARTINS-DE-SOUZA, D. LC-MSE, Multiplex MS/MS, Ion Mobility, and Label-Free Quantitation in Clinical Proteomics. In: [s.l: s.n.]p. 57–73.

SPERRING, D. D.; PLATT, W. T.; HINER, R. L. Tenderness in beef muscle as measured by pressure. **Food Technology**, v. 13, p. 155, 1959.

SURAVAJHALA, P.; KOGELMAN, L. J. A.; KADARMIDEEN, H. N. Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. **Genetics Selection Evolution**, v. 48, n. 1, p. 38, 29 dez. 2016. Disponível em: <http://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12711-016-0217-x>.

THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57–74, 5 set. 2012. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature11247>.

TIZIOTO, P. C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, n.

21, p. 1012–1020, 1 nov. 2013. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiolgenomics.00066.2013>.

TRESSLER, D. K.; BIRDSEYE, C.; MURRAY, W. T. Tenderness of Meat I. Determination of Relative Tenderness of Chilled and Quick-Frozen Beef. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 242–245, fev. 1932.

USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2021.

VAN VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 302, n. 1, p. 1–7, jan. 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2009.01767.x>.

VOY, B. H. Systems Genetics: a Powerful Approach for Gene-Environment Interactions. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 515–519, mar. 2011.

WANG, B. et al. Similarity network fusion for aggregating data types on a genomic scale. **Nature Methods**, v. 11, n. 3, p. 333–337, 26 mar. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth.2810>.

WANG, D.; GU, J. Integrative clustering methods of multi-omics data for molecule-based cancer classifications. **Quantitative Biology**, v. 4, n. 1, p. 58–67, 4 mar. 2016. Disponível em: <https://journal.hep.com.cn/qb/EN/10.1007/s40484-016-0063-4>.

WANG, H. et al. Extensibility of Single Beef Muscle Fibers. **Journal of Animal Science**, v. 15, n. 1, p. 97, 1956.

WANG, J. et al. Pathway and Network Approaches for Identification of Cancer Signature Markers from Omics Data. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 54–65, 2015. Disponível em: <http://www.jcancer.org/v06p0054.htm>.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WARNER, K. F. Progress report of the mechanical test for tenderness of meat. **Annual Proceedings American Society of Animal Production**, p. 11, 1928.

WEINSTEIN, J. N. et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1113–1120, 26 out. 2013. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ng.2764>.

WEIR, C. E. Palatability characteristics of meat. In: **The Science of Meat and Products**. San Francisco: W. H. Freeman: American Meat Institute Foundation, 1960. p. 212–221.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. **USDA**, p. 7, 1995.

WHEELER, T. L. et al. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): Carcass, yield, and longissimus palatability traits1,2. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 196–207, 1 jan. 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/83/1/196/4790770>.

WIDMANN, P. et al. A systems biology approach using metabolomic data reveals genes and pathways interacting to modulate divergent growth in cattle. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 798, 2013. Disponível em: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-798>.

WINKLER, C. A. TENDERNESS OF MEAT: I. A RECORDING APPARATUS FOR ITS ESTIMATION, AND RELATION BETWEEN pH AND TENDERNESS. **Canadian Journal of Research**, v. 17d, n. 1, p. 8–14, jan. 1939.

WRIGHT, S. A. et al. Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. **Meat Science**, v. 135, p. 84–93, jan. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030917401730431X>.

WU, G. et al. Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 637–645, dez. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174014001788>.

WULF, D. M. et al. Genetic influences on beef longissimus palatability in charolais- and limousin-sired steers and heifers. **Journal of animal science**, v. 74, n. 10, p. 2394–405, out. 1996.

YANG, H. et al. Association of 3 polymorphisms in porcine troponin I genes (TNNI1 andTNNI2) with meat quality traits. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, n. 1, p. 51–57, mar. 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF03195710>.

YU, H. et al. Genomic Bayesian confirmatory factor analysis and Bayesian network to characterize a wide spectrum of rice phenotypes. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 6, p. 1975–1986, 2019.

YU, H. et al. Deciphering Cattle Temperament Measures Derived From a Four-Platform Standing Scale Using Genetic Factor Analytic Modeling. **Frontiers in Genetics**, v. 11, n. June, p. 1–10, 2020.

YU, Q. et al. Unraveling proteome changes of Holstein beef M. semitendinosus and its relationship to meat discoloration during post-mortem storage analyzed by label-free mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 154, p. 85–93, fev. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916305309>.

YU, Y.-Q. et al. Enzyme-Friendly, Mass Spectrometry-Compatible Surfactant for In-Solution Enzymatic Digestion of Proteins. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 21, p. 6023–6028, nov. 2003. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac0346196>.

YUGI, K. et al. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple "Omic" Layers. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 276–290, abr. 2016.

ZAKRYS-WALIWANDER, P. I. et al. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine M. longissimus dorsi muscle during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 527–532, mar. 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461101274X>.

ZWAMBAG, A. et al. Heritability of beef tenderness at different aging times and across breed comparisons. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 93, n. 3, p. 307–312, set. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Módulos marrom e azul provindos da análise WGCNA. ID: idenfiticação no Emsembl. Gene: nome do gene correspondente.

Módulo	ID	Gene
brown	ENSBTAG00000002321	KHDC4
brown	ENSBTAG00000005589	SNAPC4
brown	ENSBTAG00000011456	NICN1
brown	ENSBTAG00000011689	CCDC77
blue	ENSBTAG00000003495	LTN1
blue	ENSBTAG00000023867	NFIA
blue	ENSBTAG00000006748	ATP11B
blue	ENSBTAG00000008082	FILIP1
blue	ENSBTAG00000027932	RANBP2
blue	ENSBTAG00000011721	N4BP2
blue	ENSBTAG00000020505	CERT1

APÊNDICE B. Escores das variáveis latentes obtidas pelo método BCFA que refletem a contribuição de cada variável latente nos animais. Assumidos como novos fenótipos para análises posteriores.

NLAB	BFT	Meat Quality	Carcass	Fat Content	REA	prot 1	prot 2	prot 4	prot 5	mirna 1	mirna 2	mirna 3	blue	brown
NE001403	4.67	6.95	139.94	3.89	42.53	0.20	-2.20	-1.05	2.80	1.54	0.43	1.08	3.10	3.43
NE001407	2.60	6.87	191.66	4.24	54.96	-0.26	-2.99	-3.77	2.02	1.70	0.14	0.97	2.72	3.71
NE001408	1.97	6.77	174.22	4.06	49.95	0.38	-1.94	-2.02	2.34	1.88	0.12	1.28	2.00	3.13
NE001439	2.27	7.28	157.72	4.24	46.83	0.40	-2.24	-1.49	2.91	2.03	-0.12	1.21	3.04	3.60
NE001448	3.14	6.30	176.53	3.86	50.55	-0.10	-1.86	-2.24	2.67	2.00	-0.11	0.94	3.17	3.48
NE001455	3.60	7.32	157.99	4.36	46.71	0.99	-0.50	-0.40	4.13	1.53	0.63	1.33	2.89	3.66
NE001458	2.31	6.85	186.05	4.12	53.46	0.00	-2.34	-2.55	2.21	1.93	0.49	1.49	3.21	3.65
NE001483	2.96	6.86	159.13	4.04	46.48	-0.11	-2.13	-4.51	1.72	1.62	0.27	1.17	2.96	3.63
NE001494	2.65	7.07	160.89	4.07	47.37	-0.25	-2.14	-2.68	1.97	1.99	0.12	0.72	3.25	3.12
NE001509	4.89	6.48	145.00	3.86	42.54	0.72	-0.48	-2.02	3.14	1.90	0.37	0.92	2.09	3.83
NE001515	3.21	7.21	169.79	4.29	49.45	0.46	-1.18	-2.31	2.91	1.99	0.34	1.28	3.24	3.50
NE001531	3.14	6.47	145.97	3.78	42.79	0.24	-0.99	-2.84	2.27	1.93	0.16	0.95	2.87	3.55
NE001533	1.70	6.41	121.17	3.46	36.93	-0.25	-1.63	-2.50	1.48	1.89	0.40	1.31	2.85	2.60
NE001553	3.52	6.42	153.78	4.02	44.71	0.21	-1.38	-3.70	2.21	2.36	-0.60	0.36	2.56	3.49
NE001587	3.22	6.58	142.43	3.78	42.12	0.32	-1.17	-3.06	2.18	1.81	0.53	1.10	3.15	3.50
NE001590	2.01	6.43	148.57	3.59	43.10	0.58	-0.43	-1.66	2.99	1.89	0.11	1.35	1.92	1.91
NE001596	2.54	7.01	143.99	4.03	42.92	0.09	-2.13	-2.43	2.58	1.87	0.17	1.48	0.19	2.08
NE001618	3.44	6.50	150.51	3.70	43.96	0.23	-1.68	-3.03	1.58	1.54	0.57	1.08	2.57	3.77
NE001619	3.00	7.39	146.06	3.70	43.55	0.28	-2.06	-2.68	1.73	1.57	0.68	1.32	2.62	3.55
NE001633	3.05	6.58	153.37	3.96	44.90	-0.35	-1.40	-3.08	1.75	2.03	0.00	1.12	2.64	3.02
NE001634	1.95	6.36	138.06	3.27	41.61	-0.49	-3.24	-2.98	0.08	1.57	0.46	0.94	3.34	2.64
NE001635	3.44	6.81	163.63	3.83	47.40	-0.11	-1.19	-3.93	2.12	1.92	0.31	0.96	3.50	1.71
NE001637	1.64	6.64	161.28	3.85	47.18	0.18	-2.61	-2.85	2.12	1.99	-0.02	1.15	2.85	2.81
NE001672	1.98	6.36	131.49	3.52	39.48	-0.38	-2.08	-2.61	1.50	1.68	0.05	0.87	3.22	3.38
NE001673	2.32	6.26	142.62	3.63	41.74	-0.24	-1.47	-3.71	1.49	2.03	-0.05	1.17	2.58	3.40
NE001675	1.81	6.88	157.97	3.91	46.15	0.05	-1.92	-3.12	1.73	1.98	0.24	0.96	3.13	3.22
NE001681	2.55	7.34	159.86	4.31	47.21	-0.23	-2.27	-3.67	2.14	1.83	0.11	1.24	3.04	3.55
NE001721	2.57	5.61	143.45	3.09	41.67	-0.25	-2.64	-3.66	0.63	1.84	0.66	1.29	2.19	3.67
NE001727	1.83	6.30	155.29	3.71	45.11	-0.19	-1.61	-3.91	1.42	1.81	0.23	1.12	2.97	3.27
NE001730	2.31	7.03	148.21	3.92	44.28	-0.05	-1.33	-1.96	2.08	1.59	0.66	1.11	2.89	3.85
NE001735	3.46	6.86	141.41	3.90	42.33	-0.41	-2.24	-3.87	1.28	1.79	0.23	1.11	3.21	2.79
NE001737	3.05	6.58	140.50	3.59	41.87	-0.49	-2.34	-3.82	1.11	2.05	0.03	0.27	2.99	3.71
NE001743	3.00	6.78	164.03	3.89	47.79	-0.17	-2.06	-3.19	1.63	1.89	0.35	1.21	3.19	3.21
NE001759	1.70	6.73	135.82	3.70	40.83	0.17	-1.96	-1.86	2.24	1.69	0.01	0.90	3.24	2.69

NE001769	1.87	6.37	149.93	3.54	44.13	-0.28	-2.53	-3.10	1.41	1.85	0.09	1.08	3.05	1.53
NE001774	2.19	6.47	177.31	3.87	50.75	-0.08	-2.57	-3.64	1.12	1.64	0.43	1.22	3.14	3.35
NE001775	2.29	6.32	156.94	3.57	45.83	-0.32	-2.37	-1.62	1.56	1.87	-0.30	0.50	3.12	3.20
NE001779	2.61	6.48	155.26	3.79	45.52	0.07	-2.08	-2.36	1.87	1.90	0.26	1.34	2.97	3.54
NE001781	1.85	6.39	138.82	3.56	40.84	0.16	-1.01	-2.78	1.90	2.08	0.13	1.21	2.97	3.60
NE001783	2.99	6.48	144.50	3.41	42.25	0.94	-0.15	-0.68	3.73	1.95	0.24	1.13	2.77	3.67
NE001788	3.27	6.25	162.90	3.58	47.10	-0.20	-2.31	-2.52	1.37	1.94	0.17	1.11	2.88	3.63
NE001796	3.03	6.19	145.75	3.40	42.95	0.11	-1.98	-2.20	2.29	1.98	0.20	0.94	3.24	3.47
NE001805	2.81	6.26	140.05	3.61	41.35	0.11	-1.54	-2.58	1.90	1.82	-0.66	0.09	3.12	3.72
NE001823	1.91	6.20	138.12	3.30	41.14	0.07	-2.26	-2.74	1.56	1.79	0.97	1.45	3.24	2.65
NE001831	2.98	6.56	136.63	3.60	41.28	0.12	-2.30	-1.56	1.80	1.91	0.81	1.62	2.99	3.55
NE001832	2.75	6.42	136.39	3.55	40.87	0.10	-2.27	-2.30	1.38	2.02	0.19	1.02	3.11	3.49
NE001833	3.23	6.63	138.91	3.62	41.65	-0.08	-1.93	-1.82	1.66	1.62	0.20	0.87	3.06	3.55
NE001863	1.93	6.29	135.66	3.18	40.44	-0.45	-2.27	-2.88	1.55	1.92	0.13	1.23	3.07	0.83
NE001864	1.84	6.51	121.71	3.56	36.90	-0.05	-1.52	-3.04	1.67	1.62	0.18	0.93	3.14	3.36
NE001868	2.39	6.56	129.94	3.65	38.44	0.27	-1.05	-2.21	2.48	1.58	0.03	0.81	-0.21	2.22
NE001874	1.60	6.27	119.21	3.27	36.21	0.19	-1.16	-1.56	2.30	1.80	0.20	1.18	3.16	1.31
NE001881	1.65	6.37	155.49	3.76	45.13	0.09	-1.38	-2.42	2.33	1.55	0.11	0.95	3.07	3.49
NE001882	1.58	6.40	154.89	3.72	45.21	-0.03	-1.96	-3.26	1.93	1.82	0.04	1.23	3.21	3.75
NE001886	1.49	6.45	105.66	3.13	33.12	0.22	-1.12	-3.11	1.58	1.67	0.55	1.47	3.26	3.36
NE001887	1.20	6.48	106.13	3.19	33.41	0.23	-1.28	-1.77	2.48	1.93	0.02	1.25	2.90	3.19
NE001909	1.77	6.22	139.46	3.73	40.72	0.12	-1.12	-2.37	2.22	2.00	-0.29	0.71	1.22	3.28
NE001928	2.28	6.79	128.41	3.67	38.87	0.69	-1.01	-2.13	2.97	1.85	0.46	1.31	3.26	3.52
NE001932	2.32	6.37	150.51	3.73	44.33	0.10	-1.95	-1.52	2.21	1.93	0.19	1.28	2.81	2.86
NE001935	1.90	6.33	159.00	3.62	45.77	0.49	-1.20	-3.04	2.37	1.91	0.10	1.02	2.96	3.38
NE001937	2.21	6.50	110.32	3.29	34.70	-0.48	-2.15	-2.40	1.30	1.61	0.19	0.77	3.33	3.36
NE001944	2.38	6.77	115.76	3.64	36.12	0.51	-0.77	-1.24	2.90	1.97	0.29	1.17	2.97	1.58
NE001945	1.90	6.48	119.80	3.52	36.34	-0.51	-1.79	-5.14	1.34	2.03	-0.59	1.33	3.03	2.67
NE001949	1.76	6.43	159.90	3.83	46.45	0.23	-1.80	-2.35	2.09	1.78	0.42	1.32	2.87	3.39
NE001954	2.57	6.31	132.78	3.53	39.49	-0.01	-1.20	-2.02	2.32	1.90	0.15	1.20	1.12	3.37
NE001981	2.30	6.72	121.03	3.62	37.20	0.06	-1.68	-2.57	2.27	1.96	-0.18	0.80	3.08	2.28
NE001984	3.29	6.17	114.99	3.14	35.05	0.21	-0.74	-1.40	2.13	1.55	0.85	1.22	2.87	3.54
NE001989	1.53	6.43	112.98	3.26	34.94	0.97	-0.74	-1.05	2.92	1.81	0.59	1.45	3.28	3.21
NE002003	2.12	6.29	128.36	3.47	38.38	0.46	-0.80	-2.81	2.70	2.16	0.20	1.65	3.14	3.38
NE002007	2.09	6.69	111.15	3.53	34.64	0.36	-0.63	-0.49	2.85	1.64	0.46	1.25	3.01	3.62
NE002013	2.80	6.29	133.01	3.44	39.78	1.17	-0.53	-0.90	3.35	1.59	1.06	1.36	2.72	3.18
NE002015	1.33	6.07	128.94	3.07	38.32	0.37	-1.22	-1.67	2.34	1.54	0.32	1.12	2.76	0.35
NE00202	1.63	6.67	134.00	3.60	40.3	-0.29	-2.30	-3.19	1.44	2.02	0.27	1.65	3.05	3.43

3					4									
NE002030	1.70	6.51	150.93	3.63	44.08	-0.25	-1.46	-4.35	1.64	1.88	0.19	1.29	3.01	3.34
NE002742	1.29	6.69	130.78	3.64	39.50	0.66	-0.59	-1.31	3.14	1.94	0.01	1.14	3.02	1.43
NE002754	2.06	6.04	117.19	3.24	35.74	-0.05	-1.53	-2.36	2.01	1.90	-0.08	1.05	3.00	3.07
NE002766	1.87	6.48	120.78	3.38	36.86	0.31	-1.32	-2.18	2.48	1.82	-0.15	0.92	2.76	1.86
NE002788	1.55	6.38	131.71	3.38	39.32	0.14	-1.34	-2.26	1.82	1.93	0.54	1.47	3.05	2.92
NE002795	1.50	6.64	143.10	3.69	42.48	0.41	-1.57	-1.68	2.60	1.88	0.10	1.19	2.78	3.46
NE003170	1.62	6.43	113.93	3.49	34.91	0.37	-0.73	-1.76	2.49	1.94	0.03	0.90	2.91	3.46
NE003248	1.83	6.71	127.76	3.74	39.04	0.24	-1.15	-1.85	2.42	1.95	0.15	1.32	3.20	3.28
NE003285	1.53	6.22	109.20	3.22	33.93	-0.40	-2.00	-2.06	1.39	1.96	-0.20	0.93	2.65	3.51
NE003327	1.84	6.28	129.83	3.48	38.63	-0.12	-1.40	-2.01	1.79	1.84	0.17	1.21	0.68	3.65
NE003343	2.09	6.61	139.29	3.61	41.82	-0.09	-2.13	-3.34	1.48	1.92	0.27	1.28	2.83	3.86
NE003344	3.43	6.37	131.63	3.51	39.67	-0.16	-1.11	-2.20	2.30	1.84	0.17	1.05	2.90	3.49
NE003349	2.35	6.14	145.35	3.47	42.75	-0.30	-2.23	-2.96	1.77	1.80	0.08	1.10	2.37	3.86
NE003355	1.96	6.20	131.89	3.45	39.56	-0.25	-2.21	-2.45	1.53	1.89	0.24	1.40	2.25	3.77
NE003366	2.71	6.39	154.23	3.70	44.81	0.29	-0.57	-2.30	2.73	1.98	0.17	0.78	3.08	3.44
NE003408	2.14	6.44	131.62	3.46	39.67	0.05	-1.86	-2.51	1.62	1.85	0.30	1.27	2.83	3.61
NE003414	2.14	6.86	130.00	3.87	39.75	0.21	-1.93	-2.28	2.33	1.97	0.37	1.22	2.28	3.79
NE003431	2.65	6.71	142.17	3.80	42.35	0.34	-0.60	-1.48	3.17	1.84	0.19	1.19	2.76	3.17
NE003458	1.85	6.48	103.45	3.09	32.84	0.08	-1.53	-1.71	1.78	1.63	0.16	0.87	3.05	2.20
NE003460	1.55	6.36	113.76	3.23	35.44	0.09	-1.63	-1.82	1.59	1.80	1.02	1.60	2.59	3.59
NE003464	2.42	6.39	142.31	3.50	42.27	0.12	-1.44	-1.84	2.45	1.60	0.16	0.88	2.81	3.35
NE003489	2.08	6.53	112.86	3.18	35.76	0.13	-3.10	-1.67	1.59	1.83	0.41	1.34	3.23	3.45
NE003490	1.81	6.52	116.78	3.34	36.35	-0.10	-1.86	-2.16	1.81	1.96	0.20	1.31	3.01	2.60
NE003491	3.18	6.26	141.82	3.66	42.09	0.20	-1.57	-1.25	2.53	1.84	0.25	1.32	1.21	3.92
NE003493	2.51	6.15	140.90	3.50	41.82	0.31	-1.79	-2.31	1.85	1.57	0.46	1.35	2.65	3.69
NE003496	3.80	6.60	128.67	3.75	39.32	0.38	-1.17	-1.32	2.77	1.96	0.11	0.92	3.08	3.33
NE003497	2.71	6.21	144.82	3.58	42.85	0.52	-1.15	-0.96	3.11	1.96	0.14	1.17	2.67	3.90
NE003835	2.53	6.44	138.81	3.66	41.13	-0.41	-1.93	-3.50	1.47	1.99	-0.02	1.05	1.41	1.75
NE003837	2.00	6.09	139.44	3.60	40.96	0.49	-0.76	-1.00	3.11	1.86	0.31	1.14	2.28	3.60
NE003840	1.55	6.72	133.48	3.70	40.14	0.21	-1.27	-2.29	2.35	1.89	0.13	1.38	3.13	3.34

APÊNDICE C. Fatores prot1, prot2, prot4 e prot5, suas respectivas proteínas. Fator: Fator a que pertence. ID proteína: Identificação no banco de dados UniProt. Entrada: Abreviação no banco de dados Uniprot. Nome: Nome da proteína (em inglês)

FATOR	ID proteína	Entry name	Protein names
prot1	P79293	MYH7	Myosin-7 (Myosin heavy chain 7) (Myosin heavy chain slow isoform) (MyHC-slow) (Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform) (MyHC-beta)
prot1	A2ASS6	TITIN	Titin (EC 2.7.11.1) (Connectin)
prot1	Q9BE40	MYH1	Myosin-1 (Myosin heavy chain 1) (Myosin heavy chain 2x) (MyHC-2x) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 1)
prot1	Q3T0P6	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3)
prot1	Q5E956	TPIS	Triosephosphate isomerase (TIM) (EC 5.3.1.1) (Methylglyoxal synthase) (EC 4.2.3.3) (Triose-phosphate isomerase)
prot1	Q05639	EF1A2	Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2) (Eukaryotic elongation factor 1 A-2) (eEF1A-2) (Statin-S1)
prot1	P10096	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-)
prot1	P19858	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (EC 1.1.1.27) (LDH muscle subunit) (LDH-M)
prot1	P11974	KPYM	Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Pyruvate kinase muscle isozyme)
prot1	P79134	ANXA6	Annexin A6 (Annexin VI) (Annexin-6)
prot1	Q32KV0	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2 (EC 5.4.2.11) (EC 5.4.2.4) (BPG-dependent PGAM 2)
prot1	Q08DP0	PGM1	Phosphoglucomutase-1 (PGM 1) (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 1)
prot1	P11116	LEG1	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (S-Lac lectin 1)
prot1	P00570	KAD1	Adenylate kinase isoenzyme 1 (AK 1) (EC 2.7.4.3) (EC 2.7.4.6) (ATP-AMP transphosphorylase 1) (ATP:AMP phosphotransferase) (Adenylate monophosphate kinase) (Myokinase)
prot1	Q3ZBD7	G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) (EC 5.3.1.9) (Autocrine motility factor) (AMF) (Neuroleukin) (NLK) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phosphohexose isomerase) (PHI)
prot1	Q9XSC6	KCRM	Creatine kinase M-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase M chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-M) (M-CK)
prot1	P00883	ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Muscle-type aldolase)
prot1	Q5E946	PARK7	Parkinson disease protein 7 homolog (Maillard deglycase) (Parkinsonism-associated deglycase) (Protein DJ-1) (DJ-1) (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1) (EC 3.1.2.-) (EC 3.5.1.-) (EC 3.5.1.124)
prot1	Q6QGC0	PDLI3	PDZ and LIM domain protein 3 (Actinin-associated LIM protein) (Alpha-actinin-2-associated LIM protein)
prot1	Q62234	MYOM1	Myomesin-1 (Myomesin family member 1) (Skelemin)
prot1	P52179	MYOM1	Myomesin-1 (190 kDa connectin-associated protein) (190 kDa titin-associated protein) (Myomesin family member 1)
prot1	P79334	PYGM	Glycogen phosphorylase, muscle form (EC 2.4.1.1) (Myophosphorylase)
prot1	Q5KR49	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain (Alpha-tropomyosin) (Tropomyosin-1)
prot1	P35573	GDE	Glycogen debranching enzyme (Glycogen debrancher) [Includes: 4-alpha-glucanotransferase (EC 2.4.1.25) (Oligo-1,4-1,4-glucantransferase); Amylo-alpha-1,6-glucosidase (Amylo-1,6-glucosidase) (EC 3.2.1.33) (Dextrin 6-alpha-D-glucosidase)]
prot1	Q9BE41	MYH2	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2) (Myosin heavy chain 2a) (MyHC-2a) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, adult 2)
prot1	Q0III9	ACTN3	Alpha-actinin-3 (Alpha-actinin skeletal muscle isoform 3) (F-actin cross-linking protein)
prot1	Q3ZC55	ACTN2	Alpha-actinin-2 (Alpha-actinin skeletal muscle isoform 2) (F-actin cross-linking protein)
prot1	P54296	MYOM2	Myomesin-2 (165 kDa connectin-associated protein) (165 kDa titin-associated protein) (M-protein) (Myomesin family member 2)
prot2	P00829	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 7.1.2.2) (ATP synthase F1 subunit beta)
prot2	Q3T145	MDHC	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37) (Cytosolic malate dehydrogenase)

prot2	Q8MKH6	TNNT1	Troponin T, slow skeletal muscle (TnTs) (Slow skeletal muscle troponin T) (sTnT)
prot2	P19483	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP synthase F1 subunit alpha)
prot2	P23004	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (Complex III subunit 2) (Core protein II) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2)
prot2	P12344	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial (mAspAT) (EC 2.6.1.1) (Fatty acid-binding protein) (FABP-1) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2) (Kynurenine aminotransferase 4)
prot2	Q32LG3	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.37)
prot2	P31800	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Complex III subunit 1) (Core protein I) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1)
prot2	Q6ZMU5	TRI72	Tripartite motif-containing protein 72 (Mitsugumin-53) (Mg53)
prot2	P33097	AATC	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic (cAspAT) (EC 2.6.1.1) (EC 2.6.1.3) (Cysteine aminotransferase, cytoplasmic) (Cysteine transaminase, cytoplasmic) (cCAT) (Glutamate oxaloacetate transaminase 1) (Transaminase A)
prot4	P48788	TNNI2	Troponin I, fast skeletal muscle (Troponin I, fast-twitch isoform)
prot4	Q9TV62	MYH4	Myosin-4 (Myosin heavy chain 2b) (MyHC-2b) (Myosin heavy chain 4) (Myosin heavy chain, skeletal muscle, fetal)
prot5	P20929	NEBU	Nebulin
prot5	P20929	NEBU	Nebulin

APÊNDICE D. Enriquecimento funcional provindo do programa MetaCore para o fator azul (em inglês).

Enrichment analysis report

Enrichment by Pathway Maps

#	Maps	Total	pValue	Min FDR	BlueEntraramnoBN_genelist p-value	FDR	In Data	Network Objects from Active Da
1	DNA damage_Role of SUMO in p53 regulation	17	4.134E-03	1.532E-02	4.134E-03	1.532E-02	1	RanBP2
2	Transport_RAN regulation pathway	18	4.377E-03	1.532E-02	4.377E-03	1.532E-02	1	RanBP2
3	Proteolysis_Putative SUMO-1 pathway	29	7.046E-03	1.572E-02	7.046E-03	1.572E-02	1	RanBP2
4	Cholesterol and Sphingolipid transport / Transport from Golgi and ER	37	8.983E-03	1.572E-02	8.983E-03	1.572E-02	1	CERT
5	Role of epigenetic alterations in proliferation and differentiation of SCL	72	1.743E-02	2.342E-02	1.743E-02	2.342E-02	1	NFIA
6	Transport_Intracellular cholesterol transport	83	2.008E-02	2.342E-02	2.008E-02	2.342E-02	1	CERT
7	Sphingolipid metabolism	108	2.607E-02	2.607E-02	2.607E-02	2.607E-02	1	CERT