

Marina Rufino Salinas Fortes

Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem

São Paulo

2007

Marina Rufino Salinas Fortes

Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila
Assumpção

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.


BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
19/0/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1864
FMVZ

Fortes, Marina Rufino Salinas

Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem / Marina Rufino Salinas Fortes. – São Paulo : M. R. S. Fortes, 2007.

85 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção.

1. Marcador molecular. 2. *Bos indicus*. 3. Segregação alélica.
4. Maciez da carne. 5. Deposição de gordura. I. Título.

ERRATA

FORTES, M. R. S. Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem. [Polymorphisms of the genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* and *DGAT1* as possible markers for bovine meat quality traits in zebu and crosses slaughtered in young age]. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	85 f.: il.	84 f.: il.
Resumo	1	5	85 f. Dissertação de Mestrado em Ciências -	84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -
Abstract	1	5	85 f. Dissertação de Mestrado em Ciências -	84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem", protocolado sob o nº964/2006, utilizando de 150 a 200 amostras de carcaças de bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Polimorfism of the genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1: possible indicators for bovine quality meet of zebu animals and its crosses", protocol number 964/2006, utilizing from 150 to 200 (carcass of bovines), under the responsibility of Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FORTES, Marina Rufino Salinas

Título: Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao meu amor Laércio Ribeiro Porto Neto pelo carinho e pela inspiração dedico.

AGRADECIMENTOS

Mãe, Maria Alice Sebastiany Rufino e Pai, Marcos Leme Tibiriçá Ramos, muito obrigada pelo apoio e amor incondicionais.

Aos meus irmãos Caetano Rufino Tibiriçá Ramos e André Cerqueira Leite Fortes e aos meus amigos (TODOS) por estarem presentes quando precisei e também por entenderem minha ausência nos momentos solitários de trabalho (laboratório, dissertação...).

Agradeço a minha querida orientadora Professora Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção por toda compreensão quanto às mudanças de planos, pelo apoio e orientação fundamentais ao longo de toda trajetória do mestrado.

Agradeço aos professores Dr. Luis Artur Chardulo, Dr. Henrique Nunes e Dr. Silvera pela oportunidade de participar do projeto.

Agradeço especialmente ao Dr. Rogério Curi por todo ensinamento, pela orientação e pelo companheirismo.

Agradeço imensamente a todos que colaboraram no projeto, sem a ajuda de vocês tudo seria muito mais difícil: Janaína Conte Hadlich, Professor Dr. Mário De Beni Arrigani, Professora Dra. Cyntia Martins Ludovico, Rodrigo Dias Louritano Pacheco e Danilo Domingues Millen.

Agradeço a Central Bela Vista pelo apoio e pela oportunidade de trabalhar e iniciar simultaneamente a pós-graduação.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho está vinculado ao projeto de pós-doutorado, desenvolvido pelo Dr. Rogério A. Curi na Universidade Estadual Paulista (Unesp – Campus Botucatu), que recebe apoio das instituições FAPESP e CNPq. Os professores Dr. Henrique Nunes de Oliveira, Dr. Antônio Carlos Silveira e Dr. Luis Artur Loyola Chardulo são colaboradores do projeto.

A presente dissertação foi dividida em três partes. A introdução e a revisão de literatura contextualizam os estudos atuais sobre genética bovina relacionada à qualidade da carne. O capítulo I se refere aos genes *CAPN1* a *CAST*. O capítulo II relaciona e discute os resultados obtidos para os genes *LEP*, *TG* e *DGTA1*. Os capítulos foram escritos e são apresentados em português, embora respectivas versões em inglês tenham sido submetidas à publicação.

RESUMO

FORTES, M. R. S. **Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem.** [Polymorphisms of the genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* and *DGAT1* as possible markers for bovine meat quality traits in zebu and crosses slaughtered in young age]. 2007. 85 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Mais de 200 milhões de bovinos, em sua maioria animais da raça Nelore ou produtos de cruzamento com Nelore, compõem o rebanho do maior exportador de carne *in natura* do mundo, o Brasil. No entanto, o faturamento por kg de carne exportada poderia ser elevado se a qualidade do produto atendesse a mercados mais exigentes. A maciez da carne, a quantidade de gordura entremeada, a cobertura de gordura da carcaça e área do músculo *Longissimus dorsi* são fatores relevantes na procura por qualidade e padronização. A seleção genética assistida por marcadores moleculares poderá ter impacto positivo no melhoramento animal, principalmente em características de mensuração tardia e difícil para o pecuarista. Polimorfismos dos genes da tiroglobulina (*TG*), μ -calpaína (*CAPN1*) e calpastatina (*CAST*) são hoje marcadores disponíveis comercialmente, implicados na maciez e na marmorização da carne. Os genes do diacilglicerol O-aciltransferase (*DGAT1*) e da leptina (*LEP*) são candidatos pesquisados no desenvolvimento de marcadores relacionados à qualidade da carne. Leptina, tiroglobulina e diacilglicerol O-aciltransferase influenciam no metabolismo energético e na deposição de gordura. A calpastatina inibe a atividade proteolítica de μ -calpaína regulando o processo de amaciamento da carne no *postmortem*. Este trabalho avaliou as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* e relacionando os com qualidade de carne. Os polimorfismos escolhidos foram alterações de ponto (SNP) observadas pelo método da reação da polimerase em cadeia seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP). Entre animais de raça Nelore e Canchim e cruzamentos de Nelore com *Bos taurus* (Rubia Gallega, Brangus, Pardo Suíço) foram genotipados 147 animais. Os mesmos foram abatidos com idade entre 15 e 19 meses, os animais foram avaliados quanto à maciez da carne (Warner-Bratzler Shear Force – SF – e Índice de Fragmentação Miofibrilar – MFI), à deposição de gordura (intramuscular e de cobertura) e à área de olho de lombo (AOL – *Longissimus dorsi*). O estudo de

associação entre genótipos e fenótipos utilizou o procedimento *General Linear Model* do programa SAS e o teste *F*. Com o nível de significância de 5%, as frequências alélicas de *CAPN1/Psyl* foram semelhantes entre os grupos genéticos estudados, mas as frequências dos demais polimorfismos diferiram entre os grupos. Um achado inovador do trabalho foi a presença das duas variantes dos polimorfismos *CAST/Xmnl* e *DGAT1/Cfrl* na raça Nelore. Neste estudo o polimorfismo de *TG/Psul* não foi informativo para raça Nelore, pois todos os animais apresentaram o mesmo genótipo (CC). Os resultados não mostraram associações significativas entre os polimorfismos e as análises da carne, exceto pelo efeito de *CAST/Xmnl* cujo genótipo AA foi superior ao AB com relação ao MFI. Mais estudos semelhantes se fazem necessários para desenvolver marcadores adicionais e descartar os não informativos, adequando as novas ferramentas de seleção ao gado zebuino brasileiro e respectivos cruzamentos. Os cinco genes estudados continuam como candidatos, apresentando diversos polimorfismos para serem pesquisados. No futuro, estudos com maior número de bovinos poderão validar o polimorfismo *CAST/Xmnl* como indicador da maciez da carne.

Palavras-chave: Marcador molecular. *Bos indicus*. Segregação alélica. Maciez da carne. Deposição de gordura.

ABSTRACT

FORTES, M. R. S. **Polymorphisms of the genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* and *DGAT1* as possible markers for bovine meat quality traits in zebu and crosses slaughtered at young age.** [Polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem]. 2007. 85 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Over 200 million bovines, mostly Nellore breed and its crosses, form the herd of the world biggest meat *in natura* exporter, Brazil. Even so, profit per kg of traded meat would improve if the product's quality achieved selective markets. Tenderness, marbling, backfat thickness and *Longissimus dorsi* área are traits to consider when pursuing meat quality and standardization. Marker assisted selection (MAS) can have positive impact over genetic improvement in livestock, mainly over traits such as the above mentioned, which are measured late in the production system and are hard to measure at the farm. Polymorphisms of thyroglobulin (*TG*), μ -calpain (*CAPN1*) and calpastatin (*CAST*) genes are commercially available markers assumed to predict meat tenderness and marbling. The genes encoding diacylglycerol O-acyltransferase (*DGAT1*) and leptin (*LEP*) are candidates researched to develop new markers related to meat quality. Thyroglobulin, Diacylglycerol O-acyltransferase and leptin influence energy metabolism and fat deposition. Calpastatin inhibits μ -calpain proteolysis regulating *postmortem* meat tenderization. This study evaluated allelic and genotype frequencies of polymorphisms located at *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* and *DGAT1* and tried to correlate the polymorphisms with meat quality. In each gene a single nucleotide polymorphism (SNP) was assessed by polymerize chain reaction followed by restriction enzyme digestion (PCR-RFLP). Including Nellore, Canchim and crosses of Nellore with *Bos taurus* breeds (Rubia Gallega, Brangus and Brown Swiss) a total of 147 animals were genotyped. Slaughterd aging 15 to 19 month, the animals were evaluated for meat tenderness (Warner-Bratzler Shear Force – SF – Myofibrillar fragmentation index – MFI), fat deposition (intramuscular and backfat) and rib eye area (REA – *Longissimus dorsi*). The association study between genotypes and phenotypic traits used the linear regression model of SAS and the least square means were compared by the *F test*. Allelic frequencies of *CAPN1/PSyI* were similar in every genetic group of the study, but other polymorphisms allele

frequencies differed between groups. A novel finding was the occurrence of both variants of *CAST/Xmnl* and *DGAT1/Cfrl* in the Nellore breed. In this study, the *TG/Psul* polymorphism was uninformative for Nellore animals since only CC genotype was found. The results showed no significant association between polymorphisms and the meat characteristics, except for the effect of *CAST/Xmnl* over MFI, the AA genotype was superior to AB, predicting AA animals to have more tender meat. Further research is required to develop additional markers, disposal uninformative ones and to adequate molecular selecting tools to Brazilian zebu cattle and its crosses. The five genes here presented remain as candidates, in attendance to several polymorphisms yet to be carefully evaluated. Future studies, with bigger animal numbers, may validate *CAST/Xmnl* as a meat tenderness indicator.

Key words: Molecular marker. *Bos indicus*. Allele segregation. Meat tenderness. Fat deposition.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	QUALIDADE DA CARNE: ANÁLISES E CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS	16
2.2	A INFLUÊNCIA GENÉTICA SOBRE A CARNE BOVINA.....	20
2.3	MELHORAMENTO ANIMAL E MARCADORES MOLECULARES.....	21
2.4	GENES RELACIONADOS À QUALIDADE DA CARNE	29
2.4.1	Sistema proteolítico: Calpaína e Calpastatina	29
2.4.2	Deposição de gordura: Leptina, Tiroglobulina e Diacilglicerol O-aciltransferase	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	HIPÓTESES	38
5	CAPÍTULO 1 – CAPN1 e CAST	39
5.1	RESUMO.....	39
5.2	INTRODUÇÃO	40
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.3.1	Animais	42
5.3.2	Qualidade da carne	42
5.3.3	Extração de DNA e genotipagem	44
5.3.4	Análise estatística	45
5.4	RESULTADOS	46
5.5	DISCUSSÃO	49
5.6	AGRADECIMENTOS.....	53
6	CAPÍTULO 2 – DGAT1, TG e LEP	54

6.1	RESUMO.....	54
6.2	INTRODUÇÃO	55
6.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
6.3.1	Animais.....	57
6.3.2	Características fenotípicas	58
6.3.3	Extração de DNA e genotipagem	59
6.3.4	Análise estatística	60
6.4	RESULTADOS	61
6.5	DISCUSSÃO	65
6.6	AGRADECIMENTOS.....	69
7	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Pertencentes ao Gênero *Bos*, Família *Bovidae* e Ordem *Artiodactyla*, os bovinos são encontrados em quase todos os países do mundo, sendo a população estimada em 1,2 bilhões de animais e mais de 780 raças. O desenvolvimento humano tem sido influenciado pelos bovinos, importante fonte de alimento (LOFTUS et al., 1994).

A nomenclatura, mais comum, estabelece as espécies *Bos indicus* e *Bos taurus* como pertencentes ao Gênero *Bos*. *Bos taurus* são animais europeus, sem cupim, e *Bos indicus* são animais indianos e africanos, com cupim, (DEL LAMA, 1991). A presente dissertação utiliza o termo zootécnico “zebuíno” para designar bovinos reconhecidos como *Bos indicus*.

Uma justificativa para estudar da genética *Bos indicus* consta na revisão de Bruford et al. (2003) que argumenta a favor de priorizar o estudo e a conservação de populações geneticamente distantes da espécie como um todo a fim de preservar a diversidade. A distância entre *Bos indicus* e *Bos primigenius* (antecessor) é maior do que deste para *Bos taurus*, fato visível no dendograma da supracitada revisão.

Na composição do rebanho brasileiro, o Nelore e seus cruzamentos têm destaque. O Nelore (*Bos indicus*) foi utilizado na formação de raças adaptadas como Canchim (cinco oitavos taurino e três oitavos zebuíno), além de ser a base dos sistemas de cruzamento mais comuns da atualidade. O termo cruzamento industrial normalmente se refere ao acasalamento de matrizes Nelore com touros de raças européias, Angus, Simental, Rubia Gallega, originando a F1 meio sangue *Bos taurus* meio sangue *Bos indicus*. Alguns rebanhos aproveitam a fertilidade das fêmeas F1 acasalando estas com outra raça *Bos taurus*. Neste manejo denominado “Tricross” podem ser usados touros Brangus (cinco oitavos taurino e três oitavos zebuíno) ou touros Pardo Suíço (*Bos taurus*), por exemplo (EMBRAPA, 2007).

A pecuária nacional se baseia fundamentalmente na raça Nelore (80%) e utiliza seus cruzamentos com animais europeus, buscando o melhor de cada raça para alcançar maior eficiência produtiva. Segundo estimativas feitas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a pecuária brasileira produziu 9,9 milhões de toneladas de carne em 2006 e produzirá 13,2 milhões de toneladas em 2017. Este aumento na produção seria equivalente ao crescimento de 2,5% ao ano e 2,9%

de aumento anual das exportações de carne (MAPA, 2007). Expressivos, esses números refletem a importância da pecuária nacional e justificam a pesquisa voltada à produtividade do setor.

Dentro da bovinocultura nacional, destaca-se a atividade de corte que resulta na produção anual de 7,4 milhões de toneladas de equivalente carcaça e exportação de, aproximadamente, 1,3 milhão de toneladas de carne, correspondendo a mais de um bilhão de dólares (CNA, 2007). Esta situação fez do Brasil, em 2003, o maior exportador mundial de carne bovina *in natura*. Até 2017, o Brasil deve se manter líder na exportação de carne seguido pela Austrália, Argentina e Nova Zelândia (MAPA, 2007).

Apesar da posição de destaque no cenário econômico, a pecuária de corte nacional se caracteriza pela baixa produtividade e grande variação na qualidade da carne produzida, fatos comprometedores para a competitividade do setor no mercado globalizado (Informação verbal)¹. A maciez e a marmorização são duas características relevantes no tocante à qualidade variável da carne (KILLINGER et al., 2004; KOOHMARAIE et al., 2002).

Dentre os fatores que explicam a falta de padronização da carne brasileira, destacam-se a grande diferença entre sistemas de produção adotados e a variabilidade genética das raças bovinas utilizadas na produção de carne.

As raças, agrupadas na dicotomia *Bos indicus* *Bos taurus*, apresentam características fenotípicas bastante distintas com reflexos marcantes na eficiência produtiva, reprodutiva e na qualidade da carne produzida. De maneira geral, os zebuínos apresentam grande rusticidade, caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como a algumas doenças infecto-contagiosas (TURNER, 1980). Os taurinos, por sua vez, são menos adaptados ao clima tropical e apresentam maior suscetibilidade às doenças e infestações parasitárias, porém, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos. Por exemplo, animais *Bos taurus* iniciam a vida reprodutiva antes dos *Bos indicus* (SENGUER, 1999) e apresentam carne mais macia e com maior marmorização (WHEELER et al., 1996).

¹ Informação fornecida por Richard Brown, Congresso Internacional da Carne, São Paulo, 2007.

O'Connors et al. (1997) compararam animais taurinos com zebuínos compostos (Braford, Brangus e Simbra) quanto à maciez da carne no *postmortem* e concluíram que taurinos apresentavam maior maciez. A sugestão destes autores para minimizar problemas com maciez da carne seria a introdução de raças taurinas adaptadas aos trópicos como a Senepol, por exemplo. Entretanto, selecionar entre os próprios zebuínos pode ser mais interessante para o Brasil onde se tem um enorme rebanho base que apresenta grande diversidade fenotípica. Assim, conhecer as bases genotípicas para a variação do fenótipo poderá contribuir para a seleção animal (ANDERSSON, 2001).

Davis e DeNise (1998) revisaram várias aplicações dos polimorfismos genômicos e concluíram que a seleção genética assistida por marcadores (MAS) será a aplicabilidade de maior impacto dessa tecnologia, com maior potencial para colaborar com a produção animal. Mais recentemente, Dekkers (2004) alertou que o otimismo com relação a MAS deveria ser menor, em outras palavras, seria necessário validar os resultados nas populações alvo para poder utilizar marcadores genéticos com confiabilidade.

No futuro, uma vez conhecidos os marcadores moleculares mais relevantes para seleção de características economicamente importantes, a pecuária brasileira poderá de beneficiar da MAS talvez mais do que em qualquer outro país. Há possibilidade da MAS vir a ser integrada às demais biotecnologias disponíveis no Brasil, como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a produção *in vitro* de embriões e a sexagem de espermatozoides, para citar as principais. Identificar e multiplicar os melhores animais poderá aperfeiçoar significativamente o ganho genético a cada geração, impulsionando a produtividade da pecuária (FRANCO, 2006).

Hoje, empresas como Genetic Solutions/Bovigen, Frontier Beef Systems/GeneSeek, Merial/Quantum Genetics e Metamorphix Inc. Genomics movimentam milhões de dólares/ano ao comercializar testes genéticos de marcadores desenvolvidos em pesquisa própria ou ao pagar licenciamento ou *royaltys* aos institutos de pesquisa detentores das patentes.

O mercado de marcadores moleculares associados às características de interesse zootécnico se apresenta em franca expansão no mundo e também no Brasil, o que atraiu empresas gigantes como a multinacional Merial, líder mundial no segmento de Produtos Veterinários, entre outras.

Comercializado pela Genetic Solutions (Austrália) e pela Bovigen Solutions (Estados Unidos), o GeneSTAR chegou ao Brasil como o painel pioneiro de marcadores com o objetivo de identificar animais com melhores propensões de apresentar maior marmorização e maciez de carne. O painel se baseia em polimorfismos dos genes codificadores da calpaína, da calpastatina e da tiroglobulina (Genetic Solutions Inc.).

Experimentos independentes como o de Casas et al. (2005,2006), Rincker et al. (2006) e de Van Eenennaam et al. (2007) procuraram validar os marcadores GeneSTAR entre outros, em diferentes populações bovinas, mas resultados contraditórios ou pouco conclusivos vem sendo obtidos.

As contradições são explicadas por não haver uma relação direta entre marcadores moleculares e características quantitativas nas diferentes populações e raças, já que muitas vezes os polimorfismos estudados não são os responsáveis diretos por alterações fenotípicas (DEKKERS, 2004). Outra explicação está nas interações epistáticas diferentes entre as bases genéticas das populações e as características de interesse (CURI et al., 2006).

Casas et al. (2005; 2006) concluíram que os resultados de associação entre marcadores moleculares e características fenotípicas para populações de animais *Bos taurus* não são imediatamente aplicáveis em populações de animais *Bos indicus*.

Neste sentido, os testes de genotipagem para os genes da tiroglobulina, calpaína, calpastatina e leptina, utilizados para a identificação de animais superiores para qualidade de carne e comercializados no exterior por grandes empresas, deveriam passar por um processo de validação antes de serem amplamente usados no melhoramento de animais *Bos indicus* e seus cruzamentos.

Assim, o intuito do presente trabalho é estudar cinco genes candidatos (calpaína, calpastatina, diacilglicerol-Oaciltransferase, tiroglobulina e leptina) e estimar seus efeitos em características fenotípicas relacionadas à qualidade da carne, em animais zebuínos e cruzados (*Bos taurus* X *Bos indicus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A seguinte revisão de literatura se estrutura de forma a apresentar e contextualizar primeiro a problemática escolhida como tema a qualidade variável da carne brasileira produzida com base na genética zebuína e segundo uma provável solução para a questão, ou seja, o uso de marcadores moleculares para selecionar animais produtores de carne com mais qualidade. Por último, a revisão procura justificar a escolha de cinco genes como possíveis indicadores da qualidade da carne bovina.

2.1 QUALIDADE DA CARNE: ANÁLISES E CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS

O desenvolvimento ponderal, a conversão alimentar, a gordura subcutânea, gordura intramuscular (marmorização) e a maciez da carne são características determinantes da eficiência econômica da pecuária de corte uma vez que estão diretamente relacionadas à produtividade, à qualidade e ao preço do produto final. A deposição de gordura se correlaciona com o balanço energético. A relação entre deposição de carne e de gordura tem relevância para eficiência da conversão alimentar. Melhor conversão alimentar significa redução de custo com alimentação animal, o que pode ser traduzido em aumento de lucro à pecuária (SILLENCE, 2004).

Atualmente, uma das formas mais usadas para estimar a deposição de carne consiste em mensurar *in vivo* (ultra-sonografia) ou no abate a área do músculo *Longissimus dorsi*. A área do *Longissimus dorsi* na região da 12^a a 13^a costelas, também conhecida como área de olho de lombo (AOL), se correlaciona com o peso dos cortes de carne obtidos na carcaça e com a variação em rendimento de carcaça, tendo impacto econômico na bovinocultura de corte (GREINER et al., 2003; TAIT et al., 2005; WHEELER et al., 1996).

Dentre as características ligadas à qualidade da carne bovina *in natura*, a maciez destaca-se como o principal atributo desejado pelo consumidor final. Este fato se comprova em função da relação entre o preço do corte e a maciez que o

mesmo apresenta (KOOHMARAIE et al., 2002). Segundo Hadlich (2004a) os fatores que controlam a maciez da carne bovina são: genética do animal, processamento da carne no *postmortem* e idade ao abate.

O processamento *postmortem* utiliza estratégias como a maturação e a estimulação elétrica entre outros avanços tecnológicos para auxiliar o processo natural de amaciamento da carne (PARDI; SANTOS, 1995). A maturação consiste no processo comum de armazenar carne a vácuo sob refrigeração (1°C) durante dias antes do congelamento. A maturação prolongada (21 dias) foi recomendada como solução no tratamento de carne originária de *Bos indicus* (O'Connors et al., 1997). Todavia, carne de animais Nelore (*Bos indicus*) com maciez desejável também foi obtida com apenas sete dias de maturação, com o abate de animais jovens (HADLICH et al., 2006).

A idade de abate influencia de várias formas na qualidade da carne. A obtenção de animais jovens com adequada cobertura de gordura é um dos fatores fundamentais para a determinação da qualidade final do produto, mais precisamente a maciez (SILVEIRA et al., 2000). Segundo Dransfield (1994), animais jovens com terminação de carcaça adequada sofrerem menor impacto em função de resfriamento rápido, evitando o encurtamento das fibras e a diminuição da maciez. A maior temperatura interna da carcaça jovem contribui para a maior ação glicolítica muscular, maior acidificação do meio intracelular e conseqüente inibição da enzima calpastatina, o que possibilita maior ação das calpaínas, e assim conferindo mais maciez à carne. Calpaína e calpastatina integram o sistema proteolítico responsável pela quebra das miofibrilas no *postmortem*, processo através do qual a carne se torna macia (BELEW, 2002; DELGADO et al., 2001; DRANSFIELD, 1994; KOOHMARAIE, 1992).

Para Belew (2002), os principais fatores envolvidos na qualidade da carne são a proteólise *postmortem* e a presença de gordura intramuscular, o tecido conjuntivo e o estado de contração muscular. O tecido conjuntivo interfere na maciez devido a alterações na estrutura do colágeno. A natureza e a extensão das ligações entre as moléculas de colágeno aumentam com a idade prejudicando a maciez da carne (BAILEY, 1985). Recente estudo avaliou animais de diferentes grupos genéticos, abatidos entre 12 a 15 meses, mostrando haver ausência de relação entre quantidade e solubilidade de colágeno e força de cisalhamento, sugerindo que a

perda de maciez por efeito do colágeno seja perceptível apenas quando há maior diferença de idade entre os animais comparados (HADLICH et al., 2006).

A maciez da carne pode ser avaliada de forma sensorial pela degustação realizada por um grupo de pessoas treinadas que sugerem notas de um (1), extremamente dura, até oito (8), extremamente macia (CROSS et al., 1978). A avaliação sensorial é altamente correlacionada com o teste mecânico descrito por Wheeler et al. (1995) que informa a maciez de maneira objetiva, mensurando a força (kg) de cisalhamento exercida pelo equipamento Warner-Bratzler para cortar amostras de carne.

Outra forma de mensurar a maciez é pelo Índice de Fragmentação Miofibrilar (sigla derivada do termo em inglês: MFI) descrito por Culler et al. (1978). Maiores valores de MFI indicam maior fragmentação miofibrilar. O aumento da fragmentação miofibrilar foi correlacionado com menor força de cisalhamento e melhores notas na escala sensorial (OLSON et al., 1976). Atualmente, o MFI se destaca entre as medidas de degradação protéica muscular, no *postmortem*, predizendo mais de 50% da variação da maciez da carne (HOPKINS et al., 2000). Além disso, o Índice de Fragmentação Miofibrilar é uma medida mais precisa, sensível e barata (HADLICH, 2004b).

A quantidade de gordura entremeada na carne pode ser avaliada visualmente pelo escore de marmorização definido pelo sistema de avaliação da qualidade do USDA (USDA, 1997). A preferência dos consumidores por carne com maior ou menor marmorização diferiu nas últimas décadas. Dunsing (1959) relatou a preferência por bifes com maior marmorização, contudo passados 20 anos Forbes et al. (1974) constatou que a gordura entremeada ainda era um critério utilizado pelos consumidores, mas a preferência era por carnes consideradas mais magras.

Obviamente a preferência dos consumidores tem reflexos econômicos. Por exemplo, estima-se que cerca de 45 a 50% dos bovinos, criados na Austrália, especialmente para o mercado Japonês são desviados deste mercado “*premium*” porque não atingem a marmorização adequado (BINDON et al., 1995).

Mais recentemente, estudos nos Estados Unidos mostraram que a maioria dos consumidores, especialmente mulheres, desejam comprar carnes com menor teor de gordura e por isso escolhem bifes com menor marmorização (KILLINGER et al., 2004). Entretanto, esse mesmo estudo observou que os consumidores que ainda preferem maior teor de gordura entremeada associam o escore de marmorização

com maior sabor e menor necessidade de utilização de temperos. Os consumidores do primeiro perfil (marmorização reduzida) estão dispostos a pagar mais pelo produto com menor teor de gordura, enquanto que os consumidores de carnes com maior escore de marmorização compram carne com mais frequência (KILLINGER et al., 2004). Nos dois casos a presença ou ausência de gordura entremeada está entre os três primeiros critérios de seleção da carne citados pelos consumidores. Assim, seja qual for a preferência do mercado a ser atingido, conhecer os fatores que estabelecem a marmorização é vital para direcionar a produção e agradar os consumidores.

Na literatura especializada, a relação entre presença de gordura intramuscular (marmorização) e maciez da carne é muito discutida. Alguns autores afirmam que a marmorização contribui para variação da maciez (BELEW et al., 2003; SEIDEMAN; KOOHMARAIE; CROUSE, 1987) enquanto outros não encontram associação entre o escore de marmorização e a força de cisalhamento (WHEELER et al., 1996).

Os resultados contraditórios podem, em parte, ser explicados por certa confusão entre maciez e suculência quando a carne é avaliada em testes sensoriais, sendo que a suculência e a intensidade do sabor estariam correlacionadas com marmorização segundo Chardulo (informação verbal²). De fato, embora a natureza exata da relação entre gordura entremeada e maciez esteja pouco clara, foi relatado que valores superiores a 5% de lipídio intramuscular estão relacionados com aumento da maciez em testes sensoriais (CROUSE et al., 1989).

Mensurar os lipídios totais consiste numa forma objetiva de avaliar o teor de gordura intramuscular. O montante de lipídios extraído de amostras de *Longissimus dorsi* explica consideravelmente a variação genética da marmorização (BLIGH; DYER, 1959; WHEELER et al., 1996).

Cobertura de gordura tem sido associada com rendimento da carcaça e com intensidade do sabor da carne, mas não com marmorização intramuscular. Para um mesmo escore de marmorização, animais da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentaram maior espessura de gordura subcutânea do que animais *Bos taurus* (WHEELER et al., 1996). Além disso, a espessura da gordura subcutânea e a marmorização, estimados na ultra-sonografia ou mensurados no momento do abate,

² Informação fornecida por Chardulo em Botucatu, 2007.

têm alta correlação com a porcentagem de carne (cortes direcionados ao consumo) na carcaça (GREINER et al., 2003; TAIT et al., 2005).

2.2 A INFLUÊNCIA GENÉTICA SOBRE A CARNE BOVINA

Aproximadamente, 46% das variações na maciez da carne bovina se devem à genética do animal e 54% das variações se explicam pela influência ambiental quando são comparadas raças diferentes. Dentro de uma mesma raça a genética explicaria cerca de 30% da variabilidade da maciez da carne (KOOHMARAIE, 2003). As diversas raças podem ser classificadas em dois subgrupos genéticos: *Bos indicus* e *Bos Taurus*. Polimorfismos protéicos (MANWELL; BAKER, 1980), polimorfismo morfológico do cromossomo Y (KEIFFER; CARTWRIGTH, 1968) e polimorfismos do DNA mitocondrial (PEGORARO et al., 1996) sustentam a dicotomia de espécies. Entretanto, a total interfertilidade e a ausência de isolamento geográfico são elementos fortes para proposição de outra classificação. Alguns autores adotam o critério de subespécies para marcar a diferença genética entre os grupos e simultaneamente reconhecer que todas as raças são da mesma espécie: *Bos primigenius*. Assim, os bovinos podem ser classificados como *Bos primigenius indicus* e *Bos primigenius taurus* (EPSTEIN; MASON, 1984).

Independentemente da taxonomia, a distinção entre zebuínos e taurinos tem grande relevância para a produtividade da pecuária, enquanto estes são precoces quanto ao início da atividade reprodutiva (SENGER, 1999) e quanto ao acabamento da carcaça (deposição de gordura) aqueles são resistentes ao ambiente, parasitas e doenças tropicais (TURNER, 1980; NOGUEIRA, 2004).

A diferença entre a qualidade da carne produzida por zebuínos e taurinos tem sido bastante documentada (CARPENTER et al., 1961; CROUSE et al., 1987; DAMON et al., 1960; LUCKETT et al., 1975; RAMSEY et al., 1963). Animais *Bos indicus* apresentam carne menos macia e com menor marmorização (WHEELER et al., 1996). Uma explicação para esta menor maciez é que animais zebuínos apresentam níveis mais baixos de μ -calpaína e níveis mais elevados de calpastatina. Níveis mais elevados do inibidor, possivelmente, resultam no decréscimo da maciez da carne (WHIPPLE et al., 1990).

Foi descrita a existência de uma relação positiva entre a maior porcentagem de genes zebuínos no animal e a menor maciez da carne maturada (CUNDIFF et al., 1993, WHEELER et al., 1994). Sugeriu-se não utilizar animais com mais de 25% de genética *Bos indicus* (O'CONNERS et al., 1997), afinal, carnes com maior influência zebuína apresentam valores mais altos de força de cisalhamento e maior variação nestes valores (MILLER, 2001).

Contrariando os trabalhos revisados, alguns experimentos com animais superprecoces – abatidos entre 12 e 15 meses – e animais abatidos com 24 meses mostram grupos da raça nelore com valores adequados quanto ao Índice de Fragmentação Miofibrilar e à Força de Cisalhamento, ou seja, maciez em nível desejável (MORALES et al., 2003; HADLICH, 2004a). Tais trabalhos confirmam a existência de variabilidade genética dentro da raça, o que possibilita a seleção e o melhoramento animal. A seleção poderá ser facilitada pela identificação de genes ligados às características da carne e de genótipos favoráveis.

2.3 MELHORAMENTO ANIMAL E MARCADORES MOLECULARES

O melhoramento das características fenotípicas de interesse produtivo em bovinos vem sendo alvo de grandes esforços da humanidade e, mesmo que praticada empiricamente antes do século passado, vem ocorrendo há cerca de 10.000 anos, desde a domesticação (BRUFORD; BRADLEY; LUIKART, 2003).

A domesticação dos animais permitiu ao ser humano exercer a seleção artificial para características desejáveis e alterar, mesmo que inconscientemente, a constituição genotípica das populações (SANTOS, 1995). O conhecimento de que as características fenotípicas são herdáveis, levou o homem a controlar os acasalamentos nas espécies em domesticação, selecionando os melhores reprodutores para determinadas características (REED, 1984).

Entretanto, o sucesso da seleção depende do valor da herdabilidade do caráter, sendo que heranças poligênicas, dominâncias parciais ou completas, influência do ambiente e tempo necessário para a avaliação fenotípica freqüentemente são fatores limitantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem duas formas de se utilizar o melhoramento animal: a seleção clássica e a moderna. A seleção clássica se baseia na observação do fenótipo, anotação das características produtivas e descarte dos animais indesejados. A seleção moderna pode contar com o apoio da biologia molecular para observar o genótipo dos animais.

Através da seleção clássica, nas últimas décadas, os produtores brasileiros de gado de corte vêm obtendo resultados notáveis no melhoramento genético de diversas características produtivas. A seleção na bovinocultura brasileira tem como marco inicial a instalação de postos pecuários experimentais (como, por exemplo, o de Nova Odessa, fundado em 1900), o concurso do boi gordo iniciado em 1949 e, nessa mesma década, os testes de progênie de touros zebuínos começaram. A década de 70 foi marcada por estudos que buscavam a determinação de parâmetros genéticos, ou seja, critérios a serem usados nos programas de melhoramento da bovinocultura de corte, que se tornaram mais abrangentes a partir da década de 80 (EMBRAPA, 2007).

Nesse contexto, o ganho de peso individual anotado pelos pecuaristas é um dado fenotípico importante para o cálculo das Diferenças Esperadas de Progênie (DEP) que norteiam a seleção animal ainda hoje (GARNERO et al., 2001; HENDERSON, 1988; QUASS; POLLAK, 1980). Por exemplo, pesos padronizados aos 120, 240 e 550 dias de idade (P120, P240 e P550) e perímetro escrotal aos 550 dias idade (PE550) são critérios de seleção utilizadas no programa de melhoramento genético da raça Nelore (LÔBO et al., 1998).

Garnero et al. (2001) avaliaram a herdabilidade destas características usadas em programas de seleção do Nelore e compararam com novos critérios de seleção (perímetro escrotal aos 550 dias, número de dias para ganhar 160Kg e para ganhar mais 240Kg). Neste trabalho, os autores utilizaram mais de 50 mil observações, conseguidas com intensa anotação de dados e pesagem sistemática dos animais nas fazendas. Foram anos de observação (de 1982 a 1998), para avaliar a herdabilidade e poder escolher as ferramentas de seleção clássica.

Crescimento populacional e concorrência, entre outras pressões do mundo globalizado, impõem a necessidade de se produzir carne bovina com cada vez mais eficiência e qualidade, estimulando pecuaristas e pesquisadores a buscarem alternativas de manejo e critérios de seleção para obter carne com maciez, marmorização, porcentagem de gordura presente adequada e outras características

vantajosas para conquista de consumidores mais exigentes e novos mercados (BINDON, 1995; SILLENCE, 2003).

A eficiência das técnicas clássicas de seleção é bastante limitada em relação às características de difícil mensuração ou que não podem ser diretamente mensuradas (resistência às doenças e características de carcaça), de baixa herdabilidade (fertilidade), ou que apresentam correlações genéticas negativas (produção de leite e concentração de gordura no leite) (SCHWERIN et al., 1995).

No melhoramento genético clássico, o progresso de características ligadas à qualidade de carne (marmorização e maciez) em bovinos é dificultado pela falta de clareza dos objetivos e pelas dificuldades de se mensurar estas características no animal vivo. Os dados em sua maioria são obtidos de animais descartados (abatidos) em detrimento dos selecionados, dificultando o melhoramento genético apesar da grande maioria dessas características possuírem valores de herdabilidade de moderado a alto (CREWS; KEMP, 2001; DA SILVA et al., 2003). As herdabilidades estimadas para rendimento de carcaça ($h^2=76$) e para escore de marmorização ($h^2=73$) foram consideradas muito altas, enquanto a herdabilidade estimada para maciez (força de cisalhamento e sensorial) foi moderada (WHEELER et al., 1996).

A análise molecular do genoma dos animais domésticos começa a contribuir para solucionar algumas das limitações do melhoramento genético clássico. A acurácia das predições e a intensidade de seleção aplicada ao rebanho podem ser incrementadas, diminuindo o intervalo entre gerações e economizando esforços em testes de progênie de touros. Nos anos noventa, autores como Beever et al. (1990); Bink e Arendonk (1994) vislumbraram perspectivas para seleção concomitante de características correlacionadas, retenção de heterose, implementação de sistemas de acasalamento para otimizar componentes genotípicos de dominância e epistasia e introgressão de genes desejáveis a partir de bancos de germoplasma. Em outras palavras, estes autores previam que as inovações da biologia molecular abririam portas para a seleção de animais através da observação de diferenças nos seus genótipos.

Marcadores moleculares equivalem a pontos de referência na observação do genótipo. Assim um marcador molecular corresponde a toda e qualquer variação oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar que esses

marcadores segregam-se de acordo com as leis mendelianas para características monogênicas, ou apresentam distribuições compatíveis com as esperadas para características poligênicas, o marcador molecular passa a ser também definido como marcador genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Do ponto de vista molecular, ocorrem três tipos principais de variações na forma, ou seja, polimorfismos na molécula de DNA: as regiões repetitivas, as inserções e deleções (Indels) e as alterações de uma única base (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os polimorfismos ocorrem tanto em regiões codificadoras (éxons) como em regiões não codificadoras (íntrons) dos genomas. Em regiões codificadoras, quando resultam na substituição de aminoácido na seqüência protéica, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nestes casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora polimorfismos sinonímicos não alterem a seqüência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente afetar a quantidade de proteína produzida. A quantidade de proteína produzida também pode ser afetada quando ocorrem alterações nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro (5' UTR e 3' UTR). Os polimorfismos gênicos podem também promover processamentos alternativos, geração ou supressão de códons de terminação, alteração nos códons de iniciação da tradução e alterações no padrão de expressão de genes quando a troca de bases ocorre em seqüências promotoras (GUIMARÃES; COSTA, 2002). Em regiões não codificadoras do genoma, os polimorfismos também podem ocasionar mudanças fenotípicas. Recentemente, foi descoberto que muitos íntrons originam RNAs intrônicos, cuja função mais provável é regular a expressão de proteínas reguladoras da transcrição genômica (NAKAYA et al., 2007).

Entre as vantagens atribuídas aos marcadores moleculares, destaca-se o alto polimorfismo, o fato de não sofrerem influência do meio ambiente, de serem em geral codominantes, de poderem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento do indivíduo, e de poderem caracterizar um indivíduo a partir de células ou tecidos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Nos estudos de taxonomia, além de variáveis, os marcadores devem ser suficientemente conservados na evolução para permitir a identificação da espécie e devem evoluir de maneira rápida e constante (para ser possível datar o surgimento

do polimorfismo). Através destes estudos, a informação genética atribuída aos marcadores pode colaborar com a preservação da diversidade animal. Mais ainda, populações ancestrais e espécies próximas podem ser fonte de alelos com valor econômico perdidos durante a domesticação (BRUFORD; BRADLEY; LUIKART, 2003).

Do ponto de vista prático, os marcadores genéticos podem ser distintos em três tipos, dependendo de sua relação com o loco responsável pela variação do fenótipo. O marcador pode ser funcional, primeiro tipo, sendo responsável direto pela alteração fenotípica de forma total (característica monogênica) ou de forma parcial (característica poligênica, herança quantitativa). O segundo tipo se caracteriza por estar em desequilíbrio de ligação com o primeiro (*Linkage Disequilibrium* – LD) e o terceiro tipo se caracteriza por estar em equilíbrio de ligação com o primeiro (*Linkage Equilibrium* – LE). Os marcadores funcionais e, com menos ênfase, os marcadores LD apresentam forte associação entre genótipo e fenótipo na população como um todo. Já os marcadores LE estão mais sujeitos à recombinação homóloga. Devido a isto, a ligação entre LE e o loco funcional e, por consequência a associação de LE com o fenótipo, varia de família para família (DEKKERS, 2004).

Em boa medida, a expansão dos estudos moleculares que permitiu a definição dos conceitos relacionados até aqui dependeu de viabilidade técnica. Uma das mais significativas contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Essa técnica foi desenvolvida por Mullis em meados da década de oitenta (MULLIS; FALOONA, 1987), mas sua importância só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação da PCR em diagnósticos de doenças (SAIKI et al., 1985). A técnica consiste na multiplicação de fragmentos de DNA de interesse *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase termoestável, a fim de que se tenha material genético suficiente para se proceder determinadas análises. A quantidade de DNA molde necessária para a detecção do produto de amplificação pela técnica de PCR é mínima, tornando possível a análise do DNA obtido de uma única célula.

Do ponto de vista metodológico, existem várias classes de marcadores moleculares. Entre as classes estão os SSRs (*Single Sequences Repeats*) ou microssatélites e os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Marcadores microssatélites são pequenas seqüências, geralmente não

codificadoras, de 1 a 6 pares de bases, repetidas em *tandem* (em seqüência) e, normalmente em número menor do que 100 repetições. O polimorfismo de microsatélites é resultado da amplificação por PCR de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos em função do número variável de elementos repetitivos. Esses marcadores apresentam alto polimorfismo, codominância, facilidade de detecção por PCR, facilidade de determinação dos alelos e genótipos, ocorrendo com grande freqüência e ampla distribuição ao longo de todo o genoma da maioria dos organismos eucariotos (FERREIRA;GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores de DNA conhecidos por RFLPs foram inicialmente aplicados na detecção de mutações do material genético de vírus e, posteriormente, em outros organismos (BOTSTEIN et al., 1980). O termo RFLP pode ser traduzido como polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por restrição da fita de DNA. Esta fragmentação ou corte é obtida por meio do uso de enzimas de restrição (KELLY; SMITH, 1970). As enzimas de restrição possuem sítios específicos de clivagem, de modo que um rearranjo da fita de DNA, por inserção, deleção ou mutações pontuais pode eliminar ou criar um novo sítio de restrição, modificando o tamanho dos fragmentos obtidos pela clivagem do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A detecção dos fragmentos resultantes da digestão do DNA pode ser visualizada, após a separação por eletroforese, por meio da sua transferência e imobilização em uma membrana de nylon, técnica conhecida por *Southern Blot*, e hibridização com sondas de DNA homólogas ao DNA imobilizado. Uma vez que os RFLPs possuem ampla distribuição no genoma e codominância, esta categoria de marcadores genéticos abriu perspectiva relevante no estudo do genoma, contribuindo imensamente para o desenvolvimento dos mapas genômicos (BOTSTEIN et al., 1980), renovando o interesse no uso de marcadores genéticos em estudos de localização de locos responsáveis por características de herança quantitativa (*Quantitative Trait Loci* – QTLs) e, conseqüentemente, na Seleção Assistida por Marcadores – MAS (ROCHA et al., 1992; WELLER et al., 1990).

Muitos dos polimorfismos descritos pelo método de *Southern Blot* têm sido transformados em marcadores baseados na PCR. Para a análise de RFLP por meio de PCR, as extremidades da sonda que revelou o polimorfismo são seqüenciadas e essas seqüências são utilizadas para a síntese de *primers* complementares. Com o crescente desenvolvimento dos projetos de sequenciamento do genoma das

principais espécies animais e vegetais, os *primers* podem também ser desenvolvidos a partir de seqüências publicadas, selecionando-se aquelas que delimitam polimorfismos descritos (REGITANO, 1996). Esses *primers* são utilizados para amplificar a região que contém os sítios polimórficos de restrição. Os fragmentos produzidos pela digestão dos produtos de amplificação podem ser então analisados em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida (FERREIRA;GRATTAPAGLIA, 1998).

A PCR-RFLP tem sido aplicada no diagnóstico de doenças hereditárias em humanos (SAIKI et al., 1985) e em animais, bem como na verificação de polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de características de interesse econômico (COUTINHO; REGITANO, 1995).

Marcadores moleculares permitem que os genótipos dos indivíduos sejam determinados em muitos locos para várias espécies diferentes (O' BRIEN; GRAVES, 1991) possibilitando que parâmetros populacionais como freqüências alélicas e genotípicas sejam estimadas. Estas informações permitem a comparação de freqüências entre populações e revelam diferenças nas composições genéticas que podem contribuir para as variações fenotípicas (MOODY et al., 1996).

Entretanto, para a identificação das regiões do DNA responsáveis por características de interesse, geralmente, recorre-se a algumas estratégias diferentes, como a localização de QTLs pela análise de regiões microssatélites do maior número possível de indivíduos de grandes famílias, originárias de acasalamentos direcionados (HALEY, 1995). Porém, a aplicação dessa ferramenta esbarra na dificuldade de se constituir famílias para o estudo e no elevado custo para a manutenção dos animais, principalmente em bovinos, cujo intervalo entre gerações é grande. Além disso, após a identificação de QTLs ainda há um longo caminho a percorrer até a descoberta dos genes diretamente implicados no fenótipo.

Uma metodologia alternativa para minimizar esses problemas é a busca de genes candidatos na qual o objetivo é estudar os mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação das características de produção em questão, na tentativa de pesquisar variações de genes específicos entre indivíduos que apresentam fenótipos diferentes (WOMACK, 1993). A estratégia do gene candidato tem como maior vantagem o fato de não ser obrigatório a genotipagem de um grande número de indivíduos de grandes famílias originados de acasalamentos direcionados, uma vez que, a princípio, espera-se que o polimorfismo estudado seja determinante direto da variação fenotípica.

Apesar de Rocha et al. (1994) terem utilizado o termo *Ilusão Aditiva* ao se referirem ao exagerado otimismo pelo fácil emprego de marcadores com o propósito de seleção. Isso porque genes isolados não podem ser classificados como bons ou ruins, sendo que somente o genótipo como um todo pode receber este tipo de classificação. Vaz Portugal (2002) considera que o futuro se inscreverá no domínio da identificação e expressão do DNA, procurando assentar o melhoramento genético na seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection* – MAS). O termo *Marcador Responsável por Expressões Fenotípicas* orientará o ganho genético, o mérito genético e a intensidade de seleção, otimizando a eficiência biológica em termos unitários e comparativos.

A despeito da diferença de opiniões, marcadores genéticos estão sendo empregados em animais de produção para a detecção de doenças hereditárias, para a orientação de acasalamentos e, ainda que de forma incipiente, para a identificação de genótipos superiores para características de heranças simples ou complexa (DAVIS; DENISE, 1998).

Da descoberta à comercialização, o desenvolvimento da MAS ocorre em três fases: detecção, avaliação e implementação. A localização das regiões cromossômicas ligadas às características de interesse (QTL) e detecção do efeito no fenótipo em populações experimentais consistem na primeira fase. Na fase de avaliação, o potencial dos marcadores é avaliado em rebanhos comerciais. A fase de implementação depende do uso combinado das informações (marcadores, pedigree e fenótipo) na avaliação do mérito genético individual (DAVIS; DENISE, 1998).

Em alguns casos, a MAS alcançou a terceira fase com certo sucesso. Um dos primeiros exemplos de uso de marcadores foi do polimorfismo LD encontrado no gene codificador do receptor de estrógeno, usado para selecionar tamanho de leitegada (ROTHSCHILD et al., 1996; SHORT et al., 1997). Nos dias de hoje, a suinocultura pode contar com diversos marcadores diretos e LDs (PICmarq) na seleção de características ligadas à reprodução, ingestão de alimento, crescimento, composição corporal e qualidade da carne (DEKKERS, 2004).

No tocante à pecuária de corte é possível considerar que a MAS esteja na segunda fase (avaliação). Embora exista a comercialização de marcadores por grandes empresas (Genetic Solutions/Bovigen, Frontier Beef Systems/GeneSeek, Merial/Quantum Genetics e Metamorphix Inc. Genomics), ainda se faz necessário

validar os resultados de estudos anteriores com maior número de animais, em populações comerciais (VAN EENENNAAM, 2007).

A descoberta de marcadores genéticos ligados a qualidade da carne faz da MAS, uma possibilidade, uma promessa de solução, para alguns problemas enfrentados pela pecuária (SILLENCE, 2004). Neste contexto, a presente revisão trata a seguir de genes candidatos a conterem marcadores para qualidade, marmorização e maciez da carne, em função da citada variabilidade destas características e sua respectiva importância econômica para o melhoramento do rebanho zebuino nacional.

2.4 GENES RELACIONADOS À QUALIDADE DA CARNE

O mecanismo global que estabelece a diferenciação da qualidade da carne, entre os grupos genéticos e/ou entre indivíduos dentro destes grupos, ainda permanece obscuro. Entretanto, com o rápido avanço da Bioquímica e da Biologia Molecular, alguns dos fatores moleculares envolvidos na fisiologia dessa característica se tornaram conhecidos e outros são implicados de tempos em tempos.

2.4.1 Sistema proteolítico: Calpaína e Calpastatina

O sistema proteolítico cálcio-dependente denominado calpaína tem sido considerado como o maior sistema proteolítico citossólico (superior ao sistema lisossomal), responsável pelas variações na extensão do amaciamento no *postmortem* (CROAL; DE MARTINO, 1991; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; KOOHMARAIE et al., 1993). Este sistema degrada a estrutura miofibrilar e é caracterizado por três componentes: uma enzima que requer baixa concentração de cálcio (μ -calpaína), outra que requer alta concentração de cálcio (m-calpaína) e um inibidor específico das calpaínas, a calpastatina.

Acredita-se que a ação proteolítica da calpaína no *postmortem*, nas fibras musculares, se dá pelo enfraquecimento da interação filamentos finos/disco-Z do sarcolema das fibras musculares, os quais apresentam as maiores relações com o amaciamento no *postmortem*. A ação das calpaínas no disco-Z concentra-se especificamente nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T, nas quais encontram seu sítio de ligação (DRANSFIELD, 1994).

A calpastatina, inibidor endógeno de ambas as calpaínas, é considerada o maior modulador da ação proteolítica das mesmas. Estudos têm demonstrado que no músculo vivo, quando a degradação da proteína é reduzida, a atividade da calpastatina é aumentada (MORGAN et al., 1993). Desta maneira há uma grande evidência sugerindo que a calpastatina é o principal regulador da atividade proteolítica das calpaínas no *postmortem* (KOOHMARAIE, 1988; KOOHMARAIE, 1994).

Trabalhos com ovelhas *callipyge* também comprovaram a importância do sistema proteolítico no amaciamento da carne, uma vez que estes ovinos apresentam uma mutação de ponto correlacionada com maior desenvolvimento da musculatura dos posteriores, maior expressão da calpastatina e redução da maciez (DELGADO et al., 2001; DUCKETT et al., 1998; FREKING et al., 2002; KOOHMARAIE et al., 1995).

A atividade da calpastatina aumenta enquanto a atividade da calpaína diminui com o aumento da proporção *Bos indicus* (Brahman) X *Bos taurus* usada no cruzamento (PRINGLE et al., 1997). Assim, a atividade da calpastatina foi sugerida como critério de seleção para *Bos indicus* (CUNDIFF, 1993), porém tal idéia foi contestada em função da baixa herdabilidade encontrada para a atividade da calpastatina mensurada no *postmortem* (O'CONNOR et al., 1997). Segundo estes autores, seria mais interessante selecionar zebuínos para melhor maciez de carne via teste de progênie, utilizando a força de cisalhamento ou a maciez sensorial como critérios.

Características mensuradas no final do ciclo produtivo como as mencionadas acima são de anotação não rotineira e há dificuldade na obtenção dos dados, assim a correlação entre tais características e marcadores genéticos facilitaria a seleção e o melhoramento animal (DEKKERS, 2004).

Os genes codificadores da μ -calpaína (*CAPN1*) e da calpastatina (*CAST*) estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 29 (SMITH et al., 2000) e 7

(BISHOP et al., 1993) de bovinos. Devido a fisiologia proteolítica dos transcritos, os genes são considerados candidatos funcionais para características de qualidade de carne em animais de produção. Além disso, foi descrito QTL no cromossomo BTA29 correlacionado com maciez da carne (SMITH et al., 2000, CASAS et al., 2003).

Zhang (1996) descreveu um polimorfismo RFLP no gene *CAPN1*. Hoje mais de 38 polimorfismos do tipo SNP foram encontrados no gene da calpaína (CASAS et al., 2005; PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; WHITE et al., 2005).

Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) não sinônimos no gene *CAPN1*, *CAPN316* e *CAPN530*, responsáveis pelas substituições de aminoácidos Gly316Ala e Val530Ile, respectivamente e têm sido associados às características de qualidade de carne em raças de corte da subespécie *Bos taurus* (PAGE et al., 2002,2004).

White et al. (2005) genotiparam 504 animais Brahman (*Bos indicus*), 554 animais cruzados (diferentes raças *Bos taurus*), acrescentando três novos polimorfismos de *CAPN1* aos polimorfismos *CAPN316* e *CAPN530*. Dentre os cinco polimorfismos estudados, um dos novos, descrito na posição 4751 do gene *CAPN1*, foi o que melhor apresentou relação com força de cisalhamento e maciez nas duas populações ($p < 0,01$). O uso simultâneo dos marcadores *CAPN316*, *CAPN530* e 4751 pode aumentar a capacidade de estimar a maciez da carne em bovinos, sendo que o uso do 4751 é especialmente importante em populações de genética *Bos indicus* (WHITE et al., 2005).

O marcador *CAPN530* apresentou o alelo G fixado em Brahman, não sendo, portanto informativo. O *CAPN316* e outros dois polimorfismos do gene *CAPN1* (4753 e 5331) estão correlacionados com altura de cupim (cm), mas apenas o *CAPN316* foi relacionado com maciez de carne (CASAS et al., 2005). As frequências alélicas e genotípicas diferem entre populações *Bos indicus* (Brahman) e *Bos taurus* para os marcadores *CAPN316*, *CAPN530*, 4753 e 5331 do gene *CAPN1* (CASAS et al., 2005).

Ano passado, Rincon e Medrano (2006) desenvolveram a genotipagem do polimorfismo *CAPN530* (GenBank AF248054:g.4558A>G) pelo método de PCR-RFLP. A falta de informações sobre frequência alélica e genotípica e sobre potencial relação deste polimorfismo com qualidade da carne em animais zebuínos (Nelore e cruzamentos) no Brasil motivou a escolha do presente trabalho.

Outro polimorfismo do gene *CAPN1*, uma substituição de *C* por *T* no íntron 14 foi descrita na posição 4685 (GenBank AF 248054) em um estudo na Polônia, com 141 animais de raças *Bos taurus* para os quais se achou correlação entre o genótipo e a porcentagem de cortes de carne em relação a carcaça (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004).

Recente estudo de associação com polimorfismos, nos exons 9 e 14 (GenBank AF 248054), do gene codificador da calpaína foi conduzido na Irlanda com 281 carcaças de abatedouros comerciais. O estudo encontrou associação entre força de cisalhamento e genótipo para o polimorfismo do exon 9, mas o efeito da alteração no exon 14 sobre o fenótipo não ocorreu. Aparentemente, a alteração no exon 14 ocasiona uma substituição conservativa entre aminoácidos não polares na proteína sem comprometer a função enzimática da μ -calpaína (COSTELLO et al., 2007).

Os painéis comerciais Igenity *TenderGENE* (Merial) e GeneSTAR *Tenderness* possuem em comum dois polimorfismos de *CAPN1*, mas cada qual tem um marcador diferente localizado no gene *CAST* (VAN EENENNAAM et al., 2007). Em recente estudo, os marcadores de *CAST* e *CAPN1* (*CAPN316* e *4751*) dos painéis comerciais citados foram correlacionados ($p < 0,001$) com maciez de carne em animais *Bos indicus* (Brahmam) e *Bos taurus* (VAN EENENNAAM et al., 2007).

Primeramente, Lonergan et al. (1995) e Chung et al. (1999) descreveram polimorfismos no gene *CAST* e depois outros marcadores neste mesmo gene foram patenteados (Barendse, 2002) e/ou são comercializados pelos painéis Igenity *TenderGENE* (Merial) e GeneSTAR *Tenderness* (VAN EENENNAAM et al., 2007).

O polimorfismo de *CAST* patenteados por Barendse et al. (2002) equivale ao SNP, troca de guanina por adenina, na região 3' não traduzida do gene. Este SNP foi pesquisado por Casas et al. (2006) em mais de 1.100 animais *Bos taurus* e mais de 500 Brahman (*Bos indicus*). Associações entre os genótipos de *CAST* e maciez, suculência e sabor da carne foram encontradas para animais *Bos taurus*, mas o efeito do gene sobre essas características fenotípicas não foi significativo para os animais *Bos indicus* (CASAS et al., 2006).

Mais uma alteração foi descrita para o gene *CAST* em animais *Bos taurus*, utilizando a técnica PCR-RFLP, apresentando relação com maciez da carne (força de cisalhamento) e com deposição de gordura na carcaça, e também tendência de associação com área de olho de lombo (SCHENKEL et al., 2006). Embora este seja

outro polimorfismo de *CAST*, o efeito descrito é semelhante ao encontrado para GeneSTAR Tenderness, -0,37 Kg na força de cisalhamento para animais com duas cópias do alelo favorável (SCHENKEL et al., 2006).

Chung et al. (2001) trabalharam com uma pequena amostra de indivíduos, 47 animais da raça Angus (*Bos taurus*), e detectaram variantes genéticas no intron 6 do gene *CAST* os quais podem ser detectados por PCR-RFLP. Neste trabalho não houve associação entre o polimorfismo de *CAST* a qualidade da carne (CHUNG et al., 2001). Entretanto, o fato da importância dos polimorfismos intrônicos ter sido renovada (NAKAYA et al., 2007) e de não haver estudos de frequência ou associação com o polimorfismo descrito por Chung et al., (2001) em *Bos indicus* motivaram a escolha deste trabalho.

Em suma, os trabalhos supracitados fundamentam a eleição dos genes *CAST* e *CAPN1* para trabalhos de genotipagem bovina e associação com qualidade da carne e características relacionadas ao rendimento da carcaça e de cortes (área de olho de lombo, por exemplo).

2.4.2 Deposição de gordura: Leptina, Tiroglobulina e Diacylglicerol O-acyltransferase

Durante muitos anos, postulou-se a existência de um mecanismo lipostático de controle do apetite, modulado pelas reservas energéticas do organismo sob a forma de tecido adiposo (HARVEY, 1969). Apesar das evidências experimentais da existência de um mecanismo endócrino de sinalização para este mecanismo, obtidas em experimentos de parabiose, a identificação do agente sinalizador somente veio a ocorrer no início dos anos noventa, quando Zhang et al. (1994) noticiaram a clonagem do gene da leptina (*LEP*) também conhecido como gene da obesidade.

Primariamente, o gene da leptina foi descoberto como gene da obesidade em camundongos ob/ob cujo genótipo recessivo para obesidade resulta em animais com 50% a mais de gordura corporal, estéreis e hiperglicêmicos (INGALLS et al., 1950; HUMMEL et al., 1966).

O gene *LEP* codifica a leptina, uma proteína de 16-kDa produzida por adipócitos e associada à regulação da ingestão de alimentos, balanço energético, eficiência reprodutiva e deposição de gordura (HOUSEKNECHT et al., 1998).

Embora, os estudos sobre os inúmeros mecanismos de ação da leptina ainda se encontram na fase inicial, evidências sugerem que essa substância exerce um papel central na regulação das reservas energéticas do organismo, deslocando o fluxo de metabólitos do tecido adiposo para a musculatura esquelética (CEDDIA et al., 1998).

Tendo em vista que a regulação da ingestão de alimentos, o metabolismo dos nutrientes e a composição corporal são fatores de grande importância no contexto da produção animal, Hossner (1998) sugeriu que a leptina e seu receptor celular poderiam ser considerados genes candidatos para as características de composição de carcaça e qualidade da carne produzida.

A leptina sérica foi relacionada com características ligadas à deposição de gordura em bovinos (GEARY et al., 2003) e o gene *LEP* foi seqüenciado próximo ao marcador microsatélite *BM1500*, associado com porcentagem de gordura nas costelas, porcentagem de musculatura esquelética na costela e o conteúdo de gordura na carcaça (FITZSIMMONS et al., 1998). Estas características relacionadas à deposição de gordura são importantes para determinar o rendimento da carcaça (BERGEN et al., 1996).

Stone et al. (1996) mapearam o gene *LEP* no cromossomo 4 e de lá pra cá muitos polimorfismos foram descritos e associados com diversas características de interesse econômico para bovinocultura, do conteúdo de gordura na carcaça até a fertilidade (BARENDSE, 2005; BUCHANAN et al., 2002; POMP et al., 1997; VAN DER LENDE et al., 2005;).

Os primeiros polimorfismos para o gene *LEP* de bovinos, localizado no cromossomo BTA 4 foram descritos por Pomp et al. (1997) e Lien et al. (1997). O polimorfismo descrito por Pomp et al. (1997) apresentaram relações significativas com peso corporal, deposição de gordura na carcaça e qualidade dos cortes cárneos em bovinos (OPRZADEK et al., 2003).

Entretanto, a descoberta de uma alteração de ponto por Buchanan et al. (2002), analisada por PCR-RFLP e localizada no exon 2 do gene da leptina de bovinos de corte, proporcionou os melhores resultados de relação com conteúdo de gordura na carcaça. Esses autores determinaram que uma transição C/T que

codifica para a troca de um aminoácido arginina por um cisteína está estreitamente relacionada com o conteúdo de gordura na carcaça de animais *Bos taurus*, tanto nas raças de origem continental quanto nas de origem britânica (BUCHANAN et al., 2002).

O gene diacylglicerol *O*-acyltransferase 1 (*DGAT1*) e o gene da tiroglobulina (*TG*) foram mapeados na região centromérica do cromossomo 14. A substituição de uma lisina por uma alanina no gene que codifica a enzima diacylglicerol *O*-acyltransferase com papel chave na síntese de triglicerídeos, tem sido associada ao aumento da produção de leite e ao aumento do conteúdo de gordura do leite em bovinos (GRISART et al., 2001,2004). Entretanto, resultados conflitantes em relação ao seu efeito sobre a deposição de gordura na carcaça de bovinos de corte têm sido relatados (MOORE et al., 2003; THALLER et al., 2003).

O *DGAT1* tornou-se um gene candidato funcional e posicional para conteúdo de gordura no leite, baseado, respectivamente, no fenótipo de ausência de lactação observada em camundongos deficientes do gene e devido à sua posição próxima a um QTL identificado no cromossomo 14 de bovinos (RIQUET et al., 1999).

A enzima codificada por *DGTA1* regula a taxa de triglicérides produzida em adipócitos (COLEMAN; BELL, 1976) e foi associada a homeostase energética (HAVEL, 2001). Estudos de associação em diferentes populações bovinas apóiam a eleição do *DGTA1* como candidato a conter marcadores para características ligadas a deposição de gordura (KÜHN et al., 2004; TANTIA et al., 2006; THALLER et al., 2003). Este gene foi mapeado no cromossomo 14, onde o gene *TG* está localizado próximo ao marcador CSSM66 relacionado ao escore de marmorização (BARENDSE, 1997).

O gene *TG* codifica a tiroglobulina, precursora de triiodotironina e tetraiodotironina, sinalizadores do desenvolvimento de adipócitos (AILHAUD et al., 1992; DARIMONT et al., 1993; SMAS; SUL, 1995). Espera-se que a espessura de gordura subcutânea e a porcentagem da gordura nos tecidos e no leite sejam influenciadas por genótipos do gene *TG* porque as iodotironinas afetam a diferenciação de adipócitos e o nível dos hormônios tireoidianos influencia na porcentagem de gordura no leite (FOLLEY; MALPRESS, 1948).

De Martynoff et al. (1987) e Parma et al. (1987) sequenciaram o gene *TG* polimorfismos do mesmo foram descritos (BARENDSE, 1999; GEORGES et al., 1987). Estudos de associação entre marcadores de *TG* e marmorização (e outras

análises de carne ligadas à deposição de gordura) foram realizados, mas os resultados são contraditórios (BARENDSE, 1999; BARENDSE et al., 2004; CASAS et al., 2005; RINKER et al., 2006; VAN EENENNAAM et al., 2007).

Barendse (1999) classificou o gene codificador da tiroglobulina (*TG*), como um candidato posicional para características de composição e qualidade da carne em bovinos, pela estreita ligação com o locus *CSSM66*. Neste mesmo trabalho, o autor observou a associação de polimorfismos na região 5' UTR do gene da tiroglobulina com a maior marmorização (quantidade de gordura entremeada) da carne bovina. A tiroglobulina é um precursor de hormônios que afetam o metabolismo de lipídeos, o que habilita o gene *TG* também como um candidato funcional.

Recentemente, Thaller et al. (2003) encontram associação entre o polimorfismo que leva à substituição da lisina pela alanina no gene *DGAT1* e um dos polimorfismos da região 5' UTR do gene da tiroglobulina, ambos detectados pela técnica de PCR-RFLP, sobre o conteúdo de gordura na carcaça de bovinos *Bos taurus* das raças Holandesa e Charolesa.

Em suma, os trabalhos supracitados fundamentam a eleição dos genes *LEP*, *DGAT1* e *TG* para trabalhos de genotipagem bovina e associação com deposição de gordura e características relacionadas ao rendimento da carcaça e de cortes específicos (área de olho de lombo, por exemplo).

3 OBJETIVOS

As intenções do presente trabalho foram classificadas como objetivos gerais e específicos.

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar pesquisa de interesse estratégico visando o aprofundamento dos conhecimentos referentes aos mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos nas características de qualidade da carne, os quais deverão concorrer para o melhoramento genético de bovinos por meio da seleção assistida por marcadores moleculares, e desta forma contribuir para o aumento da competitividade da pecuária nacional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar as frequências alélicas e genótípicas de polimorfismo nos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* em bovinos de corte de diferentes grupos genéticos (zebuínos e cruzados). Avaliar a ocorrência de associações entre os polimorfismos e as características relacionadas à qualidade de carne e ao rendimento da carcaça em animais abatidos em idade jovem.

4 HIPÓTESES

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes *CAPN1*, *CAST*, *LEP*, *TG* e *DGAT1* diferem entre os grupos genéticos estudados, estando influenciadas pela composição *Bos indicus* X *Bos taurus* dos grupos.

Ocorre associação entre os polimorfismos de *CAPN1* e *CAST* e os resultados das análises: Força de Cisalhamento, Índice de Fragmentação Miofibrilar e Área de Olho de Lombo.

Ocorre associação entre os polimorfismos de *LEP*, *TG* e *DGAT1* e os resultados das análises: Espessura de Gordura Subcutânea, Lipídeos Totais, Marmorização, Força de Cisalhamento e Área de olho de lombo.

5 CAPÍTULO 1 – CAPN1 e CAST

O capítulo a seguir se apresenta no formato de artigo, cuja versão em inglês foi enviada para correção e apreciação dos assessores da revista *Genetics and Molecular Biology*.

5.1 RESUMO

Calpaínas e calpastatína têm grande relevância no processo *postmortem* de amaciamento da carne. Os objetivos desse estudo foram estimar as frequências alélicas e genóticas de polimorfismos dos genes codificadores da μ -calpaína (*CAPN1*) e da calpastatína (*CAST*) em cinco diferentes grupos genéticos e determinar os efeitos dos polimorfismos sobre características relacionadas à maciez da carne e ao rendimento de carcaça, em animais abatidos jovens. A genotipagem de 147 animais incluiu os grupos: Nelore (*Bos indicus*), Canchim ($5/8Bos\ taurus + 3/8Bos\ indicus$), cruzamento Rubia Gallega X Nelore ($1/2Bos\ Taurus + 1/2Bos\ indicus$), Brangus Tricross ($9/16Bos\ taurus + 7/16Bos\ indicus$) e Pardo Suiço Tricross ($3/4Bos\ taurus + 1/4Bos\ indicus$). Área de Olho de Lombo, Força de Cisalhamento e Índice de Fragmentação Miofibrilar foram analisados utilizando o procedimento *General Linear Models (GLM)* do programa SAS e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O polimorfismo do gene *CAPN1* não apresentou associações significativas com as características fenotípicas. O genótipo *AA* do polimorfismo *CAST/Xmnl* foi superior ao *AB* na comparação entre os Índices de Fragmentação Miofibrilar, indicando que *AA* pode ser favorável à maciez da carne. O mesmo polimorfismo não apresentou relação com as demais características fenotípicas. A validação desse resultado precisará ser realizada em estudos futuros abrangendo maior número de animais, antes que o uso deste marcador seja recomendado para a seleção de *Bos indicus* e respectivos cruzamentos.

Palavras-chave: Polimorfismo. Calpaína. Calpastatína. Maciez. Gado de corte.

5.2 INTRODUÇÃO

A maciez é a característica mais importante para os apreciadores da carne bovina, tal fato pode ser comprovado pela relação positiva entre a maciez de um corte comercial e seu preço (KOOHMARAIE et al., 2002). O Índice de Fragmentação Miofibrilar (do inglês MFI) e a Força de Cisalhamento (FC) mensurada pelo equipamento Warner-Bratzler (Chantillon, Estados Unidos) são métodos comuns usados na avaliação da maciez da carne. O MFI estima mais de 50% da variação da maciez, sendo um método preciso, sensível e barato (HOPKINS et al., 2000). Maiores valores de MFI estão associados a menores valores de FC e maiores notas para maciez na avaliação sensorial (OLSON et al., 1996).

A quebra das proteínas miofibrilares, conduzida pela enzima μ -calpaína e modulada por seu inibidor calpastatína, é o principal mecanismo de amaciamento da carne no *postmortem* (DELGADO et al., 2001). A regulação da ação da atividade da μ -calpaína foi associada a diferenças de maciez na carne (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999) e pode estar relacionada com a discrepância entre a maciez da carne de animais *Bos indicus* e da carne de animais *Bos taurus*. A atividade da calpastatína aumenta e a da μ -calpaína diminui conforme aumenta a proporção genética de *Bos indicus* nos cruzamentos, a qual influencia negativamente na maciez (PRINGLE et al., 1997).

Fatores genéticos podem estar envolvidos com a variação na atividade do sistema proteolítico, pois um número cada vez maior de polimorfismos é descrito para os genes codificadores da μ -calpaína (*CAPN1*) e da calpastatína (*CAST*). O gene da calpastatína foi mapeado no cromossomo BTA7 (BISHOP et al., 1993) e *CAPN1* foi mapeado no final telomérico do cromossomo BTA29, onde se localiza um conhecido QTL para maciez da carne (SMITH et al., 2000). Lonergan et al. (1995) e Chung et al. (1999) descreveram polimorfismos do gene *CAST* e mais recentemente marcadores foram desenvolvidos e patenteados (BARENDSE, 2002). Em 1996, Zhang (1996) descreveu um polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (do inglês *restriction length polymorphism* – RFLP) para o gene *CAPN1*. Hoje, mais de 38 polimorfismos de alteração pontual (em inglês, *single nucleotide polymorphisms* – SNP) foram descobertos no gene da calpaína (CASAS et al., 2005; PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; WHITE et al., 2005).

Estudos anteriores sugerem fortemente que polimorfismos dos genes *CAPN1* e *CAST* são candidatos funcionais e posicionais a indicadores de qualidade da carne e associações genótipo-fenótipo foram encontradas em populações bovinas nos Estados Unidos (CASAS et al., 2006), Nova Zelândia (PAGE et al., 2002), Irlanda (COSTELLO et al., 2007) e Polônia (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004).

Entretanto, a vasta indústria de carne brasileira se baseia na adaptabilidade e rusticidade do nelore. Essa raça formada por genética *Bos indicus* difere bastante dos grupos genéticos (*Bos taurus*) estudados na maioria da literatura citada até aqui. Portanto, antes da comercialização de marcadores se tornar uma tendência entre os pecuaristas brasileiros, há necessidade de validar as pesquisas verificando em *Bos indicus* e seus cruzamentos o efeito dos polimorfismos descobertos e estudados em populações *Bos taurus*.

A Área de olho de Lombo (AOL) se correlaciona com o peso dos cortes comerciais, portanto sendo uma característica de importância econômica (TAIT et al., 2005). Aparentemente não há correlação entre as funções fisiológicas proteolíticas da μ -calpaína e características relacionadas ao desenvolvimento ponderal ou muscular e ao rendimento de carcaças, mas estudos anteriores sugeriram a hipótese de que polimorfismos do gene *CAPN1* estariam em desequilíbrio de ligação com genes próximos responsáveis por essas características (CASAS et al., 2005; JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004).

Assim, os objetivos do presente estudo foram estimar a frequência alélica e genotípica de polimorfismos dos genes da μ -calpaína e da calpastatína – *CAPN1/Psyl* (RINCON; MEDRANO, 2006) e *CAST/Xmnl* (CHUNG et al., 2001) – e determinar a associação destes com AOL, FC e MFI em bovinos de corte *Bos indicus* e cruzamentos com *Bos taurus*.

5.3 MATERIAL E MÉTODO

Segue breve descrição da metodologia empregada na obtenção dos dados fenotípicos, genotípicos e análise estatística do presente estudo de associação.

5.3.1 Animais

O estudo incluiu animais das raças Nelore e Canchim, além de cruzamentos que utilizam matrizes Nelore na base da formação, constituindo cinco grupos genéticos diferentes. Dentre os 147 animais genotipados, 46 animais eram da raça Nelore – N – (*Bos indicus*), 41 Canchim – C – ($5/8Bos\ taurus + 3/8Bos\ indicus$), 19 Brangus Tricross – B Tricross – ($9/16Bos\ taurus + 7/16Bos\ indicus$) e 15 Pardo Suíço Tricross – PS Tricross – ($3/4Bos\ taurus + 1/4Bos\ indicus$). Estes animais foram mantidos na unidade experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. Este gado foi amostrado entre quatro fazendas e o sistema de criação utilizado na unidade experimental universitária foi anteriormente detalhado por Silveira et al. (2000). Outras 26 cabeças do cruzamento Rubia Gallega X Nelore ($1/2Bos\ Taurus + 1/2Bos\ indicus$) foram amostradas de um sistema semi-intensivo de criação praticado pelo projeto chamado Genética Galega³. Todos os animais foram abatidos entre 15 e 19 meses de idade.

Após abate humanitário, em frigoríficos colaboradores, as carcaças foram identificadas e refrigeradas por 24 horas, período seguido pela remoção de amostras de 2,50cm de largura do músculo *Longissimus dorsi* (LD) entre a 12^a e a 13^a costelas da hemi-carcaça esquerda. A Área de Olho de Lombo, também conhecida como área do *Longissimus dorsi*, foi mensurada no abatedouro pelo método do quadrante descrito pelo sistema *USDA Quality Grade* (1989). As amostras foram embaladas a vácuo e maturadas sob refrigeração (1 a 2°C) até 14 dias *postmortem* e foram, então, congeladas até que as análises pudessem ser realizadas.

5.3.2 Qualidade da carne

As análises relevantes para maciez da carne, força de cisalhamento (FC) e Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) foram realizadas no Laboratório de

³ Genética Gallega, projeto desenvolvido em parceria do Grupo Pão de Açúcar e detalhado no site: <http://www.geneticaparatodos.com/>

Bioquímica do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

A força de cisalhamento foi determinada de acordo com Wheeler et al. (1995). Em poucas palavras, as amostras de carne congeladas foram descongeladas sob refrigeração (4°C por 24 horas), até que a temperatura interna atingisse 5 a 6°C. Então, as amostras foram cozidas até alcançarem a temperatura interna de 71°C e resfriadas durante 24 horas (5 a 6°C), antes da retirada de seis (6) a oito (8) cilindros de cada amostra. Os cilindros apresentavam 1,27cm de diâmetro, paralelos à orientação das fibras musculares. Os cilindros foram cortados pelo equipamento Warner-Bratzler com 25Kg de capacidade, à velocidade padronizada de 20cm/minuto. Foi calculada a média dos valores obtidos para os cilindros de cada amostra e esta média correspondeu ao número utilizado nas análises estatísticas.

A determinação do Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Culler et al. (1978). De cada amostra, ainda congelada, foram retirados fragmentos de três gramas desprovidos de tecido conjuntivo e gordura aparentes. Os fragmentos de três gramas do músculo LD foram homogeneizados em 30mL de solução de extração (KCl 100mM, fosfato de potássio 20mM, EDTA 1mM, MgCl₂ 1mM e NaN₃ 1mM, pH 7,0) pelo dispersador *Ultra-turrax* com haste de cisalhamento (Marconi - MA 102/E, Alemanha) a 18000 rpm. Em seguida, centrifugou-se a solução homogeneizada a 1000 x g por 15 minutos, a 2°C. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 30mL de solução de extração e o precipitado foi agitado vigorosamente até desfazer o sedimento, sendo então novamente centrifugado por 15 minutos a 1000 x g, a 2°C. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se ao precipitado, 7,5mL da solução de extração e a suspensão obtida foi filtrada em peneira de polietileno para remoção do tecido conectivo. Para lavagem do tubo e facilitar a passagem das miofibrilas através da peneira foram acrescentados mais 7,5mL da solução de extração ao tubo onde foi realizada a extração.

Na suspensão de miofibrilas foi determinada a concentração de proteínas pelo método do biureto, descrito por Gornall et al. (1949). Uma alíquota da suspensão de miofibrilas foi diluída com a solução de extração até a concentração protéica de 0,5±0,05mg/mL. A suspensão diluída de miofibrilas foi agitada e colocada em cubeta para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de

540nm. Para obtenção do Índice de Fragmentação Miofibrilar, o valor obtido de densidade ótica a 540nm foi multiplicado por 200.

5.3.3 Extração de DNA e genotipagem

Inicialmente, procedeu-se a maceração com nitrogênio líquido de 250mg de carne retiradas das amostras do músculo *Longissimus dorsi*, cada amostra representando um indivíduo.

A extração do DNA foi realizada por método não fenólico, baseado na digestão com protease K e precipitação com NaCl e álcool (SAMBROOCK, 1989). Cada solução de DNA foi checada quanto a concentração e a integridade e depois diluída para a concentração de trabalho (10ng/uL) e armazenada a -20°C até a genotipagem.

Os animais foram genotipados para os genes *CAPN1* e *CAST* com a utilização da reação da polimerase em cadeia e a restrição do fragmento de DNA por digestão enzimática, técnica conhecida como PCR-RFLP. O *primer forward* utilizado para o gene *CAPN1* foi 5'-CGTTTCTTCTCAGAGAAGAGCGCAGGGA -3', o *primer reverse* foi 5'-CCTGCGCCATTACTATCGATCGCAAAGT-3' e a temperatura de anelamento foi 58°C. Para o gene *CAST* utilizou-se o *primer forward* 5'-AGCAGCCACCATCAGAGAAA-3', o *primer reverse* 5'-TCAGCTGGTTCGGCAGAT-3' e a temperatura de anelamento do *primer* com o DNA molde foi 57°C.

Os alelos do gene *CAPN1* (A e G) foram identificados pela amplificação de um fragmento com 341 pares de base (pb), o qual foi digerido pela enzima de restrição *Pst*I para originar os fragmentos de restrição do polimorfismo *CAPN1/Pst*I, também conhecido como *CAPN530*, de acordo com Rincon e Mendrano (2006).

Para determinar os alelos A e B do gene *CAST*, um segmento de aproximadamente 1500pb foi amplificado pela PCR e depois digerido com a enzima de restrição *Xmn*I (*CAST/Xmn*I) segundo a metodologia descrita por Chung et al. (2001).

Cada PCR foi realizado em volume final de 25µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 50ng de DNA genômico, 0,20µM de cada *primer*, 10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e

1 unidade (UI) de *Taq* DNA polimerase. O protocolo padrão para as ampliações foi: 4 minutos para denaturação inicial a 94°C, 1 minuto para denaturação a 94°C, 45 segundos para anelamentos dos *primers* (na temperatura adequada descrita acima para cada polimorfismo), 1 minuto para extensão a 72°C, 4 minutos para extensão final a 72°C. Os passos 2 (denaturação), 3 (anelamento) e 4 (extensão), correspondem a um ciclo, o qual foi repetido 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10µL de produto do PCR e 3 unidades da enzima de restrição. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose 2% (w/v) e visualizados por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado pela comparação com um marcador padrão de peso molecular de 100pb. Genótipos individuais foram determinados para cada polimorfismo pela análise do tamanho relativo dos fragmentos descritos pelo número aproximado de pares de bases.

5.3.4 Análise estatística

Freqüências alélicas e genóticas foram calculadas de acordo com Weir (1990). Diferenças nas freqüências alélicas dos polimorfismos dentro e entre os cinco grupos genéticos foram determinadas pelo método de Goodman adaptado por Curi e Moraes (1981).

As características de interesse foram analisadas utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999). O modelo linear utilizado para analisar as características quantitativas considerou, adicionalmente ao efeito de grupo genético, a interação entre estes grupos e grupos contemporâneos da seguinte forma: $Y_{ijk} = \mu + G_i + GGC_j + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} = característica de produção (fenótipo), μ = média geral, G_i = efeito fixo do genótipo ($i = 1, 2, 3$), GGC_j = efeito fixo da interação grupo genético e grupo contemporâneo ($j = 1, \dots, 9$), e e_{ijk} = erro aleatório. O critério para composição dos grupos contemporâneos incluiu as variações de sexo, idade ao abate, confinamento e fazenda de origem. Genótipos com freqüência muito baixa (abaixo de 10%) na amostra total de indivíduos não foram incluídos na análise para evitar

resultados não confiáveis. O efeito de touro não foi incluído no modelo linear, pois o número havia número muito pequeno de animais na amostra que eram progênie de um mesmo touro. A possibilidade de confundir o efeito do genótipo com o efeito do touro sobre as características fenotípicas estudadas foi reduzida devido ao grande número de famílias de meio-irmãos.

5.4 RESULTADOS

As duas variantes alélicas (*A* e *G*) do gene *CAPN1/Psyl* foram observadas em todos os cinco grupos genéticos estudados. O genótipo *AA* foi caracterizado pela presença de um único fragmento de tamanho 341pb, enquanto o genótipo *GG* foi determinado pela presença de dois fragmentos de restrição com 195 e 146pb. Indivíduos *AG* apresentaram fragmentos com os três tamanhos 341, 195 e 146pb (Figura 1).

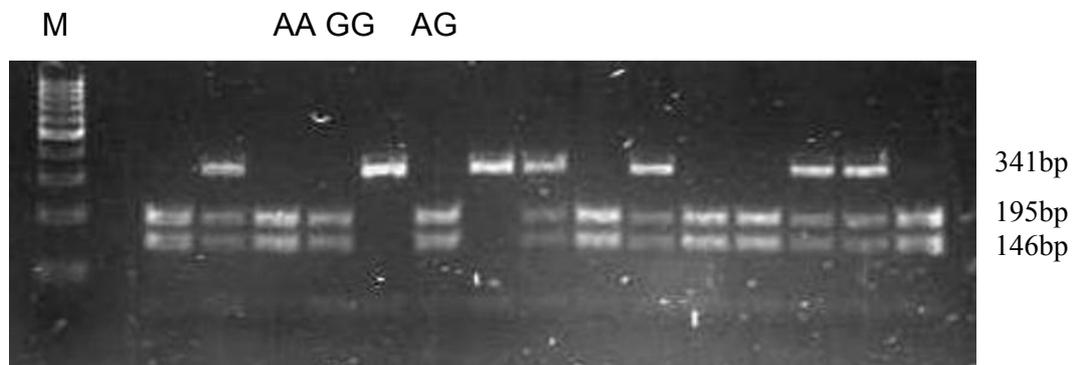


Figura 1 – Polimorfismo RFLP produzido pela enzima de restrição *Psyl* no gene bovino *CAPN1*. M = 100pb padrão de peso molecular; AA = genótipo caracterizado pela presença do fragmento com de 341pb; GG = genótipo caracterizado pela presença dos fragmentos 195 e 146pb, AG = genótipo heterozigoto caracterizado por fragmentos com 341, 195 e 146pb

Os dois alelos (*A* e *B*) do polimorfismo *CAST/Xmnl* foram detectados. O genótipo *AA* foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição com tamanho aproximado de 950 e 550pb. O genótipo *BB* foi determinado pela presença de um único fragmento com aproximadamente 1500pb. Indivíduos heterozigotos

(AB) apresentaram três fragmentos de restrição com aproximadamente 1500, 950 e 550pb (Figura 2).

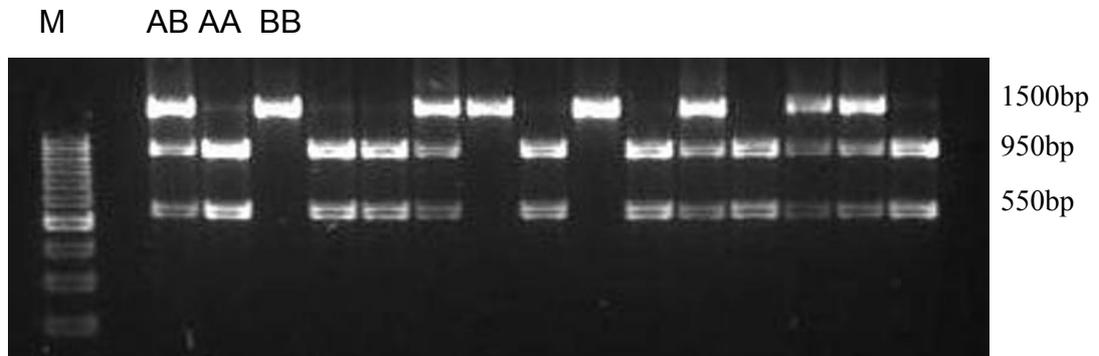


Figure 2 – Polimorfismo RFLP produzido pela enzima de restrição *XmnI* no gene bovino *CAST*. M = 100pb padrão de peso molecular; AA = genótipo caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição com 950 e 550pb; BB = genótipo caracterizado pela presença de fragmento único 1500pb, AB = genótipo heterozigoto caracterizado pelos fragmentos 1500, 950 e 550pb

As freqüências alélicas e genótípicas para os dois genes estudados estão detalhadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Freqüências alélicas dos polimorfismos de *CAPN1* e *CAST* nos cinco grupos genéticos e na amostra como um todo. Botucatu, 2007.

Polimorfismos	Alelos	Grupo Genético					Total
		N n=46	RG x N n=26	C n=41	B Tricross N=19	PS Tricross n=15	
<i>CAPN1/Psyl</i>	A	0,152 ^{A;b}	0,385 ^{A;ab}	0,220 ^{A;b}	0,263 ^{A;b}	0,367 ^{A;ab}	0,248
	G	0,848 ^{A;a}	0,615 ^{A;ab}	0,780 ^{A;a}	0,737 ^{A;a}	0,633 ^{A;ab}	0,752
<i>CAST/XmnI</i>	A	0,663 ^{A;a}	0,712 ^{A;a}	0,622 ^{A;a}	0,789 ^{A;a}	0,800 ^{A;a}	0,690
	B	0,337 ^{A;b}	0,288 ^{A;b}	0,378 ^{A;a}	0,211 ^{A;b}	0,200 ^{A;b}	0,310

n = número de indivíduos no grupo. N = Nelore; RG x N = Rubia Gallega x Nelore; C = Canchim; B Tricross = Brangus Tricross; PS Tricross = Pardo Suíço Tricross.

^{A, B} caracteres diferentes significam freqüências alélicas diferentes entre os grupos ($P < 0,05$).

^{a, b} caracteres diferentes significam freqüências alélicas diferentes dentro do grupo ($P < 0,05$).

O polimorfismo *CAPN1/Psyl* foi identificado nos cinco grupos genéticos, sendo, portanto, informativo para animais *Bos indicus* e cruzados *Bos taurus* X *Bos indicus*. Não foi encontrada diferença significativa nas frequências dos alelos A e G para o polimorfismo *CAPN1/Psyl* entre os grupos estudados.

O polimorfismo *CAST/Xmnl* foi também identificado nos cinco grupos genéticos estudados, distinguindo os indivíduos. A frequência alélica para A e B foi similar em todos os grupos estudados, apesar das diferentes formações genéticas com maior ou menor influência *Bos taurus*. O alelo B foi menos frequente nos grupos genéticos, exceto para o Camchim, quando comparado à ocorrência do alelo A (Tabela 1).

A distribuição dos genótipos nos grupos está relacionada à segregação observada para os alelos. Apenas o grupo de animais Tricross Pardo Suíço não apresentou indivíduos com uma das possibilidades genótípicas para o gene *CAST* (BB).

Tabela 2 - Frequências genótípicas para os polimorfismos de *CAPN1* e *CAST* em cinco grupos genéticos e na amostra como um todo. Botucatu, 2007.

Polimorfismos	Genótipo	Grupo Genético					Total
		N	RG x N	C	B Tricross	PS Tricross	
		N=46	n=26	n=41	n=19	N=15	
<i>CAPN1/Psyl</i>	AA	0,022	0,115	0,122	0,105	0,200	0,095
	AG	0,261	0,538	0,195	0,316	0,333	0,306
	GG	0,717	0,346	0,683	0,579	0,467	0,599
<i>CAST/Xmnl</i>	AA	0,500	0,538	0,512	0,623	0,600	0,537
	AB	0,326	0,346	0,220	0,316	0,400	0,306
	BB	0,174	0,115	0,268	0,053	0,000	0,156

n = número de indivíduos no grupo. N = Nelore; RG x N = Rubia Gallega x Nelore; C = Canchim; B Tricross = Brangus Tricross; PS Tricross = Pardo Suíço Tricross.

A média dos quadrados mínimos e o desvio padrão das características fenotípicas estudadas estão apresentados na tabela 3, considerando os valores obtidos para cada grupo genotípico. Para o polimorfismo *CAPN1/Psyl* apenas os

genótipos *AG* e *GG* foram considerados e não foi observado efeito significativo na associação do genótipo com *FC* ($p=0,9557$), *MFI* ($p=0,5645$) ou *AOL* ($p=0,2712$). Para caracterizar os efeitos de *CAST/Xmnl*, os genótipos foram avaliados em pares. O genótipo *AA* não apresentou significância no efeito sobre *FC* ($p=0,679$) e *AOL* ($p=0,9092$), mas foi favorável no valor de *MFI* ($p=0,0444$), quando comparado ao *AB*. Contudo ao se comparar os genótipos *AA* e *BB* não houve diferença quanto aos valores de *FC* ($p=0,5938$), *MFI* ($p=0,8637$) ou *AOL* ($p=0,8391$). O mesmo ocorreu na comparação de *AB* com *BB*, na qual não houve associação entre os genótipos e *FC* ($p=0,9244$), *MFI* ($p=0,5339$) ou *AOL* ($p=0,9624$).

Tabela 3 – Média dos quadrados mínimos e desvio padrão das características fenotípicas para os genótipos de *CAPN1/Psyl* e *CAST/Xmnl*. Botucatu, 2007.

Locus	Genótipo	Características da Carne ¹		
		FC(Kg)	MFI	AOL (cm ²)
<i>CAPN1/Psy I</i>	<i>AG</i>	3,78±1,01	67,72±17,22	69,77±11,50
	<i>GG</i>	3,77±0,96	69,63±18,16	68,08±91,96
<i>CAST/Xmn I</i>	<i>AA</i>	3,81±1,00	70,66±17,65 ^a	68,34±94,77
	<i>AB</i>	3,93±1,04	63,44±15,49 ^b	68,93±10,57
	<i>BB</i>	4,02±0,84	68,41±19,28 ^{a,b}	69,51±10,20

¹FC = força de cisalhamento; MFI = Índice de Fragmentação Miofibrilar, AOL = área de olho de lombo. ^{a,b} caracteres diferentes representam diferença significativa de valores $p<0,05$.

5.5 DISCUSSÃO

Identificado por Page et al. (2002), o polimorfismo do gene *CAPN1* aqui estudado representa a troca de um nucleotídeo de base guanina (alelo *G*) por um de base adenina (alelo *A*). Tal substituição corresponde a troca de valina por isoleucina no códon 530 do Domínio III da enzima calpaína, a qual pode alterar o arranjo e a estabilidade da proteína e como consequência ocasionar mudanças fenotípicas. Posteriormente, Rincón e Medrano (2006) descreveram o método PCR-RFLP para detectar esse polimorfismo inferindo à análise repetibilidade e menor custo.

No presente trabalho, a frequência do alelo *A* (24,8%) para amostra de animais como um todo foi semelhante aos 30% encontrados por Page et al. (2002), apesar destes autores terem trabalhado apenas com animais *Bos taurus* (Angus, Hereford, Pinzgauer, Red Poll e Jersey). Page et al. (2002) declararam que o alelo *A* codificador de isoleucina se associa a menor maciez da carne (valores mais altos de FC). Dois anos depois esses achados foram confirmados em estudo com 926 animais *Bos taurus* (cruzamentos de várias raças, representando duas populações) no qual as frequências de *A* foram 37% e 28%. Fortes associações ($p=0,02$ e $p=0,04$) entre os genótipos de *CAPN1/PSyl* e os valores de FC foram relatadas (PAGE et al., 2004).

No presente estudo estas associações do polimorfismo de *CAPN1* e as características relacionadas à maciez da carne (FC e MFI) não foram encontradas. O contraste entre os resultados pode ser explicado pelo fato de Page et al. (2002, 2004) trabalharem apenas com gado *Bos taurus*, enquanto no presente experimento foram utilizados animais *Bos indicus* e respectivos cruzamentos. Por outro lado, Costello et al. (2007) que trabalharam com animais cruzados, corte e leite, amostrados em abatedouros comerciais da Irlanda (provavelmente *Bos taurus*), descreveram uma menor frequência do alelo *A* (11,7%), e não encontraram associação entre o polimorfismo e os valores de FC.

O polimorfismo do gene *CAST* estudado foi identificado por Chung et al. (2001) com o método da PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *XmnI*. Este polimorfismo está localizado no íntron 6 e consiste de duas formas alélicas (*A* e *B*) que podem representar uma troca de nucleotídeos desconhecida. A frequência do alelo *A* de *CAST*, considerando todos os indivíduos foi 69% e a do alelo *B* foi 31%, números estes comparáveis aos de Chung et al. (2001) para animais da raça Angus (*Bos taurus*) – *A* (75%) e *B* (25%). A distribuição dos genótipos de *CAST* e *CAPN1* segue a observada para os alelos. A ausência do genótipo *BB* (*CAST*) no Tricross Pardo Suíço, provavelmente se explica pelo número limitado de animais deste grupo genético (15 indivíduos) e não significa que tal cruzamento seja incapaz de gerar indivíduos *BB*.

Embora haja semelhança quanto às frequências alélicas encontradas, a associação positiva entre *AA* e MFI descrita no presente estudo indica incoerência com os achados de Chung et al. (2001), pois estes autores afirmam que os genótipos não explicaram a variação na maciez da carne. Uma vez mais a diferença

nos resultados entre os trabalhos pode resultar da diferença entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus* no tocante a utilidade de cada marcador genético.

A descrição da ocorrência do polimorfismo *CAST/Xmnl* e de sua associação com MFI em *Bos indicus* são achados inovadores, apesar do polimorfismo neste gene ter sido descrito em 2001. Em função de sua localização em um íntron, o polimorfismo *CAST/Xmnl* foi depreciado pela comunidade científica e não foram realizados mais estudos de associação, após sua descoberta. Isto se deve à concepção anterior na qual íntrons eram considerados menos importantes, “*trash DNA*”, porém novas descobertas estão mudando esse conceito. Aparentemente, íntrons codificadores de RNAs com importante função de regular a transcrição gênica são muito mais comuns do que se pensava (NAKAYA et al., 2007). Isto pode reascender o otimismo e o interesse com relação a uma série de polimorfismos intrônicos já descritos.

É interessante notar que o polimorfismo *CAST/Xmnl* pode ter efeito sobre MFI, mas não foi correlacionado com FC, apesar destas duas análises de carne estarem associadas à maciez. Uma possível explicação para tais achados advoga que o Índice de Fragmentação Miofibrilar mensura mais diretamente a degradação protéica *postmortem* (HOPKINS et al., 2000), em outras palavras, avalia o resultado combinado entre a atividade das enzimas calpaínas e calpastatína.

Hipóteses sugeridas anteriormente na literatura relatam a possibilidade de haver desequilíbrio de ligação entre o gene *CAPN1* e genes ao seu redor possivelmente associados às características ligadas ao desenvolvimento o que encoraja a tentativas de relacionar os dois polimorfismos estudados com AOL. Polimorfismos do gene *CAPN1* foram associados com rendimento de cortes na carcaça em diversas raças de *Bos taurus* (JUSZUK-KUBIAK et al., 2004) e com altura de cupim em gado Brahman, *Bos indicus* (CASAS et al., 2005). Todavia, os resultados do presente trabalho não favorecem esta idéia uma vez que não houve associação entre *CAPN1* ou *CAST* e Área de Olho de Lombo.

Muitos outros polimorfismos dos genes codificadoras de calpaína e calpastatína foram identificados e um número relevante de estudos mostra a associação entre genótipos e características relevantes para qualidade da carne. Costello et al. (2007) e Page et al. (2002,2004) pesquisaram em grandes números de animais *Bos taurus* a substituição de guanina por citosina, no éxon 9 do gene *CAPN1*, que se mostrou relacionada aos valores de FC. Em estudo com diferentes

raças *Bos taurus*, *CAPN1 C4685T* (AF248054) teve efeito sobre o rendimento de cortes na carcaça (JUSZCZUK-KUBIAK et al., 2004). Schenkel et al. (2006) descreveram o polimorfismo *CAST/Rsal* e observaram efeito sobre FC e também certa tendência a influenciar a AOL.

Casas et al. (2006) estudaram três grupos genéticos para descobrir que o polimorfismo de *CAST* descrito anteriormente por Barendse (2002) teve efeito significativo sobre FC e que o polimorfismo *CAPN1 C6545T* (AF248054) teve efeito sobre o escore de maciez (avaliação por painel sensorial). Estes resultados refletem achados de dois grupos genéticos um *Bos taurus* e outro *Bos taurus* com influência *Bos indicus* (cruzamentos com Brahman), mas no mesmo estudo não foram encontradas associações significativas para o terceiro grupo genético constituído por animais Brahman puros (*Bos indicus*).

Decorre do estudo de Casas et al. (2006) que alguns marcadores encontrados nos genes *CAPN1* e *CAST* não são adequadamente associados aos alelos funcionais em *Bos indicus*, pois não estão em desequilíbrio de ligação com o marcador que ocasiona a variação fenotípica. Portanto, marcadores adicionais precisam ser desenvolvidos e os resultados aqui apresentados sugerem que *CAST/Xmnl* poderia ser, depois de mais estudos comprobatórios, incorporado em painéis de seleção assistida por marcadores para maciez da carne em *Bos indicus* puros ou cruzados com *Bos taurus*.

Os resultados contrastantes relatados no presente trabalho e na literature sugerem que os polimorfismos *CAPN1/Psyl* e *CAST/Xmnl* não são diretamente responsáveis pelas variações fenotípicas. Ainda, as contradições podem ser explicadas pela perda de associação entre o marcador e o QTL ao longo de gerações (recombinação homóloga), por diferença nas interações epistáticas encontradas em cada população, pela magnitude do efeito do gene candidato ou mesmo pelo delineamento experimental e estatístico de cada estudo.

A maciez da carne (avaliada pelas medidas de FC e MFI) e a Área de Olho de Lombo são características complexas que podem ser explicadas apenas pelo efeito combinado das influências de vários genes (herança poligênica). Em cada população bovina, a contribuição de determinado gene relacionado às características de interesse para produção animal deve ser cuidadosamente avaliada antes de sugerir a sua utilização em programas de seleção assistida por marcadores.

Embora ofereça evidências interessantes, uma amostra de tamanho limitado pode dificultar a avaliação de associações entre genótipo e fenótipo. Populações que possibilitaram as primeiras descobertas de marcadores para qualidade da carne bovina eram formadas por 400 a 500 animais e mesmo este número ainda foi considerado pequeno para gerar a credibilidade adequada para comercialização dos marcadores (VAN EENENNAM et al., 2007). Os mesmos autores alertam para a importância e dificuldade de se ter dados fenotípicos, especialmente para características de difícil mensuração ou mensuradas tardiamente. Assim, sempre que se têm disponíveis dados fenotípicos (tais como FC, MFI e AOL) é desejável realizar estudos de associação com os potenciais marcadores.

Concluindo, os resultados aqui apresentados sugerem que o polimorfismo *CAPN1/Psyl* pode ser insuficiente para se adequar à seleção assistida por marcadores no gado Nelore e seus cruzamentos e que o polimorfismo *CAST/Xmnl* merece ser mais investigado, uma vez que este é o primeiro relato de ocorrência em *Bos indicus* e que *CAST/Xmnl* teve efeito sobre os valores de MFI.

5.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer a infraestrutura para o estudo e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

6 CAPÍTULO 2 – *LEP*, *TG* e *DGAT1*

O capítulo a seguir se apresenta no formato de artigo cuja versão em inglês será enviada para correção e apreciação dos assessores da revista *Genetics and Molecular Biology*.

6.1 RESUMO

Leptina, tiroglobulina e diacilglicerol O-aciltransferase desempenham papéis importantes no metabolismo de gordura e no balanço energético. A deposição de gordura, intramuscular ou subcutânea, influencia na qualidade da carne e na preferência dos consumidores. Determinar a frequência alélica e genotípica de polimorfismos dos genes codificadores de leptina (*LEP*), tiroglobulina (*TG*) e diacilglicerol O-aciltransferase (*DGAT1*) bem como estudar a associação destes polimorfismos com características fenotípicas ligadas à deposição de gordura e qualidade da carne foram os objetivos do presente estudo. Cento e quarenta e sete bovinos foram genotipados, incluindo Nelore (*Bos indicus*), Canchim ($5/8Bos\ taurus + 3/8Bos\ indicus$), Rubia Gallega X Nelore ($1/2Bos\ Taurus + 1/2Bos\ indicus$), Brangus Tricross ($9/16Bos\ taurus + 7/16Bos\ indicus$) e Pardo Suíço Tricross ($3/4Bos\ taurus + 1/4Bos\ indicus$). Espessura de Gordura Subcutânea, Lipídeos Totais (intramuscular), Marmorização, Área de Olho de Lombo e Força de Cisalhamento foram mensuradas para cada animal e avaliadas pelo procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa SAS. As médias dos quadrados mínimos obtidas para cada genótipo foram comparadas pelo teste de Tukey. As frequências alélicas variaram entre os grupos genéticos dependendo da maior ou menor influência genética *Bos taurus* em cada grupo. O polimorfismo de *LEP* segregou em animais *Bos indicus* puros, Nelore (primeiro relato). O alelo *T* de *TG* apareceu fixado em Nelore e os alelos de *DGAT1* segregaram em todos os grupos, mas o alelo *A* foi menos frequente em animais Nelore. Os resultados não mostraram associações entre os polimorfismos e as características fenotípicas estudadas. Marcadores capazes de indicar características de interesse desenvolvidos em *Bos taurus* podem ser insuficientes para *Bos indicus*.

Palavras-chave: Polimorfismos. Gene candidato. Deposição de gordura. Gado de corte.

6.2 INTRODUÇÃO

A melhoria na relação entre desenvolvimento de tecido magro e deposição de gordura significa melhor conversão alimentar, menor custo à pecuária e menor pressão nos recursos mundiais de alimentos (SILLENCE, 2004). A marmorização da carne associada à deposição de gordura intramuscular interfere com hábitos de consumo e preço da carne (KILINGER et al., 2004). Controlar a deposição de gordura subcutânea é importante para qualidade da carcaça e a Espessura de Gordura Subcutânea (EGS) foi fortemente associada ao rendimento de carcaça (TAIT et al., 2005). Por último, mas não menos importante, a deposição de gordura pode interferir com a percepção de maciez da carne (CROUSE et al., 1989). Trabalhar tais questões através da seleção de animais superiores se tornou uma promessa da biologia molecular desde que polimorfismos gênicos foram associados às características de interesse para bovinocultura e disponibilizados comercialmente (BARENDSE, 1997; DEKKERS, 2004; RINKER et al., 2006; VAN EENENNAAM et al., 2007).

O gene *LEP* codifica a leptina, proteína com 16-kDa produzida por adipócitos e implicada na regulação da ingestão de alimentos, no balanço energético, e na eficiência reprodutiva (HOUSEKNECHT et al., 1998). A concentração plasmática de leptina foi relacionada com a deposição de gordura em bovinos (GEARY et al., 2003) e o gene *LEP* pôde ser associado ao microsatélite *BM1500* relacionado ao conteúdo de gordura em carcaças (FITZSIMMONS et al., 1998). Stone et al. (1996) mapeou o gene *LEP* no cromossomo 4 e desde então muitos polimorfismos foram descritos e associados a diversas características de interesse, desde deposição de gordura à fertilidade (BARENDSE, 2005; BUCHANAN et al., 2002; POMP et al., 1997; SCHENKEL et al., 2005; VAN DER LENDE et al., 2005).

O gene *TG* codifica tiroglobulina, o precursor de triiodotironina (*T3*) e tetraiodotironina (*T4*) que são sinais para o desenvolvimento celular de adipócitos (AILHAUD et al., 1992; DARIMONT et al., 1993). Espera-se que a EGS bem como a porcentagem de gordura nos tecidos e no leite seja influenciada por polimorfismos de *TG* uma vez que as iodotironinas afetam a diferenciação de adipócitos e os níveis de *T3* e *T4* estão associados com a porcentagem de gordura no leite (FOLLEY; MALPRESS, 1948). De Martynoff et al. (1987) e Parma et al. (1987) revelaram a

seqüência do gene *TG* e posteriormente polimorfismos foram descritos (BARENDSE, 1999; GEORGES et al., 1987). O gene *TG* também pode ser considerado candidato posicional, pois foi mapeado no cromossomo 14 em bovinos, onde e associado ao marcador *CSSM66* conhecido por sua relação com a marmorização da carne (BARENDSE, 1997). Vários estudos de associação entre marcadores localizados no gene *TG* e a marmorização da carne foram realizados, entretanto os resultados são contraditórios (BARENDSE et al., 2004; CASAS et al., 2005; RINKER et al., 2006; VAN EENENNAAM et al., 2007).

O gene diacilglicerol O-aciltransferase 1 (*DGTA1*) codifica a enzima catalisadora da reação entre diacilglicerol e acil-CoA. Tal reação representa a etapa final da síntese de triglicérides, um dos principais componentes da gordura. A enzima codificada por *DGTA1* regula a taxa de triglicérides nos adipócitos (COLEMAN; BELL, 1976) e foi associada a homeostase energética (HAVEL, 2001). Estudos de associação consolidam o gene *DGTA1* como candidato a apresentar marcadores para características vinculadas à deposição de gordura (KÜHN et al., 2004; THALLER et al., 2003; TANTIA et al., 2006). Em função dos quesitos fisiológicos é possível a classificação do *DGTA1* como candidato funcional. Recentemente, a freqüência do polimorfismo *DGAT1/Cfr1* para animais *Bos indicus* brasileiros foi publicada (LACORTE et al., 2006).

Algumas publicações geraram conflito por não encontrar relação entre os genes e a deposição de gordura (RINCKER et al., 2006). Além disso, a maioria dos estudos mencionados foi realizada com animais *Bos taurus*. Assim, o valor como possíveis indicadores para características de interesse e a segregação dos genes *LEP*, *TG*, *DGAT1* precisa ser confirmada em animais *Bos indicus* (Nelore puro e cruzado).

Os objetivos do presente estudo foram estimar a freqüência alélica e genotípica de polimorfismos pontuais (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) detectados nos genes *LEP*, *TG* e *DGAT1*, bem como verificar a associação de seus genótipos com Lipídeos Totais (intramuscular – LT), Espessura de Gordura Subcutânea (EGS), Marmorização, Área de Olho de Lombo (AOL) e Força de Cisalhamento (FC) em gado de corte. Os polimorfismos escolhidos foram *LEP/Kpn21* (BHUCHANAN et al., 2002), *TG/Psul* (THALLER et al., 2003) e *DGAT1/Cfr1* (LACORTE et al., 2006; WINTER, 2002).

6.3 MATERIAL E MÉTODO

A seguir segue breve descrição da metodologia utilizada na obtenção dos dados fenotípicos e genotípicos bem como da análise estatística.

6.3.1 Animais

O estudo incluiu animais das raças Nelore e Canchim, além de cruzamentos que utilizam matrizes Nelore na base da formação, constituindo cinco grupos genéticos diferentes. Dentre os 147 animais genotipados, 46 foram da raça Nelore – N – (*Bos indicus*), 41 Canchim – C – ($5/8$ *Bos taurus* + $3/8$ *Bos indicus*), 19 Brangus Tricross – B Tricross – ($9/16$ *Bos taurus* + $7/16$ *Bos indicus*) e 15 Pardo Suiço Tricross – PS Tricross – ($3/4$ *Bos taurus* + $1/4$ *Bos indicus*). Estes animais foram terminados na unidade experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brasil. Esse gado foi amostrado entre quatro fazendas e o sistema de criação utilizado na unidade experimental universitária foi anteriormente detalhado por Silveira et al. (2000). Outros 26 animais do cruzamento Rubia Gallega X Nelore ($1/2$ *Bos Taurus* + $1/2$ *Bos indicus*) foram amostradas de um sistema semi-intensivo de criação. Todos os animais foram abatidos entre 15 e 19 meses de idade.

Após abate humanitário, em frigoríficos colaboradores, as carcaças foram identificadas e refrigeradas por 24 horas, período seguido pela remoção de amostras (filés) de 2,50cm de largura do músculo *Longissimus dorsi* (LD) entre a 12^a e a 13^a costelas da hemi-carcaça esquerda. A Área de Olho de Lombo, também conhecida como área do *Longissimus dorsi*, foi mensurada no abatedouro pelo método do quadrante descrito pelo sistema *USDA Quality Grade* (1989). As amostras foram embaladas a vácuo e maturadas sob refrigeração (1 a 2°C) até 14 dias *postmortem* e foram, então, congeladas até que as análises pudessem ser realizadas.

6.3.2 Características Fenotípicas

As análises dos demais dados fenotípicos – Marmorização da carne (M), Lipídeos Totais (intramuscular, LT), Espessura de Gordura Subcutânea (EGS) e Força de Cisalhamento (FC) – foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu-SP, Brasil, conforme descrito abaixo.

A marmorização foi avaliada visualmente (escores subjetivos de 1 a 5) segundo metodologia descrita previamente (AUS-MEAT LIMITED, 2001). A espessura de Gordura Subcutânea (EGS) foi mensurada com um paquímetro seguindo metodologia descrita pelo *USDA Quality Grade* (1989). Os Lipídeos Totais foram avaliados pelo método de Bligh e Dyer (1959). Em poucas palavras, este método consiste em retirar, moer e pesar 3 a 5g de carne de cada amostra individual de *Longissimus dorsi*, desprovida de qualquer tecido adiposo ou conectivo visível. Clorofórmio e Metanol foram adicionados à amostra de carne moída e homogeneizados por 30 minutos, para extração dos lipídeos. A suspensão foi centrifugada (1.000g) para separar a fase hidrofílica (descartada), a sólida (descartada) e a hidrofóbica (volume mensurado). Desta fase hidrofóbica 5mL foram transferidos para beakers previamente pesados, os quais foram colocados para secar em estufa durante a noite (20°C). O conteúdo de lipídeos foi calculado pela diferença de peso do Becker após a secagem da suspensão hidrofóbica. Foram feitas duplicatas das avaliações de Lipídeos Totais para cada animal.

A força de cisalhamento foi determinada de acordo com Wheeler et al. (1995). Em poucas palavras, as amostras de carne congeladas foram descongeladas sob refrigeração (4°C por 24 horas), até que a temperatura interna atingisse 5 a 6°C. As amostras foram então cozidas até que a temperatura interna atingisse 71°C e depois foram resfriadas durante 24 horas (5 a 6°C), antes da retirada de seis (6) a oito (8) cilindros de cada amostra. Os cilindros apresentavam 1,27cm de diâmetro e eram paralelos à orientação das fibras musculares. Os cilindros foram cortados pelo equipamento Warner-Bratzler com 25Kg de capacidade, à velocidade padronizada de 20cm/minutos. Foi calculada a média dos valores obtidos para os cilindros de cada amostra e esta média correspondeu ao número utilizado nas análises estatísticas.

6.3.3 Extração de DNA e genotipagem

Inicialmente, procedeu-se a maceração em nitrogênio líquido de 250mg de carne retiradas das amostras do músculo *Longissimus dorsi*, cada amostra representando um indivíduo.

A extração do DNA foi realizada por método não fenólico, baseado na digestão com protease K e precipitação com NaCl e álcool (SAMBROOCK, 1989). Cada solução de DNA foi checada quanto à concentração e à integridade e depois diluída para concentração de trabalho (10ng/uL) e armazenada a -20°C até a genotipagem.

Os animais foram genotipados para os polimorfismos dos genes *LEP*, *TG* and *DGAT1* pela reação da polimerase em cadeia seguida pela restrição enzimática originando variação nos tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos. Tal técnica é conhecida pelo termo em inglês: *polymerase chain reaction – restriction length polymorphism* (PCR-RFLP). Os alelos *C* e *T* de *LEP* foram determinados pela amplificação de fragmentos no éxon 2, seguida pela digestão com a enzima de restrição *Kpn2I*, conforme descrito por Buchanan et al. (2002). Para a determinação dos alelos *C* e *T* de *TG*, um fragmento com 548pb localizado na região não codificadora 5' foi amplificado e digerido com a enzima *PsuI*, método descrito por Thaller et al. (2003). Os alelos *A* e *K* de *DGAT1* foram identificados pela amplificação de um fragmento com 411pb, correspondente ao éxon 8, seguida da digestão com *CfrI*, de acordo com trabalho de Lacorte et al. (2006).

Depois da digestão dos produtos amplificados dos genes *LEP*, *TG* e *DGAT1*, os fragmentos de DNA foram separados em geis de agarose 3,5%, 2% e 2%, respectivamente. O sistema de eletroforese utilizado foi horizontal. Os fragmentos de DNA foram visualizados no gel em função do uso de brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A imagem de cada gel foi fotografada por um sistema digital de fotodocumentação para posterior análise. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado pela comparação com um marcador, padrão de peso molecular de 100pb. Genótipos individuais foram determinados para cada polimorfismo pela análise do tamanho dos fragmentos descritos pelo número de pares de bases.

6.3.4 Análise estatística

Freqüências alélicas e genóticas foram calculadas de acordo com Weir (1990). Diferenças nas freqüências alélicas dos polimorfismos dentro e entre os cinco grupos genéticos foram determinadas pelo método de Goodman adaptado por Curi e Moraes (1981).

As características de interesse foram analisadas utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999). O modelo linear utilizado para analisar as características quantitativas considerou, adicionalmente ao efeito de grupo genético, a interação entre grupos genéticos e grupos contemporâneos da seguinte forma: $Y_{ijk} = \mu + G_i + GGC_j + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} = característica de produção (fenótipo), μ = média geral, G_i = efeito fixo do genótipo ($i = 1,2,3$), GGC_j = efeito fixo da interação grupo genético e grupo contemporâneo ($j = 1, \dots, 9$), e e_{ijk} = erro aleatório. O critério para composição dos grupos contemporâneos incluiu as variações de sexo, idade ao abate, confinamento e fazenda de origem. Genótipos com freqüência muito baixa (abaixo de 10%) na amostra total de indivíduos ou grupos genéticos com apenas um genótipo não foram incluídos na análise para evitar resultados não confiáveis. Pela mesma razão, quando a maioria dos animais (> 80%) em um dos genótipos era do mesmo grupo genético, o genótipo foi excluído por completo da análise. O efeito de touro não foi incluído no modelo linear, pois havia número muito pequeno de animais na amostra originários de um mesmo touro. A possibilidade de confundir o efeito do genótipo com o efeito do touro sobre as características fenotípicas estudadas foi reduzida devido ao grande número de famílias de meio-irmãos.

6.4 RESULTADOS

As variantes alélicas do gene *LEP* (*C* e *T*) foram observadas em todos os cinco grupos genéticos. Os dois fragmentos, originados pela restrição, 75 e 19pb foram observados na presença do alelo *C* e o alelo *T* foi determinado pela presença de fragmento intacto com 94pb. Indivíduos heterozigotos apresentaram os três

tamanhos de fragmentos 94, 75 e 19pb (Figura 4). Os grupos genéticos com maior influência *Bos indicus* (Nelore e Rubia Gallega X Nelore) apresentaram frequência menor do alelo *T* (4,3 e 7,7%) em comparação ao grupo Camchim (39%), mas não diferenciaram do Brangus Tricross (26,3%) e do Pardo Suíço Tricross (20%). Nenhum indivíduo com genótipo *TT* foi encontrado nestes grupos.

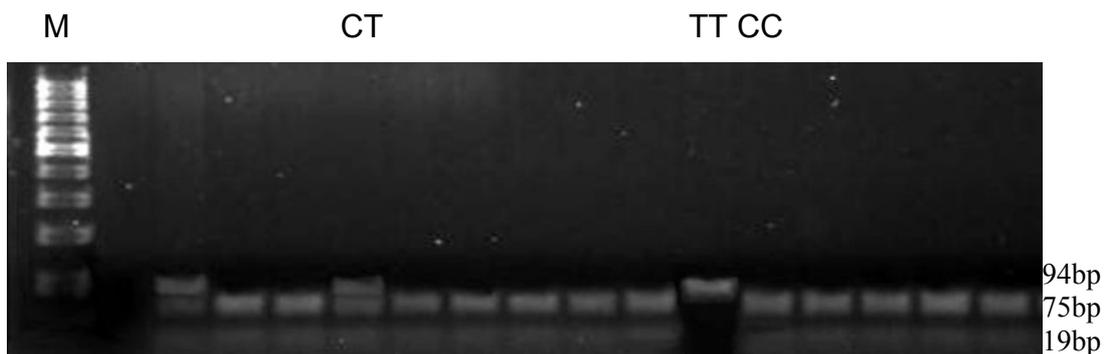


Figura 4 – Polimorfismo RFLP produzido pela restrição com a enzima *Knp2I* no gene bovino *LEP*. M = 100pb padrão de peso molecular; CC = genótipo caracterizado pela presença de fragmentos com 75 e 19pb; TC = heterozigotos caracterizados pela presença de fragmentos com 94, 75 e 19pb; TT = genótipo caracterizado pela presença de um fragmento com 94bp

As duas formas alélicas do gene *TG* foram encontradas: *C* (fragmentos de restrição com 295 e 178pb) e *T* (fragmento com 473pb, produto intacto da PCR). Alelos *C* e *T* do gene *TG* (Figura 5) foram encontradas na maioria dos grupos genéticos, mas apenas o alelo *C* foi encontrado nos animais Nelore resultado na ocorrência de um genótipo único para esses animais (*CC*). O grupo genético fruto do cruzamento Rubia Gallega X Nelore apresentou frequência muito baixa do alelo *T* (1,9%). Não houve diferença da segregação deste polimorfismo entre os grupos N, RG x N e B Tricross. A ocorrência do alelo *T* aumentou conforme o acréscimo de influência *Bos taurus* em cada grupo: Brangus Tricross (15,8%), Canchim (22%) e Pardo Suíço Tricross (33,3%).

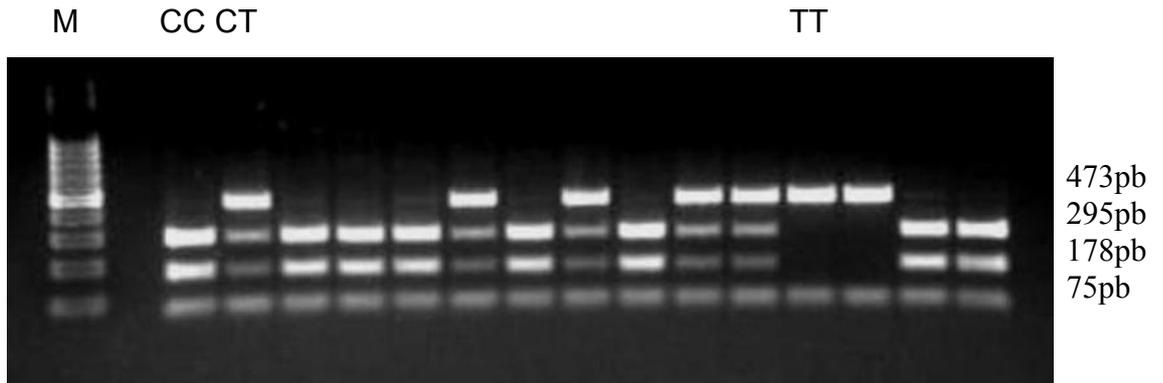


Figure 5 – Polimorfismo RFLP ocasionado por restrição com a enzima *Pst*I do gene bovino *TG*. M = 100bp padrão de peso molecular; CC = genótipo caracterizado pela presença de fragmentos com 178 e 295pb; CT = heterozigotos caracterizados pela presença de três fragmentos 473, 178 e 295pb; TT = genótipo caracterizado pela presença de um fragmento com 473pb

Os alelos do gene *DGAT1* (*K* e *A*) segregaram em todos os cinco grupos. Quando apenas o alelo *K* estava presente identificou-se um fragmento de 411bp, correspondente ao produto intacto da amplificação. Na presença do alelo *A* estava presente uma banda, a qual representa dois fragmentos de restrição descritos em trabalhos anteriores (208 e 203bp). Indivíduos heterozigotos foram identificados pela presença de fragmentos com os três tamanhos 411, 208 e 203pb (Figura 6). O alelo *A* foi marcadamente menos freqüente em animais da raça Nelore, os quais apresentaram apenas 5,4% de *A* em comparação ente 53 e 67%, considerando os valores de todos os outros grupos.

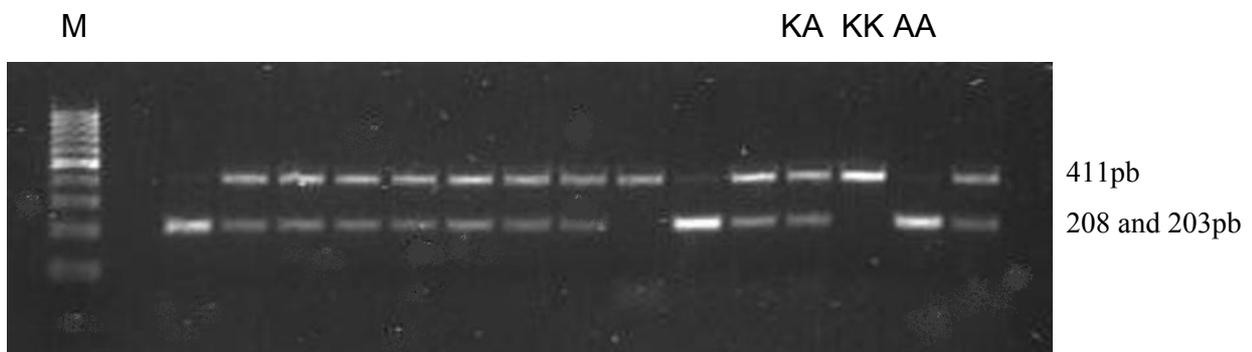


Figura 6 – Polimorfismo RFLP produzido pela restrição com a enzima *Cfr*I no gene bovino *DGAT1*. M = 100pb psdrão de peso molecular; AA = genótipo caracterizado pela presença de dois fragmentos com 203 e 208pb; KA = heterozigotos caracterizados por três fragmentos 411, 203 e 208pb; KK = genótipo caracterizado pela presença de um fragmento com 411pb

Freqüências alélicas e genotípicas descritas para os três polimorfismos, em cada grupo genético se encontram resumidas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Freqüências alélicas dos polimorfismo de *LEP*, *TG* e *DGTA1* nos cinco grupos genéticos e na amostra como um todo (Maio de 2007, Botucatu)

Polimorfismos Alelos	Grupo Genético					Total	
	N n=46	RG x N n=26	C n=41	B Tricross n=19	PS Tricross n=15		
<i>LEP/Kpn2l</i>	C	0,957 ^{A;a}	0,923 ^{A;a}	0,610 ^{B;ab}	0,737 ^{AB;a}	0,800 ^{AB;a}	0,810
	T	0,043 ^{B;b}	0,077 ^{B;b}	0,390 ^{A;ab}	0,263 ^{AB;b}	0,200 ^{AB;b}	0,190
<i>TG/PsuI</i>	C	1,000 ^{A;a}	0,981 ^{A;a}	0,780 ^{B;a}	0,842 ^{AB;a}	0,667 ^{B;ab}	0,881
	T	0,000 ^{B;b}	0,019 ^{B;b}	0,220 ^{A;b}	0,158 ^{AB;b}	0,333 ^{A;ab}	0,119
<i>DGAT1/CfrI</i>	K	0,946 ^{A;a}	0,462 ^{B;ab}	0,329 ^{B;b}	0,474 ^{B;ab}	0,367 ^{B;ab}	0,568
	A	0,054 ^{B;b}	0,538 ^{A;ab}	0,671 ^{A;a}	0,526 ^{A;ab}	0,633 ^{A;ab}	0,432

n equivale ao número de indivíduos em cada grupo genético. N = Nelore; RG x N = Rubia Gallega x Nelore; C = Canchim; B Tricross = Brangus Tricross; PS Tricross = Pardo Suíço Tricross.

^{A, B} Letras distintas significam diferença na freqüência alélica entre grupos genéticos ($P < 0.05$).

^{a, b} Letras distintas significam diferença na freqüência alélica dentre cada grupo genético ($P < 0.05$).

O polimorfismo do gene *LEP* foi informativo em todos os grupos genéticos, embora o número de indivíduos que apresentou o alelo menos freqüente (*T*) foi reduzido entre os animais *Bos indicus* (Nelore). O polimorfismo do gene *TG* não foi informativo para os animais *Bos indicus* (Nelore). O polimorfismo do gene *DGAT1* foi informativo em todos os grupos genéticos, mas dentre os indivíduos de genótipo *KK* mais de 80% foram do mesmo grupo genético, o Nelore.

Table 5 – Frequências genotípicas dos polimorfismos de *LEP*, *TG* e *DGTA1* nos cinco grupos genéticos e na amostra como um todo. Botucatu, 2007.

Polimorfismo	Genótipo	Grupo Genético					Total
		N n=46	RG x N n=26	C n=41	B Tricross n=19	PS Tricross n=15	
<i>LEP/Kpn2I</i>	CC	0,913	0,846	0,415	0,526	0,667	0,687
	CT	0,087	0,154	0,390	0,421	0,267	0,245
	TT	0,000	0,000	0,195	0,053	0,067	0,068
<i>TG/Psul</i>	CC	1,000	0,962	0,610	0,648	0,467	0,789
	CT	0,000	0,038	0,341	0,316	0,400	0,184
	TT	0,000	0,000	0,049	0,000	0,133	0,027
<i>DGAT1/CfrI</i>	KK	0,913	0,077	0,073	0,067	0,158	0,347
	KA	0,065	0,769	0,512	0,632	0,600	0,442
	AA	0,022	0,154	0,415	0,211	0,333	0,211

n equivale ao número de indivíduos em cada grupo genético. N = Nelore; RG x N = Rubia Gallega x Nelore; C = Canchim; B Tricross = Brangus Tricross; PS Tricross = Pardo Suíço Tricross.

A análise visual da Marmorização da carne se revelou ineficiente para os indivíduos da raça Nelore e para os cruzamentos estudados, animais abatidos em idade jovem, pois a variabilidade do escore foi muito baixa. A grande maioria dos animais apresentou escore 1 e apenas alguns poucos animais apresentaram escore 2. Assim, não foram feitos estudos de associação para esta característica. A média dos quadrados mínimos e o desvio padrão de cada característica fenotípica, referente a cada genótipo estão apresentadas na tabela 6.

Table 6 – Média dos quadrados mínimos e desvio padrão para características fenotípicas, valores encontrados nos grupos genotípicos dos polimorfismos *LEP/Kpn2I*, *TG/Psul* e *DGAT1/CfII* (Maio de 2007, Botucatu)

Características Fenotípicas					
Locus	Genótipos	EGS (cm)	LT	AOL (cm ²)	FC (Kg)
<i>LEP/Kpn2I</i>	CC	3,42±1,50	0,016±0,012	67,61±9,72	3,68±0,87
	CT	3,96±1,60	0,015±0,010	69,20±9,09	3,70±0,88
<i>TG/Psul</i>	CC	3,85±1,55	0,021±0,011	73,50±10,25	3,41±0,53
	CT	4,00±1,63	0,017±0,013	73,05±8,25	3,30±0,79
<i>DGAT1/CfII</i>	AA	3,19±1,76	0,017±0,012	69,76±10,39	3,64±0,75
	AK	3,43±1,46	0,016±0,012	70,19±10,69	3,42±0,72

EGS = Espessura de Gordura Subcutânea; LT= Lipídeos Totais; AOL = Área de Olho de Lombo.

Os genótipos *CC* e *CT* foram analisados no estudo de associação feito para o polimorfismo *LEP/Kpn2I*, mas nenhum efeito significativo foi encontrado para os fenótipos de EGS ($p=0,1038$), LT ($p=0,6298$), AOL ($p=0,3355$) e FC ($p=0,9189$). Para caracterizar os efeitos do polimorfismo *TG/Psul*, os genótipos *CC* e *CT* foram testados. Não houve efeito de genótipo (*TG/Psul*) para as características EGS ($p=0,7101$), LT ($p=0,2813$), AOL ($p=0,8044$) ou FC ($p=0,4361$). Para o polimorfismo *DGAT1/CfII* os genótipos *AA* e *AK* foram considerados e também não foram encontradas associações com as características pesquisadas: Espessura de Gordura Subcutânea ($p=0,5244$), Lipídeos Totais ($p=0,6293$), Área de Olho de Lombo ($p=0,8235$) ou Força de Cisalhamento ($p=0,2124$).

6.5 DISCUSSÃO

Em 1997, Pomp et al. (1997) descobrem um marcador RFLP no gene *LEP* utilizando a enzima *Sau3AI*, o qual segregava em inúmeras raças *Bos taurus*, mas era fixado em gado Brahman (*Bos indicus*). Bhuchanan et al. (2002) fizeram uso da enzima *Kpn2I* para revelar a substituição de citosina (C) por timina (T) no éxon 2 do gene *LEP*, animais das raças Angus, Hereford e Charolêsa (*Bos taurus*). Para tal substituição foi prevista a troca entre os aminoácidos argenina e cisteína

(AF120500). A frequência geral encontrada para os alelos de *LEP* por Buchanan et al. (2002) foi de 54% e 46% para os alelos *C* e *T*, respectivamente. Estes números são aparentemente distintos dos encontrados pelo presente estudo, ou seja, 81% para o alelo *C* e 19% para o alelo *T*. Tal diferença pode ser explicada pelo fato da literatura citada ter estudado apenas animais *Bos taurus*, enquanto o presente trabalho genotipou animais *Bos indicus* e cruzamentos entre *Bos indicus* e *Bos taurus*. Na verdade, mesmo entre animais *Bos taurus* as frequências alélicas podem variar dependendo da origem da raça. As raças britânicas apresentam maior frequência de *T*, enquanto nas continentais maior ocorrência de *C* (BUCHANAN et al., 2002).

Polimorfismos do gene da leptina foram associados com diversas características de importância econômica incluindo capacidade de ingestão alimentar, produção de leite e características de carcaça (VAN DER LENDE et al., 2005). Um estudo com *Bos tarus* (Angus, Charolais, Limousin and Simmental) descreveu associação entre polimorfismos do éxon 2 (*LEP*) e rendimento de tecido magro na carcaça (SCHENKEL et al., 2005). Geary et al. (2003) descobriram uma relação negativa entre concentrações plasmáticas de leptina e Área de Olho de Lombo, além disso, as concentrações de leptina foram associadas com classificação de carcaça e deposição de gordura (marmorização, espessura de gordura subcutânea, deposição de gordura em rim e coração, deposição de gordura pélvica), em cruzamentos entre raças *Bos taurus* (1/2 Angus + 1/4Charolais + 1/4Tarentaise). Nenhuma correlação foi encontrada entre Área de Olho de Lombo e *LEP* no presente estudo, o que contradiz os trabalhos anteriores.

A deposição de gordura foi afetada pelo genótipo e animais homozigotos para o alelo *T* produziram mais mRNA (expressão gênica da leptina) do que animais homozigotos para o alelo *C* em *Bos taurus* (BUCHANAN et al., 2002), mas resultados semelhantes não foram repetidos em *Bos indicus* puro ou cruzado (dados aqui apresentados). Os resultados aqui apresentados são consistentes com um estudo de associação que pesquisou 3129 indivíduos, incluindo diversas raças *Bos taurus* e 317 animais *Bos indicus* (Brahman), conduzido por Barendse (2005) que não encontrou associações entre o polimorfismo *LEP/Kpn21* e marmorização, espessura de gordura subcutânea, deposição de gordura total e intramuscular.

A deposição de gordura, especialmente gordura intramuscular, pode interferir com a percepção de maciez da carne (CROUSE et al., 1989). Estudo anterior mostra

associação entre *LEP* e maciez da carne (SCHENKEL et al., 2005). Por isso, testamos os efeitos dos polimorfismos de *LEP*, *TG* e *DGAT1* sobre a força de cisalhamento (estimativa mecânica da maciez da carne), mas nenhuma associação foi encontrada. De acordo com Crouse et al. (1989), escores mais altos para maciez foram obtidos em painéis sensoriais quando o conteúdo de gordura intramuscular ultrapassava 5%. No presente trabalho, os valores observados para os Lipídeos Totais (gordura intramuscular) não excederam 3%, o que pode ter dificultado a observação uma associação entre genótipo, deposição de gordura e maciez da carne.

O polimorfismo na região não codificadora 5' do gene *TG* foi patenteado por Barendse (1999) e é avaliado pela técnica PCR-RFLP com o uso da enzima *PvuII* que possibilita a distinção entre os alelos *C* e *T*. Nossos resultados mostraram que o alelo *T* é menos freqüente que o *C*. Resultados semelhantes – 22 a 25% de freqüência do *T* – foram descritos para animais *Bos taurus* (MOORE et al., 2003; THALLER et al., 2003). Pode-se pressupor que a influência da genética Nelore na raça Canchim e nos cruzamentos Tricross aumentou a variação na freqüência alélica do *T* (15 a 33%) em comparação aos números apresentados para *Bos taurus*. A freqüência baixa de *T* já havia sido relatada para animais *Bos indicus* na raça Brahman (CASAS et al., 2005), mas este é o primeiro registro de fixação do alelo *C* em animais Nelore.

Estudos anteriores relataram os efeitos do polimorfismo *TG/PvuII* sobre características de marmorização da carne (BARENDSE, 1999), EGS e AOL (CASAS et al., 2005); gordura intramuscular (THALLER et al., 2003); diferenças esperadas na progênie (DEP) para porcentagem de cortes de carne e para peso de carcaça (RINCKER et al., 2006). Além disso, Barendse (2004) sugeriu que *TG/PvuII* é uma mutação funcional, responsável por alterações fenotípicas associadas ao QTL e que *T* é o alelo favorável para a deposição de gordura intramuscular. Mesmo assim, resultados contraditórios têm sido publicados e os dados do presente trabalho concordam com aqueles que não encontraram associações entre o polimorfismo de *TG* e marmorização ou maciez da carne em *Bos indicus* (CASAS et al., 2005). Rincker et al. (2006) não encontraram associação entre o polimorfismo e a marmorização, a gordura intramuscular, a AOL ou a EGS em animais *Bos taurus* da raça Simental. Moore et al. (2003) não encontraram associação entre o polimorfismo e DEP relacionada a EGS em *Bos taurus*. A variação alélica entre *C* e *T* no gene *TG*

é avaliada comercialmente pelo painel de marcadores *GeneSTAR Quality Grade* (Genetic Solutions/Bovigen Pty. Ltd.) e o último estudo de validação confirmou a presença de *T* entre as carcaças dos tipos *Choice* ou *Prime*, embora não se tenha conseguido associar o marcador com Marmorização (VAN EENENNAM et al., 2007). No presente trabalho, a baixa frequência do alelo favorável (*T*) pode ter dificultado a associação do polimorfismo com as características fenotípicas, afinal apenas 4 animais pertenciam ao grupo *TT* (poucos dados fenotípicos para trabalhar).

Winter et al. (2002) descreveram o polimorfismo *DGAT1/Cfrl* (AW446985 – GRISART et al., 2004) como sendo uma alteração não conservativa de dois nucleotídeos GC para AA nas posições 10433 e 10434 (AJ318490). A alteração de nucleotídeos leva à substituição de lisina por alanina na proteína (K232A). Winter et al. (2002) associaram o alelo carreador da lisina ao maior conteúdo de gordura no leite, sugerindo ainda que o polimorfismo seria uma mutação funcional no QTL descrito para conteúdo de gordura no leite. Foi observado que a variante *K* era mais comum em vacas Jersey (cerca de 80% de frequência do alelo *K*), seguidas por vacas Holandesas e vacas da raça *Anatolian Black* (aproximadamente 35% de *K*) e por último em outras raças de corte, *Bos taurus* (inferiores a 20%). Estudos anteriores realizados em *Bos indicus* de corte mostraram o alelo *K* como sendo fixado nessas raças (TANTIA et al., 2006; WINTER et al., 2002) ou presente em frequência muito elevada (CASAS et al., 2005). Lacorte et al. (2006) mostraram em seus resultados que o alelo *K* estava fixado em animais Nelore e Guzerá (*Bos indicus*).

A novidade do presente trabalho está em revelar a ocorrência, em baixa frequência, do alelo *A* em animais Nelore (5,4%). Os animais cruzados (*Bos indicus* X *Bos taurus*) apresentaram 33 a 48% de frequência de *K*, um número intermediário entre os resultados encontrados em literatura (MOORE et al., 2003; WINTER et al., 2002) nas raças de corte *Bos taurus* e os resultados aqui mencionados para *Bos indicus*. A falta de associação entre o alelo *K* e maior Marmorização ou maior porcentagem de Lipídeos Totatis encontrada no presente trabalho não condiz com a literatura que considera o polimorfismo *DGAT1/Cfrl* como funcional para características relacionadas à deposição de gordura (GRISART et al., 2004). Mas, as discrepâncias de resultados entre animais com diferente base genética a respeito dos efeitos de *DGAT1/Cfrl* são conhecidas, pois o efeito significativo sobre gordura intramuscular em vacas Holandesas não foi encontrado em animais da raça

Charolêsa num mesmo estudo (THALLER et al., 2003). Os resultados aqui descritos são consistentes com os de Casas et al. (2005) que não encontrou associações entre os alelos *K* e *A* e características como EGS, marmorização, score de maciez ou AOL em gado Brahman (*Bos indicus*). Kühn et al. (2004) descreveram polimorfismo baseado no número de sequências repetitivas (variable number of tandem repeat, VNTR) localizado no sentido 5' do gene *DGAT1* que tem efeito sobre o conteúdo de gordura no leite e pode explicar a variação desse fenótipo mesmo entre animais AA (homozigotos para *DGAT1/Cfr1*), esclarecendo aspectos do QTL no BTA14. Existe possibilidade de que o polimorfismo 5' VNTR *DGAT1* contribua para a variação na deposição de gordura em animais *Bos indicus*.

Concluindo, discrepâncias entre estudos de associação podem estar relacionadas a diferentes influências genéticas, efeitos epistáticos e/ou influências do ambiente e do manejo sobre os dados fenotípicos (DEKKERS, 2004). Tais fatos somados à fixação (ou baixa frequência de alelos) em *Bos indicus* (Nelore) e à falta de associações significativas encontradas neste estudo para os marcadores mencionados dos genes *LEP*, *TG* e *DGAT1* reforçam a afirmação de Casas et al. (2005) que afirmam ser necessário o desenvolvimento de marcadores adicionais adequados ao gado *Bos indicus*.

6.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer a infraestrutura para o estudo e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

7 CONCLUSÕES

As frequências alélicas do polimorfismo estudado no gene *CAPN1* foram semelhantes entre os cinco diferentes grupos genéticos, contrariando a hipótese formulada.

As frequências alélicas dos demais polimorfismos pesquisados – *CAST/Xmnl*, *LEP/Psy2l*, *TG/Psul*, *DGAT1/Cfrl* – foram diferentes entre os grupos genéticos, corroborando com a hipótese. Pela primeira vez foi descrita a segregação dos polimorfismos *CAST/Xmnl*, *LEP/Psy2l* e *DGAT1/Cfrl* na raça Nelore. O polimorfismo *TG/Psul* não foi informativo na raça Nelore, pois todos os animais deste grupo apresentaram genótipo homocigoto para o alelo C.

Não foram encontradas relações entre as características fenotípicas – Força de Cisalhamento e Área de Olho de Lombo – e os polimorfismos dos genes *CAPN1* e *CAST*, negando a hipótese. Quanto ao Índice de Fragmentação Miofibrilar, não foi encontrada relação deste com *CAPN1*, mas houve efeito dos genótipos de *CAST* sobre os valores médios de MFI. Assim, o polimorfismo *CAST/Xmnl* tem potencial para ser indicador de maciez da carne, sendo o genótipo AA relacionado a maiores números de MFI, em bovinos *Bos indicus* e respectivos cruzamentos com *Bos taurus*.

Não foram encontradas relações entre as características fenotípicas – Espessura de Gordura Subcutânea, Lipídeos Totais, Marmorização, Força de Cisalhamento e Área de olho de lombo – e os polimorfismos *LEP/Psy2l*, *TG/Psul*, *DGAT1/Cfrl*, negando a hipótese formulada para estes marcadores.

REFERÊNCIAS

AILHAUD, G.; GRIMALDI, P.; NEGREL, R. **Annual Review of Nutrition**, v.12, p. 207-233, 1992.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p.130-138, 2001.

AUS-MEAT LIMITED, Users' Guide to Australian Meat. 2001. Disponível em www.ausmeat.com.au. Acessado em Junho de 2007.

BARENDSE, W.; VAIMAN, D.; KEMP, S. J.; SUGIMOTO, Y.; ARMITAGE, S. M.; WILLIAMS, J. L.; SUN, H. S.; EGGEN, A.; AGABA, M.; ALEYASIN, S. A.; BAND, M.; BISHOP, M. D.; BUITKAMP, J.; BYRNE, K.; COLLINS, F.; COOPER, L.; COPPETTIERS, W.; DENYS, B.; DRINKWATER, R. D.; EASTERDAY, K.; ELDUQUE, C.; ENNIS, S.; ERHARDT, G.; FERRETTI, L.; FLAVIN, N.; GAO, Q.; GEORGES, M.; GURUNG, R.; HARLIZIUS, B.; HAWKINS, G.; HETZEL, J.; HIRANO, T.; HULME, D.; JORGENSEN, C.; KESSLER, M.; KIRKPATRICK, B. W.; KONFORTOV, B.; KOSTIA, S.; KUHN, C.; LENSTRA, J. A.; LEVEZIEL, H.; LEWIN, H. A.; LEYHE, B.; LI, L.; MARTIN BURRIEL, I.; MCGRAW, R. A.; MILLER, J. R.; MOODY, D. E.; MOORE, S. S.; NAKANE, S.; NIJMAN, I. J.; OLSAKER, I.; POMP, D.; RANDO, A.; RON, M.; SHALOM, A.; TEALE, A. J.; THIEVEN, U.; URQUHART, B. G. D.; VAGE, D-I.; VAN DE WEGHE, A.; VARVIO, S.; VELMALA, R.; VILKKI, J.; WEIKARD, R.; WOODSIDE, C.; WOMACK, J. E.; ZANOTTI, M.; ZARAGOZA, P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 21-28, 1997.

BARENDSE, W. J. **Assessing lipid metabolism**. Patent, International Publication number: WO99/23248. World International Property Organization, 1999.

BARENDSE, W. J. **DNA markers for meat tenderness**. International patent application PTC/AU02/00122 [International patent application WO 02/064820 A1], World International Property Organization, 2002.

BARENDSE, W. J.; BUNCH, R.; THOMAS, M.; ARMITAGE, S.; BAUD, S.; DONALDSON, N. The TG5 Thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 669-674, 2004.

BARENDSE W. J.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E. The leptin C73T missense mutation is not associated with marbling and fatness traits in a large gene mapping experiment in Australian cattle. **Animal Genetics**, v. 36, p. 71-93, 2005.

BAILEY, A. J. The role of collagen in the development of muscle and relationship to eating quality. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 60, n. 6, p.1580-1587, 1995.

BEEVER, J. E.; GEORGE, P. D.; FERNANDO, R. L.; STORMONT, C. J.; LEWIN, H. A. Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 68, n. 2, p. 337-344, 1990.

BELEW, J. B.; BROOKS, J. C.; MCKENNA, D. R.; SAVELL, J. W. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, Texas, v. 64, p. 507-512, 2003.

BERGEN, R. D.; MCKINNON, J.J.; CHRISTENSEN, D. A.; NOHLOE, N. Prediction of lean yield in yearling bulls using real-time ultrasound. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, p. 305-311, 1996.

BINDON, B. M.; EGAN, A. F.; ENTWISTLE, K. W.; HOLROYD, R. G.; HOPPE, A.; HUNTER, R. A.; ODDY, V. H. Meeting market specifications for beef. In: Proceedings of MEAT'95: THE AUSTRALIAN MEAT INDUSTRY CONFERENCE, 1995, Canberra. **Proceedings...** Canberra: CSIRO, 1995. p. 211-215.

BINK, M. C. A. M.; ARENDONK, J. A. M. Marker-assisted prediction of breeding values in dairy cattle populations. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: Iniversity of Guelph, Department of Animal and Poultry Science, 1994, v. 21, p. 233-236.

BISHOP, M. D.; KOOHMARAIE, M.; KILLEFER, J.; KAPPES, S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 71, p. 2277, 1993.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Canadá, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 900-910, 2003.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.

CAN., CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Indicadores Pecuários**. 2007. Disponível em: <http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>. Acesso em: maio 2007.

CARPENTER, J. W.; PALMER, A. Z.; KIRK, W. G.; PEACOCK, F. M.; KOGER, M. Slaughter and carcass characteristics of Brahman and Brahman Shorthorn crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 20, p. 336, 1961.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 81, p. 2976-2983, 2003.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE JR., C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 83, p. 13–19, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY D. G.; CHASE JR., C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 84, p. 520-525, 2006.

CEDDIA R. B.; WILLIAM, J. R. W. N.; LIMA, F. B.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 31, p. 715, 1998.

CHUNG, H. Y.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. **Animal Genetics**, v. 30, p. 80, 1999.

CHUNG, H. Y.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. **Animal Genetics**, v. 32, p. 40-53, 2001.

COLEMAN, R.; BELL, R. M. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 251, p. 4537-4543, 1976.

COSTELLO, S.; O'DOHERTY, E.; TROY, D. J.; ERNST, C. W.; KIM, K. S.; STAPLETON, P.; SWEENEY, T.; MULLEN, A. M. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. Longissimus dorsi*. **Meat Science**, Nebraska, v. 75, p. 551–557, 2007.

COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. O uso de marcadores moleculares na industria animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...?** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 195-205.

CREWS, D. H.; KEMP, D. J. Genetic parameter for ultrasound and carcass measurements of yield and quality among replacement and slaughter beef cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 79, p. 3008-3020, 2001.

CROALL, D. E.; MARTINO, G. N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: Structure, function and regulation. **Physiology Reviews**, p. 813-847, 1991.

CROSS, H. R.; MOEN, R.; STANFIELD, M. S. Training and testing of judges for sensory analysis of meat quality. **Food Technology**, v. 32, p. 48, 1978.

CROUSE J. D.; SEIDMAN, S. C.; CUNDIFF, L. V. The effect of carcass electrical stimulation on meat obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Food Quality**, Estados Unidos, v. 10, p. 407, 1987.

CROUSE, J. D.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; KOOMARAIE, M.; SEIDMAN, S. C. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef

characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 67, p. 2661-2668, 1989.

CULLER, R. D.; PARRISH, JR., F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine *Longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, Iowa, v. 43, p. 1177-1180, 1978.

CUNDIFF, L. V.; GREGORY, K. E.; GOSEY, J. E. Cattle germplasm evaluation and germplasm utilization programs at MARC. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, v. 46, p. 45, 1993.

CURI, P. R.; MORAES, R. V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 712-722, 1981.

CURI, R. A.; PALMIERI, D. A.; SUGISAWA, L.; DE OLIVEIRA, H. N.; SILVEIRA, A. C.; LOPES, C. R. Growth and carcass traits associated with *GH1/AluI* and *POU1f1/Hinfl* gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. **Genetic and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 29, p. 56-61, 2006.

DAMON, R. A.; CROWN JR., R. M.; SINGLETARY, C. B.; McCRAINE, S. E. Carcass characteristics of purebred and crossbred steers in the Gulf Coast region. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 19, p. 820, 1960.

DAVIS, G. P.; DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v.76, p.2331-2339, 1998.

DARIMONT, C.; GAILLARD, D.; AILHAUD, G.; NEGREL, R. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 98, p. 67-73, 1993.

DA SILVA, M. V.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. Utilização de marcadores genéticos em suínos. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archives Latinoamericano Production Animal**, v. 11, p. 1-10, 2003.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of markers and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 82, p. 313-328, 2004. Suplemento E.

DELGADO, E. F.; GEESINK, G. H.; MARCHELLO, J. A.; GOLL, D. E.; KOOHMARAIE M. Properties of myofibril-bound calpain activity in *Longissimus* muscle of callipyge and normal sheep. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 79, p. 2097-2107, 2001.

DEL LAMA, S. N. **Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos**. 1991. 207 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

DE MARTYNOFF, G.; POHL, V.; MERCKEN, L.; VAN OMMEN, G.-J.; VASSART, G. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, p. 591-599, 1987.

DRANSFILD, E. Modelling postmortem tenderization. V. Inactivation of calpains. **Meat Science**, Nebraska, v. 37, p. 391-409, 1994.

DUCKETT, S. K.; KLEIN, T. A.; DODSON, M. V.; SNOWDER, G. D.; Tenderness of normal and callipyge lamb aged fresh or after freezing. **Meat Science**, v. 49, p. 19-26, 1998.

DUNSING, M. Visual and eating preferences of consumer house-hold panel for beef from Brahman-Hereford crossbreds and from Herefords. **Food Technology**, v. 13, p. 451-456, 1959.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – BRASIL. **O melhoramento genético dos animais domésticos no Brasil**. Artigo organizado por Kepler Euclides Filho. 2007. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc75/14melhoramento.html>, Acessado em: maio 2007.

EPSTEIN, H.; MASON, I. L.; Cattle. In: MANSON I. L. (Ed.). **Evolution of domestic animals**. London: Longman, 1984. p. 6-27.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220 p.

FITZSIMMONS, C. J.; SCHMUTZ, S. M.; BERGEN, R. D.; MCKINNON, J. J. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, New York, v. 9, p. 432-434, 1998.

FOLLEY, S. J.; MALPRESS, F. H. Hormonal Control of Lactation. ,In: PINCUS, G.; THIMANN, K. V. (Eds). **The Hormones, physiology, chemistry and applications**. New York: Academic Press Inc., 1948. v.1, p. 745-805.

FORBES, S. M. C.; VAISEY, M.; DIAMANT, R. The relationships between consumer criteria for choosing beef and beef quality. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Canada, v. 7, p. 130-135, 1974.

FRANCO, M. M. **O uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia, 2006. 14 p.

FREKING, B. A.; MURPHY, S. K.; WYLIE, A. A.; RHODES, S. J.; KEELE, J. W.; LEYMASTER, K. A.; JIRTLE, R. L.; SMITH, T. P. L. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only know example of polar over-dominance in mammals. **Genome Research**, v. 12, p. 1496-1506, 2002.

GARNERO, A. V.; LÔBO, R. B.; BEZERRA, L. A. F.; DE OLIVEIRA, H. N. Comparação entre alguns critérios de seleção para crescimento na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 714-718, 2001.

GEARY, T. W.; MCFADIN, E. L.; MACNEIL, M. D.; GRINGS, E. E.; SHORT, R. E.; FUNSTON, R. N.; KEISLER, D. H. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 81, p. 1–8, 2003.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *postmortem* conditions. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 77, p. 2685-2692, 1999.

GEORGES, M.; LEQUARRE, S.; HANSET, R.; VASSART, G. Genetic variation of the bovine thyroglobulin gene studied at the DNA level **Animal Genetics**, v. 18, p. 41-50, 1987.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GREINER, S. P.; ROUSE, G. H.; WILSON, D. E.; CUNDIFF, L. V.; WEELER, T. L. Prediction of retail product weight and percentage using ultrasound and carcass measurements in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 81, p. 1736-1742, 2003.

GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIM, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J-J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRÈRE, J-M.; COPPIETERS, W.; GEORGES M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 101, p. 2398–2403, 2004.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F. et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v. 12, p. 222–231, 2001.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.

HADLICH, J. C. **Metodologias de análise de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idades**. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal). – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2004a.

HADLICH, J. C.; BURINI, D. C. M.; CHARDULO, L. A. L.; DE OLIVEIRA, H. N.; BIANCHINI, W. ANASTÁSIO, A. C.; RODRIGUES, E.; CERVIERI, R. C. Influência da idade de abate na maciez da carne de animais da raça Nelore. In: 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004b, , Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande, MS., 2004. p. (Sis034)1-4.

HADLICH, J. C.; BURINI, D. C. M.; SILVEIRA, DE OLIVEIRA, H. N.; CHARDULO, L. A. L. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **Acta Science Animal Science**, v. 28, n. 1, p. 57-62, 2006.

HALEY, C.S. Livestock QTLs - bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, v. 11, n. 12, p. 488-492, 1995.

HARVEY, G.R. Regulation of energy balance. **Nature**, v. 222, p. 629, 1969.

HAVEL, P. J. Peripheral Signals Conveying Metabolic Information to the Brain: Short-Term and Long-Term Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 11, p. 963-977, 2001.

HENDERSON, C. R. Use of an average numerator relationship matrix for multiple sires joining. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 66, p. 1614-1621, 1988.

HOPKINS, D. L.; LITTLEFIELD, P. J.; THOMPSON, J. M.; A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, Nebraska, v. 56, p. 19-22, 2000.

HOSSNER, K. L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: potential application in animal production. **Canadian Journal Animal Science**, v. 78, p. 463, 1998.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. The Biology of Leptin: A Review. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 76, p. 1405-1420, 1998.

HUMMEL, K. P.; DICKIE, M. M.; COLEMAN D. L. Diabetes, a new mutation in the mouse. **Science**, Wash DC, v. 153, p. 1127-1128, 1966.

INGALLS, A. M.; DICKIE, M. M.; SNELL, G. D. Obese, a new mutation in the mouse. **Journal of Heredity**, v. 41, p. 317-318, 1950.

JUSZCZUK-KUBIAK, E.; SAKOWSKI, T.; FLISIKOWSKI, K.; WICINSKA K.; OPRZADEK, J.; ROSOCHACKI, S. J. Bovine μ -calpain (CAPN1) gene: new SNP within intron 14. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, p. 457-460, 2004.

KEIFFER, N. M.; CARTWRIGHT, T. C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. **Journal of Heredity**, v. 59, p. 35-37, 1968.

KELLY, T. J.; SMITH, H. O. A restriction enzyme from haemophilus influenzae. II. Base sequence of the recognition site. **Journal of Molecular Biology**, v. 51, p. 393-409, 1970.

KILLINGER, K. M.; CALKINS, C. R.; UMBERGER, W. J.; FEUZ, D. M.; ESKRIDGE, K. M. Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3288-3293, 2004.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Proceedings of Reciprocal Meat Conference**, p. 41-89, 1988.

KOOHMARAIE, M. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 70, n. 10, p. 3071-3080, 1992.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHAKELFORD, S. D.; BISHOP, M. Eliminating inconsistent beef tenderness with calcium-activated tenderization. In: PROCEEDINGS OF NEBRASKA CATTLEMAN'S ASSOCIATION, 1993, Kearney. **Workshop...** Kearney. NE., 1993.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, p. 36-93, 1994.

KOOHMARAIE, M.; SHAKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; LONGERRAN T. L.; DOUMIT, M. E. A muscle hypertrophy condition in lambs (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3596-3607, 1995.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M. P.; SHAKELFORD, S. D. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Nebraska, v. 62, p. 354-352, 2002.

KOOHMARAIE, M. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria:UFSM, 2003. 1 CD-ROM.

KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; KAUPE, B.; ERHARDT, G.; BENNEWITZ, J.; SCHWERIN, M.; FRIES R. Evidence for Multiple Alleles at the DGAT1 Locus Better Explains a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Fat Content in Cattle. **Genetics**, v. 167, p. 1873-1881, 2004.

LIEN, S.; SUNDVOLD, H.; KLUNGLAND, H.; VAGE, D. I. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). **Animal Genetics**, v. 28, p. 245, 1997.

LÔBO, R. B.; BEZERRA, L. A. F.; OLIVEIRA, H. N. Avaliação genética de animais jovens, touros e matrizes. Ribeirão Preto: GEMAC - FMRP – USP, 1998. 67 p.
LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M.; CUNNINGHAM, P. Evidence of two independent domestications of cattle. **Proceedings of National Academy of Science**, United States of America, v. 91, p. 2757-2761, 1994.

LONERGAN, S. M.; ERNST, C. W.; BISHOP, M. D.; CALKINS, C. R.; KOOHMARAIE, M. Relationship of Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) at the Bovine Calpastatin Locus to Calpastatin Activity and Meat Tenderness. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 73, p. 3608–3612, 1995.

LUCKETT, R. L.; BINDER, T. D.; ICAZA, E. A.; TURNER, J. W. Tenderness studies in straightbred and crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 40, p. 468, 1975.

MANWELL, C.; BAKER, C. M. A. Chemical classification of cattle 2. Phylogenetic tree and specific status of zebu. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics**, v. 11, p. 151-162, 1980.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – BRASIL. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em: maio 2007.

MILLER, R. K. Avaliação instrumental da qualidade da carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CARNE, 1.m 2001, São Pedro, **Anais...** São Pedro: CTC-ITAL, 2001, p.179-186.

MOODY, D. E.; POMP, D.; NEWMAN, S.; MACNEIL, M. D. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

MOORE, S. S.; LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; KNEELAND, J. MURDOCH, B.; HANSEN, C.; BENKEL, B. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1919–1925, 2003.

MORALES, D. C.; CHARDULO, L.A. L.; SILVEIRA, A. C.; DE OLIVEIRA, H. N.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; CERVIERI, R. C. Avaliação da qualidade da carne em bovinos de diferentes grupos genéticos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 171-175, 2003.

MORGAN, J. B.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J. W.; CROUSE, J. D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 71-1471, 1993.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAKAYA, H. L.; AMARAL, P. P.; LOURO, R.; LOPES, A.; FACHEL, A. A.; MOREIRA, Y. B.; EL-JUNDI, T. A.; SILVA, A. M.; REIS, E. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Comment reviews reports deposited research refereed research interactions information Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. **Genome Biology**, v. 8, R43, 2007. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2007/8/3/R43>>. Acesso em: Abril de 2007. NOGUEIRA, G. P. Puberty in south American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 361-372, 2004.

O'BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 58, p. 1124-1151, 1991.

O'CONNERS, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 75, p. 1822-1830, 1997.

OLSON, D. G.; PARRISH, J. R. F. C.; STROMER, M. H. Myofibrillar fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during *postmortem* storage. **Journal of Food Science** v. 41, p. 1036–1041, 1976.

OPRAZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L.; DYMICKI, E. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with

growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. **Animal Science Papers and Reports**, Polônia, v. 21, p. 135–145, 2003.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLENT, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. Evaluation of Single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 80, p. 3077-3085, 2002.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; WHITE, S. N.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W.; DIKEMAN, M. E.; SMITH, P. L. Association of markers in the CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 82, p. 3474–3481, 2004.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. **Ciência , higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: EDUF, 1995. v. 1, 586 p.

PARMA, J.; CRISTOPHE, D.; POHL, V.; VASSART, G. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence for intron loss and "exonization" during evolution.. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, p. 769-779, 1987.

PEGORARO, L.; YANG, Z.; SAMAKÉ, S.; MEIRELLES, F. V.; BORDIGNON, V.; MOQUIN, L.; SMITH, L. C. Sequence comparison of mitochondrial tRNA genes and origin of light strand replication in *Bos taurus* and Nellore (*Bos indicus*) breeds. **Animal Genetics**, v. 27, p. 91-94, 1996.

POMP, D.; ZOU, T.; CLUTTER, A. C.; BARENDSE, W. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 75, n. 5, p. 1427, 1997.

PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. Carcass Characteristics, the Calpain Proteinase System, and Aged Tenderness of Angus and Brahman Crossbred Steers¹. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 75, p. 2955–2961, 1997.

QUASS, R. L.; POLLACK, E. J. Mixed model methodology for farm and ranch beef cattle testing programs, **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 51, p. 1277-1287, 1980.

RAMSEY, C. B.; COLE, J. W.; MEYER, B. H.; TEMPLE, R. S. Effects of type and breed of British, Zebu and dairy cattle on production, palatability and composition. II. Palatability differences and cooking losses as determined by laboratory and family panels. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 22, p. 1001, 1963.

REED, C. A. The beginnings of animal domestication. In: MANSON, I. L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984, p 1-6.

REGITANO, L. C. A. Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim. 1996. 132 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

- RINCKER C. B.; PYATT, N. A.; BERGER, L. L.; FAULKNER, D. B. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 84, p. 686-693, 2006.
- RINCÓN, G.; MEDRANO, J. F. Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine CAPN1 gene. **Animal Genetics**, v. 37, p. 293–307, 2006.
- RIQUET, J. W.; COPPIETERS, N.; CAMBISANO, J. J. et al. Identity-by-descent fine-mapping of QTL in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. **Proceedings of National Academy of Science** . v. 96, p. 9252–9257, 1999.
- ROCHA, J. L.; BAKER, J. F.; WOMACK, J. E.; SANDERS, J. O.; TAYLOR, J. F.; *descrever os demais autores* Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3360-3370, 1992.
- ROCHA, J. L.; SANDERS, J. O.; TAYLOR, J. F. Genetic markers to manipulate QTL: The additive illusion. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 250, 1994. Trabalho apresentado no Annual Meeting of the American Society of Animal Science, 72., 1994, Minneapolis
- ROTHSCHILD, M. F.; JACOBSON, C.; VASKE, D.; TUGGLE, C.; WANG, L.; SHORT, T.; ECKHART, G.; SASAKI, S.; VINCENT, A.; McLAREN, D. G.; SOUTHWOOD, O. I.; VAND DER STEEN, H.; MILEHAM, A.; PLASTOW, G. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 93, p. 201-205, 1996.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 540 f.
- SANTOS, R. **Nelore: a vitória brasileira**. 1.ed. Uberab: Agropecuária Tropical, 1995, 392 p.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Systems for windows**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.
- SCHENKEL, F. S.; MILLER, S. P.; JIANG, Z.; MANDELL, I. B.; YE, X.; LI, H.; WILTON, J. W. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatina gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 84, p. 291-299, 2006.
- SCHWERIN, M.; BROCKMANN, G.; VANSELOW, J.; SEYFERT, H. M. *descrever os demais autores* Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement – An overview. **Animal Research and Development**, v. 42, p. 15-26, 1995.

SEIDEMAN, S. C.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J. D. Factors associated with tenderness in young beef. **Meat Science**, USA, v. 20, p. 281-291, 1987.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Falta local de publicação USA,: Current Conception Inc, 1999.

SILLENCE, M. N. Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock. **The Veterinary Journal**, Austrália, v. 167, p. 242-257, 2004.

SILVEIRA, A. C. Produção de novilhos superprecoces. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., 2000, Goiânia. **Anais....** Goiânia/GO: CBNA, 2000. p. 67–90.

SHORT, T. H.; ROTHSCHILD, M. F.; SOUTHWOOD, O. I.; MCLAREN, D. G.; DE VRIES, A.; VAND DER STEEN, H.; ECKHART, G.; TUGGLE, C.; HELM, J.; VASKE, D. A.; MILEHAM, A. J.; PLASTOW, G. S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 75, p. 3138-3142, 1997.

SMITH, T. P. L.; CASAS, E.; REXROAD III, C. E.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 78, p. 2589–2594, 2000.

STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; BEATTIE, C. W. The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 399-400, 1996.

TAIT, J. R. R. G.; WILSON, D. E.; ROUSE, G. H. Prediction of retail product and trimmable fat yields from the four primal cuts in beef cattle using ultrasound or carcass data. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 83, p. 1353–1360, 2005.

TANTIA, M. S.; VIJH, R. K.; MISHRA, B. P.; MISHRA, B.; BHARANI KUMAR, S. T.; SODHI, M. *DGAT1* and *ABCG2* polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. **Bio-Med Central Veterinary Research**, v. 2, p. 32, 2006.. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/32>>. Acesso em: Abril de 2007.

THALLER, G.; KUHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G. BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZUHLKE, H.; FRIES, R. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v. 34, p. 354–357, 2003.

TURNER J. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 50, p. 1201-1205, 1980.

USDA. United States standards for grades of carcass beef. Washington, DC.: Agric. Marketing Service. USDA, 1989.

USDA. United States standards for grades of carcass beef. Washington, DC.: Agric. Marketing Service. USDA, 1997.

VAN DER LENDE, T.; TE PAS, M. F.; VEERKAMP, R. F.; LEIFERS, S. C. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. **Vitamins and Hormones**, v. 71, p. 373-404. falta o ano.

VAN EENENNAM, A. L.; LI, J.; THALLAMAN, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, M. E.; GILL, C. A.; FRANKE, D. E.; THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 85, p. 891–900, 2007.

VAZ PORTUGAL, A. Sistemas de produção de alimentos de origem animal no futuro. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, p. 63-70, 2002.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis**: methods for discrete population genetic data. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990. 377 p.

WELLER, J. I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2525-2537, 1990.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 72, p. 3145-3151, 1994.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHAKELFORD, S. D. Standardized warner-bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement. Clay Center, NE.: Romam L Hruska US Marc USDA, 1995.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; CROUSE, J. D. Characterization of biological types of cattle (Cycle IV): Carcass traits and *Longissimus* palatability. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 74, p. 1023-1035, 1996.

WHIPPLE, G.; KOOMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D.; HUNT, M. C.; KLEMM, R. D. Evaluation of attributes that affect *Longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 74, p. 2394, 1990.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE, JR. C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends to current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus* and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, Nebraska, v. 83, p. 2001-2008, 2005.

WINTER, A. W.; KRAMER, F. A.; WERNER, F. A. O.; KOLLERS, S.; KATA, S.; DURSTEWITZ, G.; BUITKAMP, J.; WOMACK, J. E.; THALLER, G.; FRIES, R. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 99, p. 9300–9305, 2002.

WOMACK, J. E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1199- 1203, 1993.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZHANG, H. M.; DENISE, S. K.; AX, R. L. Rapid Communication: A Novel DNA Polymorphism of the Bovine Calpain Gene Detected by PCR-RFLP Analysis. *Journal of Animal Science, Nebraska*, v. 74, p. 1441, 1996.