

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

GISELE BATISTA VENERONI

**ASSOCIAÇÃO DE SNPS EM GENES CANDIDATOS E DE REGIÕES
CROMOSSÔMICAS COM ESPESSURA DE GORDURA
SUBCUTÂNEA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM**

JUNHO/2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

GISELE BATISTA VENERONI

**ASSOCIAÇÃO DE SNPS EM GENES CANDIDATOS E DE REGIÕES
CROMOSSÔMICAS COM ESPESSURA DE GORDURA
SUBCUTÂNEA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração: Genética e Evolução.

Orientação: Dra. Luciana C. A. Regitano

JUNHO/2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

V456as

Veneroni, Gisele Batista.

Associação de SNPs em genes candidatos e de regiões cromossômicas com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim / Gisele Batista Veneroni. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

138 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biologia molecular. 2. Marcador molecular. 3. Gordura subcutânea. 4. Bovino de corte. I. Título.

CDD: 574.88 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ASSOCIAÇÃO DE SNPS EM GENES CANDIDATOS E DE
REGIÕES CROMOSSÔMICAS COM ESPESSURA DE GORDURA
SUBCUTÂNEA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM**

Tese de Doutorado de Gisele Batista Veneroni

Banca Examinadora

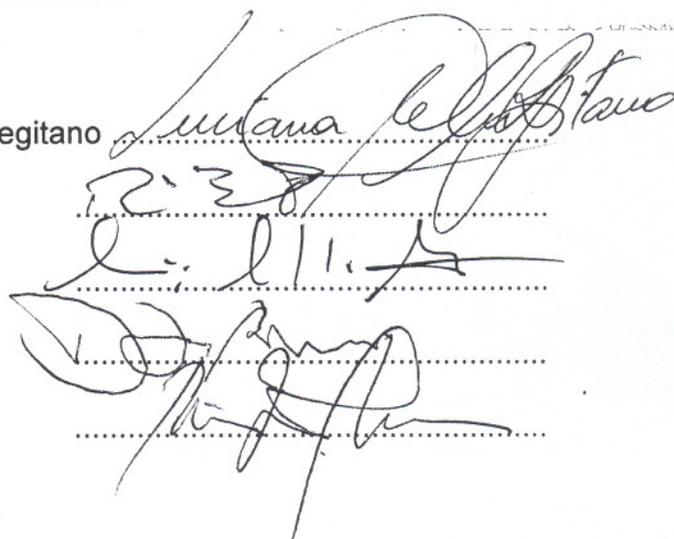
Profa. Dra. Luciana Correa de Almeida Regitano

Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito

Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar

Prof. Dr. Danísio Prado Munari

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles



AGRADECIMENTOS

Cursar uma faculdade pública, por muito tempo em minha vida se mostrou como um sonho distante, para uma mera aluna de escola pública. No entanto, me esforcei e conquistei esse sonho. De repente, me vi terminando uma faculdade, pública, e já entrando em um curso de mestrado na área que sempre me instigou e fascinou! Para mim isso era algo que nunca pensei que pudesse acontecer... Agora, terminando o doutorado, vejo que tudo que sonhamos, pode ser obtido se nos empenharmos nessa conquista e se tivermos ao nosso lado amigos e mestres verdadeiros e que nos querem bem! Gostaria de registrar aqui minha gratidão a todas as pessoas que me acompanharam desde a graduação! E, em especial, na conquista desse doutorado!

Quero começar agradecendo à minha família! Aos meus pais, Paulo e Lourdes, às minhas irmãs, Fernanda e Jéssica e, à minha avó Antônia, por sempre terem me levantado quando caía em desânimo, ao meu cunhado Denis pelas ajudas com o PC;

O João por muito tempo foi meu amigo, meu companheiro de laboratório. O tempo se passou, as coisas tomaram rumos diferentes, e hoje estamos prestes a nos casar! Desde quando nos conhecemos, o João me ajudou imensamente nas questões científicas e até hoje me ajuda muito! Gostaria de lhe agradecer pelo apoio como profissional! Mas, acima de tudo, quero lhe agradecer por estar me ajudando a crescer, por estar ao meu lado e por ser meu porto seguro! Espero que para sempre! Sem você o ótimo sentimento dessa conquista não seria completo! Gostaria também, de agradecer aos meus sogros, Elisabeth e Inácio, que apesar de estarem há pouco tempo em minha vida, já se mostram presentes e preocupados comigo e com minha vida profissional!

Registro aqui um agradecimento especial à minha orientadora, Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, que me fizeram amadurecer e crescer! Agradeço a ela por ter acreditado em mim como aluna.

Minha grande amiga Sarah Laguna Meirelles merece um agradecimento especial também! Pois desde o mestrado me acompanha, me ajuda

e me apóia tanto na realização de meu trabalho, quanto no que se refere à amizade sempre me ajudando nas horas em que mais precisei!

A Adriana Mércia Guaratini Ibelli é outra grande amiga na vida pessoal e profissional! Se não fosse ela em um período de minha vida, acho que não teria agüentado a barra! Você está e sempre estará em meu coração! Quero te agradecer por tudo!

Quero agradecer também a todos do Laboratório de Biotecnologia Animal e da Embrapa Pecuária Sudeste. Em especial à Suelen pela amizade e momentos de “terapia”... ao Gustavo pelos ensinamentos e amizade... À Marcela, que apesar de conhecê-la há pouco tempo já demonstrou ser uma ótima amiga! À Polyana que ajudou na genotipagem de alguns marcadores e pelos momentos de descontração! À Dra. Simone pelos conselhos e ensinamentos científicos... Ao Dr. Valdomiro pelos ensinamentos e pela ótima energia que distribui a todos que com ele convive! Aos trabalhadores do campo pelo auxílio nas ultrassonografias dos bovinos... Enfim a todos da fazenda Canchim que contribuíram para o desenvolvimento do meu projeto ou que me deram a honra da amizade!

Gostaria de agradecer a Daniela Grossi, que apesar de estar em outro país, não deixou de nos prestar sua ajuda na finalização das análises estatísticas.

Agradeço ao Dr. Maurício Mello de Alencar pelos ensinamentos, amizade e auxílio nas análises estatísticas. Ele é uma pessoa incomum: honesta, inteligente, humilde, muito atarefado, mas nunca deixa de prestar ajuda a quem necessita, e não se deixa vencer pelos obstáculos da pesquisa.

Quero agradecer ao Dr. Tad Sonstegard do ARS/USDA pelo auxílio na genotipagem com chip de SNPs. Ao Prof. Dr. Luiz Lehman Coutinho pelos ensinamentos e auxílio bancada. Ao Dr. Michel Yamagishi pela ajuda estatística. Ao Dr. Lakshmi Kumar Matukumalli da Universidade de Mason George nos EUA pelo fornecimento dos genótipos do projeto HapMap.

Aos professores do programa de pós-graduação de Genética e Evolução da UFSCAR pelos ensinamentos e formação, assim como as secretárias do programa pela atenção e dedicação;

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização do trabalho.

“Se você abre uma porta, você pode ou não entrar em uma nova sala. Você pode não entrar e ficar observando a vida. Mas se você vence a dúvida, o temor, e entra, dá um grande passo: nesta sala vive-se! Mas, também, tem um preço... São inúmeras outras portas que você descobre. Às vezes curte-se mil e uma. O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta. A vida não é rigorosa, ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos quando com eles se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno. A vida é generosa, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas. E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas. Ela privilegia quem descobre seus segredos e generosamente oferece afortunadas portas. Mas a vida também pode ser dura e severa. Se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela frente. É a repetição perante a criação, é a monotonia monocromática perante a multiplicidade das cores, é a estagnação da vida... Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens! “

Içami Tiba

RESUMO

A raça Canchim tem sido utilizada na bovinocultura de corte como alternativa de intensificação de produção. Grupos genéticos Canchim (5/8 Charolês + 3/8 Zebu) e MA (descendentes de touros Charoleses e de 1/2 Canchim + 1/2 Zebu) constituem essa raça sintética, que tem bom potencial de crescimento e adaptação tropical, mas deposita pouca gordura quando alimentada à pasto. Espessura de gordura subcutânea, quantidade e distribuição de gordura total têm grande impacto sobre a qualidade da carne e carcaça em gado de corte. Por este motivo, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a deposição de gordura nessa raça, incluindo a busca por marcadores moleculares que auxiliem a identificação de animais com maior potencial genético para deposição de gordura. Para que a genética molecular possa ser incorporada nos programas de melhoramento de bovinos de corte, é essencial que a associação entre marcadores moleculares e características de produção seja avaliada na população em que se deseja utilizá-los. Há relatos de muitos genes candidatos e segmentos cromossômicos associados com a variação da deposição de gordura em bovinos. O objetivo desse trabalho foi identificar SNPs associados à deposição de gordura em animais da raça Canchim criados à pasto. Para tanto, foram prospectados SNPs nos genes do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* e *proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*, verificada a associação de SNPs presentes nos genes *da proteína ligante do fator de crescimento semelhante à insulina 3*, *coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A*, *subunidade 26S ATPase do proteassomo*, do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1*, *hormônio liberador de corticotrofina* e *proteína ligante de ácido graxo 4* com espessura de gordura em animais Canchim e MA. Além disso, a existência de regiões genômicas associadas com espessura de gordura subcutânea foi investigada em populações Canchim e MA usando um chip de 54 K em fenótipos extremos. Dentre as regiões com associação significativa, foram eleitas aquelas presentes no BTA14 para validar a associação por análise de haplótipos na população toda. SNPs nos genes do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* e da *proteína ligante de ácido graxo 4* foram associados à variação de espessura de gordura subcutânea, enquanto que nenhuma associação foi observada para os SNPs dos genes *proteína ligante ao fator de crescimento*

semelhante à insulina 3, coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A, subunidade 26S ATPse do proteassomo e hormônio liberador de corticotrofina. Também foram associadas com a característica avaliada nesse trabalho, duas regiões cromossômicas do BTA14.

PALAVRAS-CHAVE: genes candidatos. chip de alta densidade de SNPs. Canchim. espessura de gordura subcutânea

ABSTRACT

The Canchim has been used in beef cattle as an alternative to production intensification. Canchim (5/8 Charolais + 3/8 Zebu) and MA (offspring of Charolais bulls and 1/2 Canchim + 1/2 Zebu cows) constitute a synthetic beef cattle breed which has a good growth potential and tropical adaptation but suboptimal fat deposition under pasture. Backfat thickness (BF), total fat amount and distribution of fat have a strong impact on carcass and meat quality in beef cattle. For this reason, research has been conducted to increase fat deposition in this breed, including the search for molecular markers to identify animals with high genetic potential for fat deposition. To incorporate molecular genetics into breeding programs in beef cattle, it is essential that the association between molecular markers and production traits is evaluated in the population in which they are to be used. There are reports of many candidate genes and chromosomal segments associated with variation in fat deposition in cattle. The objective of this study was to identify SNPs associated to backfat thickness in Canchim. To achieve this objective we searched for SNPs in *development and differentiation enhancing factor 1* and *insulin-like growth factor binding protein 3* genes, tested the association of SNPs in the *insulin-like growth factor binding protein 3*, *peroxisome proliferative active receptor gamma coactivator 1A*, *proteasome 26S subunit ATPase 1*, *development and differentiation enhancing factor 1*, *corticotropin releasing hormone* and *fatty acid binding protein 4* genes with fat thickness in Canchim and MA beef cattle. We also analyzed the existence of genomic regions associated with backfat thickness in these populations using a 54 K chip in extreme phenotypes. From the associated regions we selected the ones of BTA14 to validate the association by analysis of haplotypes in the whole population. The SNPs analyzed in *development and differentiation enhancing factor 1* and *fatty acid binding protein 4* genes were associated with variation in backfat thickness, whereas no association was found for the SNPs of the *insulin-like growth factor binding protein 3*, *peroxisome proliferative active receptor gamma coactivator 1A*, *proteasome 26S subunit ATPase 1* and *corticotropin releasing hormone* genes. Additionally, two chromosomal regions of BTA14 were associated with the trait in this work.

KEY WORDS: candidate genes. high density SNPs chip. Canchim. backfat thickness

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição do efetivo de bovinos, segundo as grandes regiões.....	18
Figura 2. Animal da raça Canchim	23
Figura 3. Representação esquemática do ARMS-PCR.....	38

CAPÍTULO 2

Figura 1. Posição dos 4 domínios conservados na seqüência de aminoácidos na proteína DDEF1	68
Figura 2: Gradiente de temperatura de anelamento.....	71
Figura 3. Gel de agarose 1% para verificação da integridade do DNA extraído.	84
Figura 4: Gel de agarose 1% para visualização dos fragmentos amplificados em DDEF1.	87
Figura 5. Cromatograma obtido no sequenciamento do produto de PCR de parte do domínio PH Centaurina.	88
Figura 6. Saída da análise de seqüências de um touro pelo pacote Phred/Phrap/Consed e exemplo de um SNP	88
Figura 7. Sequências consenso dos touros alinhadas pelo programa BioEdit.....	89
Figura 8. Eletroferograma de uma reação de genotipagem do SNP no gene DDEF1.	100
Figura 9. Representação da saída para genotipagem de um SNP pelo método TaqMan.....	101

CAPÍTULO 3

Figura 1. Blocos dentro do haplótipo 2 que supostamente estariam conservados entre haplótipos que aumentariam ou diminuiriam a espessura de gordura subcutânea na população Canchim e MA em estudo	132
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Temperaturas de anelamento dos <i>primers</i> utilizados nos seqüenciamentos de regiões dos genes DDEF1 e IGFBP1.....	71
Tabela 2. SNPs dos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4 analisados com suas respectivas localizações, citações e número de animais genotipados	77
Tabela 3. Valor genético (VG) para espessura de gordura e acurácia da estimativa de valor genético dos touros Canchins utilizados na detecção de SNP	85
Tabela 4. Primers desenhados para amplificação de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 para posterior sequenciamento.	86
Tabela 5. Polimorfismos nas regiões RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, R1AG, R2AG, R3AG, R4AG, R1A, R2A, R3A, R1S, R2S e miRNA do gene DDEF1 e dos exons 1 a 7, e introns circundantes destes, do gene IGFBP3.	90
Tabela 6. Freqüências dos polimorfismos identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 nos extremos de valor genético.....	92
Tabela 7. Resultado do teste exato de Fisher para todas as regiões analisadas dos genes DDEF1 e IGFBP3, organizado de forma decrescente segundo o valo de P. .	94
Tabela 8. Resultado da avaliação de alteração de aminoácido nas proteínas DDEF1 e IGFBP3 em seqüências que contêm SNPs.....	97
Tabela 9. Primers desenhados para genotipagem do SNP DDEF1g.279401A>G ...	99
Tabela 10. Primers e sondas utilizados na genotipagem do SNP em IGFBP3.....	100
Tabela 11. Freqüência alélica dos marcadores IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 consideradas nas análises.	101
Tabela 12. Resultado da análise de Máxima Verossimilhança Restrita para os SNPs analisados nos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4.....	102
Tabela 13. Resultados das análises de efeito de substituição alélica do marcador analisado no gene FABP4.....	105
Tabela 14. Resultados das análises de efeito de substituição alélica do marcador analisado no gene DDEF1	106
Tabela 15. Resultados das análises de interações entre os alelos dos marcadores DDDEF1 e FABP4	108

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Primers e sondas utilizados nas reações de genotipagem dos 10 SNPs do BTA14	118
Tabela 2. SNPs que constituem regiões cromossômicas, contendo Três ou mais SNPs, situados à intervalos menores que 9 Mb.....	123
Tabela 3. Marcadores presentes no cromossomo 14 de bovinos, escolhidos validação da estratégia de genotipagem seletiva na raça Cachim.....	124
Tabela 4. Freqüência dos haplótipos 1 e 2 consideradas nas análises	125
Tabela 5. Análise de máxima verossimilhança restrita para associação com espessura de gordura subcutânea, de acordo com o modelo de cada combinação haplotípica.....	126
Tabela 6. Resultados das análises de efeito de substituição haplotípica do bloco da região centromérica do BTA14.....	127
Tabela 7. Freqüência dos haplótipos da região centromérica do BTA14 de animais Charoleses e Nelores.....	127
Tabela 8. Resultados das análises de efeito de substituição haplotípica do bloco da região mediana do BTA14 sobre a espessura de gordura em animais Canchim e MA e, estimativas do coeficiente de regressão para determinar a contribuição dos haplótipos no fenótipo	128
Tabela 9. Freqüência dos haplótipos da região mediana do BTA14 de animais Charoleses e Nelores.....	129
Tabela 10. Freqüência dos alelos mínimos para cada SNP utilizado na construção dos blocos haplotípicos	130
Tabela 11. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo CGTAAC da combinação haplotípica 2. ...	133
Tabela 12. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo CGTAAT da combinação haplotípica 2. ...	133
Tabela 13. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo TACGGC da combinação haplotípica 2....	134

SUMÁRIO

CAPITULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.1. Introdução	16
1.2. Objetivos gerais	17
1.3.1. Influência da criação de bovinos na economia brasileira	18
1.3.2. Rebanho de bovinos brasileiro	19
1.3.3. Raça Canchim	22
1.3.4. Características da carne bovina	24
1.3.5. Características da carcaça bovina	26
1.3.6. Metodologias para estimação de componentes de carcaça	27
1.3.7. Melhoramento genético animal e uso de marcadores moleculares ..	29
1.3.8. Marcadores moleculares	31
1.3.9. SNP	31
1.3.10. Principais estratégias para prospecção de SNP	32
1.3.11. Metodologias para genotipagem de SNPs	36
1.3.12. Marcadores moleculares e genes candidatos para associação com deposição de gordura em bovinos	40
1.3.13. IGF3BP3	42
1.3.14. PPARGC1A	43
1.3.15. PSMC1	44
1.3.16. DDEF1	44
1.3.17. CRH	45
1.3.18. FABP4	46
1.4. Referências Bibliográficas	47
CAPITULO 2. ASSOCIAÇÃO DE GENES CANDIDATOS COM ESPESSURA DE GORDURA SUBCUTÂNEA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM	60
2.1. Introdução	62
2.2. Objetivos	63
2.3. Material e Métodos	63
2.3.1. Animais	63
2.3.2. Mensuração da espessura de gordura subcutânea	64
2.3.3. Obtenção das amostras de sangue e sêmen	64

2.3.4. Extração de DNA	65
2.3.5. Quantificação e verificação da qualidade do DNA.....	66
2.3.6. Amostras utilizadas na identificação de polimorfismos dos genes DDEF1 e IGFBP3	67
2.3.7. Primers.....	68
2.3.8. Otimização das condições de PCR para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3.....	70
2.3.9. Purificação dos produtos da PCR para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3	72
2.3.10. Reação de seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3.....	73
2.3.11. Purificação e precipitação das reações de seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3.....	74
2.3.12. Análise das reações de sequenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3	74
2.3.13. Teste de independência e de alteração de aminoácidos para escolha do SNP a ser genotipado na população	75
2.3.14. Padronização das reações de genotipagem dos SNPs DDEF1g.279401A>G e IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg).....	76
2.3.15. Genotipagem dos SNPs contidos nos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4.....	77
2.3.16. Análise de associação dos SNPs dos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 com espessura de gordura subcutânea	80
2.3.17. Estimativa da porcentagem da variância fenotípica e aditiva total explicada pelo marcador	81
2.3.18. Análise de interação entre os alelos dos marcadores com efeito sugestivo na análise de variância	82
2.4. Resultados e Discussão.....	83
2.4.1. Estatística descritiva dos dados fenotípicos.....	83
2.4.2. Verificação da qualidade da extração do DNA	83
2.4.3. Amostras utilizadas na identificação de SNPs nos genes DDEF1 e IGFBP3	84
2.4.4. <i>Primers</i> para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 e genotipagem do gene FABP4	85

2.4.5. Sequenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 e identificação de SNPs.....	87
2.4.6. SNPs identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3.....	89
2.4.7. Teste de independência e de alteração de aminoácidos para escolha do SNP a ser testado na população	92
2.4.8. Genotipagem dos SNPs DDEF1g.279401A>G e IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg).....	98
2.4.9. Freqüências alélicas dos marcadores IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4	101
2.4.10. Resultado das análises de associação dos SNPs dos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 com espessura de gordura subcutânea.....	102
2.4.11. Resultado das análises de interações entre os alelos dos marcadores.....	107
2.5. Conclusões	108
2.6. Referências Bibliográficas.....	109

CAPITULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À ESPESSURA DE GORDURA SUBCUTÂNEA EM UMA RAÇA DE GADO DE CORTE COMPOSTA

3.1. Introdução	115
3.2. Objetivos	115
3.3. Material e Métodos.....	116
3.3.1. Animais, dados fenotípicos e seleção dos indivíduos a serem genotipados com o chip de 54 k SNPs.....	116
3.3.2. Genotipagem com o chip de alta de densidade de SNPs e determinação dos SNPs a serem validados na população	117
3.3.3. Genotipagem dos SNPs na população e construção de haplótipos.....	117
3.3.4. Análise de associação das combinações haplotípicas com espessura de gordura subcutânea.....	119
3.3.5. Análise de ancestralidade dos haplótipos do BTA14	120
3.3.6. Estimativa da porcentagem da variância fenotípica e aditiva total explicada por cada haplótipo significativo	121
3.3.7. Análise de interação entre os haplótipos	122

3.4. Resultados e Discussão.....	122
3.6. Referências Bibliográficas.....	135
CAPÍTULO 4 . IMPLICAÇÕES	138

CAPITULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução

O Brasil ocupa a segunda posição no ranking de criação de bovinos do mundo (USDA, 2009). Para manter a posição de um dos maiores exportadores de carne bovina mundial e conquistar novos mercados, é importante que o setor produtivo seja competitivo, fornecendo produtos de qualidade a preços acessíveis, sendo necessário para isso, melhorar, entre outros fatores, a eficiência de produção e a qualidade do produto.

O valor comercial da carcaça bovina é determinado por alguns fatores, dentre eles destaca-se a quantidade de gordura de cobertura. Um dos objetivos do melhoramento na raça Canchim é melhorar tal característica, pois esta raça não deposita gordura precocemente.

A raça Canchim foi criada a partir de 1940 com o intuito de obter animais que apresentassem boa produção e adaptação ao ambiente brasileiro. São bovinos que apresentam a maioria das características produtivas adequadas, no entanto, quando criados à pasto, não apresentam a cobertura de gordura ideal na época em que geralmente precisam ser abatidos (LUCHIARI FILHO et al. 1985 a,b). Diante desse contexto, podemos dizer que a bovinocultura de corte é importante para a economia brasileira e que a raça Canchim necessita de investimentos em pesquisa para o melhoramento da cobertura de gordura.

Os programas de avaliação genética de bovinos de corte do Brasil têm dado ênfase às características reprodutivas, de crescimento e de avaliação visual. Características de carcaça, como a espessura de gordura subcutânea (EGS) não são rotineiramente contempladas nesses programas, provavelmente, em razão das dificuldades de mensuração.

A análise do DNA pode complementar os métodos tradicionais de melhoramento de características difíceis de mensurar e com baixa herdabilidade (DAVIS e DENISE, 1998). Muitos trabalhos têm dado atenção ao estudo do efeito de polimorfismos sobre essas características, com a finalidade de identificar marcadores moleculares que possam ser aplicados ao seu melhoramento.

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares existentes para estudos de associação com características economicamente importantes, destacam-se os polimorfismos pontuais ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Esses marcadores podem ser neutros ou posicionados em genes candidatos com reconhecida e esperada função biológica para determinada característica ou produto de interesse pecuário (genes candidatos).

No genoma existem muitas regiões relacionadas à deposição de gordura, demonstrando que essa é uma característica poligênica. QTLs (loci de característica quantitativa) para deposição de gordura têm sido descritos nos cromossomos 4, 6, 10 e 14 de bovinos (BTA4, BTA6, BTA10, BTA14) (MOORE et al., 2003; MIZOGUCHI et al., 2006; TAKASUGA et al., 2007; MALTECCA et al., 2009). Nessas regiões estão localizados genes candidatos a influenciar a característica.

Uma importante contribuição do seqüenciamento do genoma bovino foi a descrição de grande quantidade de marcadores do tipo SNP, que apresentam a vantagem de poderem ser analisados simultaneamente pela tecnologia de chip de altas densidades que variam de centenas a centenas de milhares. Essa tecnologia tem permitido a análise global do genoma dos bovinos em busca de todas as regiões associadas à um dado fenótipo.

1.2. Objetivos gerais

Os objetivos gerais desse trabalho foram:

- _ Identificar SNPs em genes candidatos situados em regiões de QTL para deposição de gordura em bovinos nos cromossomos 4 e 14;
- _ Testar a associação de SNPs em genes candidatos, contidos nos cromossomos 4, 6, 10 e 14, com espessura de gordura em animais Canchim e MA;
- _ Analisar a existência de regiões genômicas associadas com espessura de gordura subcutânea em populações Canchim e MA usando um chip de 54 K em fenótipos extremos;
- _ Validar a estratégia de associação a partir de extremos por análise de haplótipos na população completa.

1.3. Revisão de literatura

1.3.1. Influência da criação de bovinos na economia brasileira

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, ficando atrás somente da Índia (USDA, 2009). Esses animais encontram-se dispersos por todo território brasileiro, no entanto a maior concentração se dá na região Centro-Oeste do país que possui 34,2% do efetivo de bovinos (Figura 1). Segundo levantamento realizado pela Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) o rebanho de bovinos do Brasil no ano de 2006 foi de 205,9 milhões de cabeças. O ano de 2006 apresentou uma leve redução no número efetivo total de animais em relação a 2005 (IBGE Produção da Pecuária Municipal, 2006).

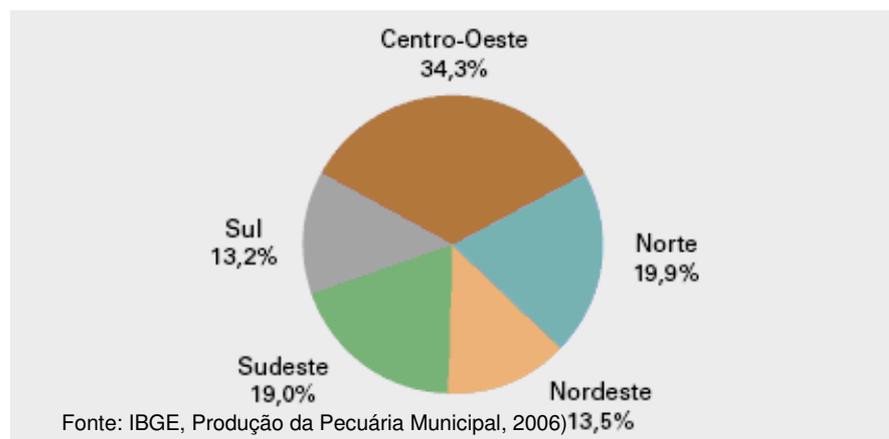


Figura 1. Distribuição do efetivo de bovinos, segundo as grandes regiões

A diminuição do número efetivo em algumas regiões pode ser indicativa de que houve algum deslocamento do rebanho dessas regiões para outros locais ou, um abate de animais maior do que a reposição no período em análise. No caso do estado de São Paulo a concorrência de áreas de pastagens com a expansão da cultura de cana-de-açúcar, cuja área expandiu-se em cerca de 200 mil hectares, segundo a pesquisa Produção Agrícola Municipal 2006, é um dos fatores que contribuíram para este resultado (IBGE, 2006).

No ano de 2007 foram abatidas 30,5 milhões de cabeças de bovinos, um aumento marginal de 0,6% com relação ao ano de 2006. No acumulado de 2007 houve a comercialização de 1,3 milhões de toneladas de bovinos. O 4º trimestre foi o que apresentou o menor volume de bovinos exportados, sendo que os maiores níveis de comercialização ocorreram nos 1º e 2º trimestres de 2007. Essa menor comercialização em 2007 pode ser resultado da estiagem e da oferta reduzida de animais para abate no último trimestre do ano (IBGE, 2008).

De janeiro a final de setembro de 2008 foram abatidas aproximadamente 22 milhões de cabeças de bovinos no Brasil. No 3º trimestre foram abatidos 7,142 milhões de animais com variação negativa de 6,3% em relação ao mesmo trimestre de 2007 e ao 2º trimestre de 2008. O 3º trimestre constitui período de entressafra, com conseqüente diminuição da oferta e qualidade de pastagens. Durante o ano de 2008 foi observada redução de oferta de animais para abate, o que se refletiu nas atividades das empresas do setor. No terceiro trimestre de 2008 houve queda de 4,4% nas exportações em relação ao mesmo trimestre de 2007. No entanto, ocorreu um aumento de 8,7% em relação ao segundo trimestre de 2008, indicando uma leve recuperação no número de animais abatidos destinados a exportação (IBGE, 2008).

Aproximadamente 7 milhões de cabeças de bovinos foram abatidas somente no 1º trimestre de 2009, representando um aumento de 1% em relação ao mesmo trimestre do ano anterior. Em relação ao 2º trimestre de 2009, o 3º trimestre apresentou um aumento de 4,6%. Esse aumento no número de animais abatidos se deveu ao aumento do consumo do mercado interno (IBGE, 2009).

1.3.2. Rebanho de bovinos brasileiro

Quando o Brasil foi descoberto, sabe-se que não existia nenhum espécime de bovino no novo continente. Estima-se que os primeiros bovinos da América do Sul apareceram em meados do século XVI, provavelmente de origem ibérica (PINEDA, 2000). Nos primeiros períodos da colonização os países do continente americano receberam somente raças espanholas, mas no Brasil também foram introduzidas raças de origem portuguesa (Mértola, Alentejana, Arouquesa,

Barrosã, Minhota e Mirandesa) 34 anos após o descobrimento do Brasil (MAZZA et al., 1994; PRIMO, 2000).

Os primeiros zebuínos chegaram ao Brasil no século XIX. Há estudos que demonstram que o primeiro rebanho de zebu estabelecido no Brasil, se situou na fazenda Santa Cruz, de propriedade do Imperador D. Pedro I, no Rio de Janeiro, cujos animais foram procedentes da região do Nilo, na África, em 1826. Existem várias citações de entrada de zebuínos no início do século XIX, no entanto as primeiras importações voltadas à criação ocorreram por volta de 1870-1875, por encomenda de pecuaristas dos estados do Rio de Janeiro e Bahia (SANTIAGO, A.A., 1987).

Em 1920 foi realizada a maior importação de zebuínos por criadores, um total de 804 cabeças. Até o ano de 1970, o total de zebuínos importados foi de 6.262 animais, e ocorreu principalmente nos estados de Rio de Janeiro, Bahia e Minas Gerais. (SANTIAGO, A.A., 1970).

Atualmente há estimativas que mostram que as raças zebuínas, predominantemente a Nelore, representam cerca de 80% da composição genética do rebanho brasileiro (AZEVEDO, 2008). Essa dominância da raça Nelore na pecuária nacional se deve às características da raça, no que diz respeito à fertilidade, rusticidade, adaptabilidade ao ambiente tropical e adequação ao sistema de produção extensivo (PINEDA, 2000). Assim, no Brasil o gado zebu (*Bos indicus*) compõe a maior parte dos rebanhos se comparado com o gado europeu (*Bos taurus*), que se restringe à região sul e algumas áreas das regiões sudeste e centro-oeste que apresentam climas de altitude.

Animais *Bos taurus* de raças continentais, como por exemplo, a Charolesa, apresentam grande proporção de músculo na carcaça (De ROUEN et al., 1992). No entanto, são animais tardios e com pouca deposição de gordura (VAZ et al., 2002). Já animais zebuínos, como o Nelore, são precoces para deposição de gordura subcutânea (RESTLE et al., 2002), mas se comparado ao Charolês, o Nelore apresenta baixa musculosidade (RESTLE et al., 2000). Diversos estudos demonstram que zebuínos e taurinos apresentam características contrastantes. Moletta e Restle (1992) estudaram ganho de peso na terminação em confinamento e peso aos 24 meses para novilhos Charolês e Nelore e, observaram superioridade do Charolês sobre o Nelore para tais características. Moletta e Restle (1996) verificaram maior peso de carcaça fria e maior musculosidade, resultando em melhor

conformação no Charolês e, encontraram melhor rendimento de carcaça e precocidade, resultando em melhor acabamento no Nelore. O maior rendimento de carcaça de animais zebuínos pode ser explicado pelo trato digestivo reduzido que eles possuem que é reflexo da adaptabilidade dos zebuínos às condições adversas nas quais evoluíram (África e Ásia), pelo menor peso relativo de patas e cabeça, pela menor espessura do couro e pela maior superfície relativa do corpo, que são indicativos de adaptação dos genótipos zebuínos aos climas mais quentes (PRESTON e WILLIS, 1970).

Em 1995, Restle e colaboradores analisaram uma população F1, produto de um cruzamento de Nelore e Charolês e, verificaram uma conformação semelhante ao Charolês e espessura de gordura igual ao Nelore. De modo que tais animais apresentaram, aos 24 meses, elevado peso de abate e de carcaça, com conformação classificada como boa e espessura de gordura adequada, segundo as exigências dos frigoríficos.

O cruzamento constitui uma importante ferramenta utilizada no melhoramento de bovinos de corte, e tem o objetivo de aumentar a produtividade do rebanho, permitindo a exploração de combinação entre características expressas diferentemente entre raças. Os cruzamentos podem ainda resultar em heterose, que pode trazer benefícios frente ao custo requerido, principalmente quando se trata do cruzamento entre raças com grande distanciamento genético, como acontece com raças taurinas e zebuínas (KOGER, 1980). No entanto o cruzamento apresenta algumas desvantagens, como ausência de manutenção da heterose obtida, pois a produtividade obtida em F1 não pode ser mantida, isto é, quando indivíduos F1 resultantes de cruzamento entre raças se reproduzem, há perda de heterose. (EUCLIDES FILHO, 2000).

Outra alternativa, que se utiliza da exploração da heterose, é a obtenção das raças sintéticas ou compostas. Uma raça composta é um grupo racial proveniente de um cruzamento entre duas ou mais raças, que pode ser acasalada entre si e manejada como raça pura (EUCLIDES FILHO, 2003). As raças compostas retêm uma importante parcela de heterose relacionada diretamente com a retenção de heterozigose, inclusive para muitas características economicamente importantes. A utilização de raças compostas, além de possibilitar aumento do uso de heterose, também permite melhor exploração da herança genética aditiva e exploração da complementaridade em um programa de cruzamentos em que estejam envolvidas

(EUCLIDES FILHO, 2000). Segundo Lindstron (1976) algumas vantagens da combinação de conjuntos gênicos para a formação de uma nova população são aumento no diferencial de seleção, diminuição no aumento da endogamia, aumento da variação genética e melhoramento rápido de algumas características. No entanto, também ocorre perda de heterozose quando os compostos são cruzados entre si.

Diversas raças compostas foram criadas e vêm ocupando lugar na cadeia produtiva como as raças Santa Gertrudes, Brangus-Ibagé, Bradford, Simbrasil, Girolando e Canchim (EUCLIDES FILHO, 2000; EUCLIDES FILHO, 2003). Christofari e colaboradores (2008) verificaram que no outono de 2004, no Rio Grande do Sul, a utilização de animais compostos para a produção de bezerros influenciou o preço final de venda. Bezerros Bradford, Brangus ou Canchim foram comercializados com maiores preços por kg de peso vivo e mais valorizados por apresentarem melhor qualidade de carcaça.

1.3.3. Raça Canchim

A formação da raça composta Canchim teve seu início em 1940, por intermédio do médico veterinário e zootecnista Dr. Antônio Teixeira Vianna. Esta raça consiste no cruzamento de animais Charoleses (*Bos taurus*) com animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) que, por meio de cruzamentos alternados, produziram mestiços com 5/8 Charolês e 3/8 Zebu, de cujo acasalamento resultou o Canchim (Figura 2). O Charolês foi escolhido por apresentar grande rendimento de carcaça. A raça Indubrasil compôs os zebuínos que mais contribuíram para a formação do Canchim, no entanto, também foram utilizados animais Guzerá e Nelore. A raça Indubrasil foi escolhida pela facilidade de se obter um plantel numeroso e a preços razoáveis (Associação brasileira de criadores de canchim Disponível em <http://www.canchim.com.br/raca.asp>. Acesso em 18/04/2008). Atualmente o zebuíno mais utilizado na composição do Canchim é o Nelore.



Figura 2. Animal da raça Canchim

O Canchim foi criado para a obtenção de carne de melhor qualidade nas condições brasileiras. Animais da raça Canchim são bovinos dóceis, de temperamento ativo, precoces, rústicos, mais resistentes aos ectoparasitos e ao calor do que indivíduos *Bos taurus* puros, possuem elevada capacidade digestiva para aproveitamento de forragens grosseiras, boa adaptação ao regime exclusivo de campo, conformação ideal para o corte, produção abundante de carne e pouca gordura de cobertura na idade de abate (MARQUES, 1976).

Atualmente existem duas linhagens (ou grupos genéticos) da raça Canchim, que diferem quanto às raças parentais e composição genética. O grupo genético denominado no presente trabalho CA, começou a ser formado a partir de 1953, por meio de cruzamentos entre 5/8 charolês + 3/8 zebu X 5/8 charolês + 3/8 zebu. A partir de 1987, o zebuino utilizado passou a ser somente Nelore, o qual, das raças zebuínas brasileiras, é das que apresentam maior produtividade. O grupo genético denominado MA começou a ser formado a partir de 1987. Ele é um mestiço resultante do cruzamento Charolês X 1/2 Canchim + 1/2 Nelore e possui 65,6% de Charolês. Hoje em dia existem animais CA que podem ser provenientes de três tipos de cruzamentos: MA x MA que produz um animal CA com 65,6% Charolês CA, x MA que produz um animal CA com 64,05% Charolês e CA x CA que produz um animal CA com 62,5% Charolês.

Muitos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar produção da raça Canchim. Luchiari Filho e colaboradores (1985 a,b) comparando Nelore e Canchim verificaram menor espessura de gordura, maior área de olho de lombo (AOL) e peso da porção comestível em Canchim. Em 1999, Perotto e colaboradores concluíram que se comparados Canchim e Aberdeen Angus, o Canchim é superior para peso de carcaça quente, rendimento de carcaça quente,

AOL, conformação, percentagem de músculos, peso da porção comestível da carcaça e peso de carcaça quente. No entanto, o Aberdeen Angus supera o Canchim quanto à espessura de gordura de cobertura, percentagem de gordura e percentagem de ossos.

Animais da raça Canchim têm sido utilizados em sistemas de cruzamento com o objetivo de obter cruzados de boa qualidade de carcaça. Barbosa e Silveira (1979) realizaram um estudo de avaliação da utilização do Canchim em sistemas de cruzamento terminal com fêmeas Nelore e aneloradas, e observaram que os animais cruzados possuíam 2,7 arrobas a mais que animais Nelore na mesma idade de abate. Nessa mesma linha de comparação, Alencar (1997) observou melhoria de 1,5 pontos percentuais no rendimento de carcaça em animais cruzados. Barbosa (2004) relatou que, em 2001, a utilização de touros Canchim em cruzamento terminal com fêmeas Nelore proporcionou ganho adicional de R\$ 3.304,80 por touro/ano, em relação à utilização de touros Nelore. Já Goulart e colaboradores (2008) observaram que mestiços Canchim × Nelore e Simental × Nelore e Nelores puros apresentaram menores pesos, menores ganhos, menor acabamento e menor exigência de energia em comparação a bovinos resultantes dos cruzamentos de Aberdeen Angus e Nelore.

1.3.4. Características da carne bovina

O funcionamento e bem estar do organismo dependem de uma alimentação balanceada. A carne bovina é componente essencial de uma dieta saudável (ROCHA, 2000), pois consiste em importante fonte de proteínas (que provêm todos os aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina, fenilalanina, triptofano, leucina, isoleucina e valina), vitaminas B12, niacina, B6, ferro, zinco e fósforo. Também possui ômega 3, riboflavina, ácido pantotênico, selênio, antioxidantes endógenos e outras substâncias bioativas como taurina, carnitina, carnosina, ubiquinona, glutathione e creatina. Em menor quantidade encontra-se gordura e sódio (WILLIAMS, 2007).

Diversos trabalhos têm mostrado os benefícios do consumo de produtos cárneos e lácteos produzidos por ruminantes a pasto (MACRAC et al.,

2005; NUERNBERG et al., 2005). Entretanto cresce a preocupação por parte da população quanto ao consumo de gorduras de origem animal. Na maioria dos casos isso ocorre por absorção de informações da mídia impressa ou televisiva (LOBATO e FREITAS, 2005). Mas, muitas vezes tais informações não têm fundamento científico, além do mais se deve considerar que o sedentarismo da população é um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças (FREITAS, 2006).

Há alguns fatores de risco que estão relacionados com ocorrência de doenças cardiovasculares como a idade, o histórico familiar (genética), inatividade física, fumo, obesidade, diabetes, pressão alta, altos níveis de colesterol total e LDL-colesterol (lipoproteínas de baixa densidade) e baixos níveis de HDL-colesterol (lipoproteínas de alta densidade). Desta maneira não se deve considerar que a ingestão de gorduras de origem animal seja a única responsável pelo desenvolvimento de certas doenças. No entanto, o consumo inadequado de gorduras de origem animal ou vegetal pode representar um fator de risco importante no desenvolvimento de doenças (LOBATO e FREITAS, 2005).

A gordura presente na carne bovina apresenta menor relação entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados e elevada concentração de saturados, em comparação à gordura presente na carne dos animais monogástricos. Essa diferença se dá, principalmente, devido ao processo de biohidrogenação que ocorre no rúmen pela ação de diferentes microrganismos (FRENCH et al., 2000). Por este motivo, o consumo de carne bovina tem sido desaconselhado por entidades que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares. Mas, os ácidos graxos também são componentes essenciais à vida. Estão envolvidos direta ou indiretamente na regulação metabólica e na modulação imunitária, participando na regulação homeoviscosa das membranas celulares (WAHLE, 1983; SPECTOR e YOREK, 1985), servindo de precursores na síntese de eucosanóides (MATHIAS e DUPOND, 1979) ou como mensageiros químicos intracelulares. Participam ainda da regulação da expressão de vários genes (SESSLER e NTAMBI, 1998) e da regulação da diferenciação de diversos tipos celulares (VANDEN HEUVEL, 1999).

A composição de ácidos graxos dos lipídios da carne, além de estar relacionada ao processo digestivo dos ruminantes, também é influenciada pela raça do animal, uma vez que há diferenças na deposição de gordura corporal entre diferentes raças (ZEMBAYASHI et al., 1995). Fernandes e colaboradores (2009)

estudando a composição de ácidos graxos e a qualidade do contrafilé (músculo *Longissimus*) de tourinhos das raças Nelore e Canchim alimentados com dietas contendo cana-de-açúcar e concentrados compostos de grãos de girassol, milho, farelo de soja, levedura seca de cana-de-açúcar, uréia e núcleo mineral, observaram que animais da raça Nelore apresentam carne com melhor composição de ácidos graxos na gordura intramuscular do ponto de vista da saúde humana. No entanto, bovinos Canchim apresentaram maior intensidade das cores vermelha e amarela no contrafilé e maior luminosidade da gordura de cobertura, este último um fator atrativo para o consumidor.

1.3.5. Características da carcaça bovina

O valor comercial da carcaça bovina é determinado por uma série de características, dentre elas pode-se destacar o peso, a gordura de cobertura (gordura subcutânea) e a gordura intramuscular (marmoreio) (PEROTTO et al., 1999). Segundo Luchiari Filho (2000), uma carcaça de qualidade deve apresentar o máximo de músculo, o mínimo de ossos e uma quantidade adequada de gordura para assegurar ao produto condições mínimas de manuseio e palatabilidade.

Segundo Leidenz (2000) e Fava Neves et al. (2003) os principais atributos de qualidade da carne bovina valorizados pelo consumidor são a palatabilidade (maciez, sabor e suculência), a aparência (cor, firmeza e marmorização), a conveniência (produto cortado ou fatiado), a nutrição (teores de ferro, zinco, colesterol, etc.) e a segurança alimentar (ausência de patógenos e de resíduos).

Fatores *ante mortem* (sexo, raça, idade ao abate e alimentação) e *post mortem* (tempo e temperatura de resfriamento e armazenamento) influenciam características como cor, maciez e rendimento de carcaça (LAWRIE, 1985; BERGE et al., 1999; WARRIS, 2003).

A qualidade de carcaça e de carne em gado de corte sofre influência da quantidade de gordura de cobertura, quantidade total e distribuição de gordura (WHEELER et al., 1994; LOZEMAN et al., 2001). A indústria frigorífica tem evitado carcaças com espessura de gordura abaixo de 3 mm e acima de 6 mm (RESTLE e

VAZ, 2003), pois um produto com cobertura de gordura inferior a 3 mm sofre escurecimento da parte externa dos músculos pelo frio das câmaras frigoríficas, e encurtamento das fibras musculares em função da maior velocidade de resfriamento, o que afeta negativamente a maciez da carne (JUNQUEIRA e ALEONI, 1998; KUYPERS, 2000). Sabe-se também, que a gordura é importante componente do sabor da carne bovina.

1.3.6. Metodologias para estimação de componentes de carcaça

Um método confiável para estimativa de composição corporal é muito importante em um programa de melhoramento de características de carcaça. Esse método deve ser confiável, com boa repetibilidade, facilmente conduzido, de baixo custo e aplicável a animais de diferentes idades, tamanhos, escores, raças e sexos (LUCHIARI FILHO, 1986).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de estimar composição de carcaça. Dentre eles há a avaliação visual, que é muito utilizada, mas não estima com precisão características relacionadas com desenvolvimento de musculatura e, explicam apenas de 20 a 25% da variação (GREGORY citado por HEDRICH 1983). Existem métodos que utilizam medidas realizadas diretamente na carcaça e que apresentam alta correlação com a característica, no entanto exigem muito tempo, abate do animal e alto custo (HEDRICK, 1983).

Muitas pesquisas têm dado atenção ao desenvolvimento de métodos não invasivos, como a ultrassonografia, a ressonância magnética e a impedância acústica (JENKINS et al., 1995). A ressonância magnética é a técnica mais precisa, mas apresenta alto custo e sua utilização em larga escala é inviável (FIGUEIREDO, 2000). A impedância acústica é um dos métodos que possui menor custo, mas para atingir alta precisão requer utilização juntamente com outras mensurações (JENKINS et al., 1995).

A ultrassonografia é uma maneira rápida, não invasiva e com boa acurácia para predição de componentes de carcaça. Diversos pesquisadores empregaram esta técnica para medir características de composição corporal de animais vivos (STOUFFER et al., 1961; KEMPSTER e OWENS, 1981; SIMM, 1983;

WILSON, 1992). As características da carcaça que podem ser medidas por ultrassonografia são área do olho do lombo, espessura de gordura, gordura da garupa e gordura intramuscular (SAINZ e ARAUJO, 2002).

O ultrassom se baseia no princípio de emissão de ondas sonoras de alta frequência acima da amplitude perceptível pelo ouvido humano (TOPEL e KAUFFMAN, 1988). Essas ondas são geradas por cristais que têm a capacidade de transformar energia elétrica em mecânica e vice-versa, assim quando estimulados eletricamente vibram emitindo uma onda sonora (THWAITS, 1984). Essas ondas produzidas passam através do tecido animal e, de acordo com o tipo de tecido a emissão do som sofre uma resistência (impedância acústica) distinta, e uma porção das ondas retorna na forma de eco até um transdutor encostado no animal. Esses sinais são recuperados, amplificados e projetados em um monitor, em que se pode interpretar a imagem (FERGUSON, 1994).

O uso da ultrassonografia para estimação da proporção de músculo e quantidade de gordura foi mais acurado do que o peso vivo e outras características de fácil mensuração em um estudo realizado por Wilson (1992). Vários estudos relatam boas correlações entre medidas realizadas por ultrassom e medidas feitas posteriormente na carcaça após abate (HEDRICK, 1983; ROUSE et al., 1992).

A utilização da ultrassonografia oferece várias vantagens, dentre elas a análise precoce dos animais sem necessidade de abate e nem de teste de progênie; o custo da avaliação individual é inferior ao custo do teste de progênie, com resultados equivalentes (SAINZ e ARAUJO, 2002) e, características de carcaça que apresentam herdabilidade média – alta estimadas por ultrassonografia, em alguns casos, apresentam resultados superiores às medidas diretas (RITCHIE, 2001). As medidas realizadas com o uso do ultrassom não sofrem o efeito da remoção, muitas vezes, irregular da gordura subcutânea por ocasião da retirada do couro do animal, que acaba provocando erros na tomada de medidas ao abate (FERGUSON, 1994). No entanto, esta técnica oferece algumas desvantagens, pois a acurácia depende da qualidade, da análise e interpretação correta das imagens. Assim a confiabilidade dos dados depende da habilidade do técnico que realiza a mensuração (SAINZ e ARAUJO, 2002).

1.3.7. Melhoramento genético animal e uso de marcadores moleculares

Os mercados nacional e internacional têm a cada dia exigido produtos com maior qualidade e dentro de padrões pré-estabelecidos. Assim, a obtenção de um produto de alta qualidade e com baixo custo têm sido almejado pelos pecuaristas e indústria frigorífica. Nesse contexto, o melhoramento animal apresenta grande importância.

No melhoramento genético clássico os principais processos utilizados para obtenção de progresso genético são o cruzamento entre raças e a seleção de indivíduos geneticamente superiores. Nos cruzamentos, se deseja explorar as diferenças genéticas existentes entre raças para a característica de interesse com a tentativa de reuni-las no mesmo indivíduo, por meio de acasalamentos (OLIVEIRA, 2006). Na seleção, procura-se identificar e selecionar, por meio de características fenotípicas, indivíduos geneticamente superiores e utilizá-los como reprodutores na composição do rebanho, sendo que melhores performances serão conseguidas ao longo das gerações. O progresso genético é obtido sem a necessidade de conhecimento dos genes envolvidos nas características que precisam ser melhoradas (KINGHORN et al., 2006).

Com o advento da utilização de enzimas de restrição e de técnicas de sequenciamento de DNA na década de 1970 e, do surgimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 1985, surge a possibilidade de a biologia molecular colaborar com programas de melhoramento, principalmente com o uso de marcadores moleculares relacionados a características economicamente importantes (FRANCO e MELO, 2006).

Os marcadores moleculares podem encontrar-se em desequilíbrio de ligação com genes que influenciam características de interesse econômico (marcadores indiretos) ou podem constituir variações de seqüência no próprio gene de interesse (marcadores diretos) (WILLIAMS, 2005).

A Seleção Assistida por Marcadores (MAS) se utiliza de marcadores moleculares para detecção de indivíduos geneticamente superiores e pode aumentar a acurácia da seleção tradicional. É importante enfatizar que deve ser realizada concomitantemente com a seleção clássica, pois dar ênfase a somente um ou poucos marcadores pode levar a perda da variabilidade em outros *loci*, o que

poderá dificultar ou até impedir ganhos genéticos futuros, além da possibilidade de ocasionar fixação de alelos desfavoráveis em outros *loci* que estejam em desequilíbrio de ligação com os marcadores (REGITANO et al., 2006).

A maioria dos relatos da literatura apontam que a incorporação de MAS em programas de melhoramento oferece maior benefício quando a característica sob seleção é de baixa herdabilidade, difícil e/ou de alto custo de mensuração ou que só pode ser medida em uma idade avançada como características de resistência a doenças, de qualidade de carne (maciez, deposição de gordura, dentre outras), eficiência produtiva e características relacionadas a produção de leite (BRITO et al., 2006) e, ainda características como habilidade materna, rendimento de carcaça, fertilidade e características limitadas pelo sexo (EENENNAAM, 2004). No entanto, estudos recentes demonstram que a incorporação de informação de marcadores na seleção de características de herdabilidade média a alta tem proporcionado melhores resultados, em relação a custo benefício, se comparados a características de baixa herdabilidade (TOGASHI & LIN, 2010). A utilização da MAS vai depender muito da arquitetura genética da característica, isto é, quantos genes estão envolvidos em sua expressão, o efeito de cada gene e a interação entre eles.

Há algumas etapas que devem ser cumpridas antes da utilização de MAS (REGITANO et al., 2006):

- _ Verificação da variação do marcador na população em que se pretende utilizá-lo;
- _ Avaliação da eficácia do marcador no rebanho em estudo (os efeitos podem variar entre as populações);
- _ Verificação da existência de interações não alélicas com os demais genes que compõem o genoma da espécie;
- _ Análise da interação do genótipo com o ambiente.

Existem no mercado alguns testes comerciais que são baseados em marcadores moleculares para características economicamente importantes. Dentre eles, podemos destacar o teste TenderGENETM (Frontier Beef Systems), que analisa duas variações na região codificadora do gene da calpaína e o teste GeneSTAR Tenderness (Genetic Solutions), que se baseia em um polimorfismo da calpastatina, sendo ambos testes indicativos de maciez (EENENNAAM, 2004).

Há basicamente duas formas de identificação de marcadores associados à caracteres quantitativos, como é o caso da maioria das características de interesse econômico: o uso de marcadores aleatórios na construção de mapas

genéticos saturados, que são empregados em análises de intervalos na identificação de QTLs (GELDERMANN, 1975) ou a detecção de polimorfismos em genes que podem estar diretamente relacionados com a característica de produção, denominados genes candidatos. O estudo e detecção de genes candidatos, que apresentam funções semelhantes, podem ser difíceis ou viesados pelo fato de que esses genes tendem a apresentar agregações físicas.

Avanços recentes na genética e biologia molecular estão criando novas oportunidades na produção animal, progressos recentes têm dado novo rumo à seleção assistida por marcadores. A recente possibilidade de genotipagem de milhares de SNPs de uma só vez em equipamentos com alta tecnologia, com os chamados chip de SNPs, vêm tornando possível utilizar a informação gerada em um espectro de significância em nível genômico e não mais cromossômico (GEORGES, 2006).

1.3.8. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são polimorfismos de DNA (VIGNAL, 2002). Eles podem ter diversas aplicações como, por exemplo, na inferência de processos demográficos, na realização de testes de paternidade, aplicações de cunho forense, estudos de associação com um dado fenótipo e estudos de mapeamento. É possível dividir os marcadores de DNA em duas classes: polimorfismos em seqüências do DNA de cópia única, como é o caso dos polimorfismos de um nucleotídeo (SNP) e variação de DNA repetitivo como, por exemplo, minissatélites e microssatélites (SCHLOTTERER, 2004).

1.3.9. SNP

A mudança de uma única base na seqüência de DNA com a possibilidade de dois ou mais nucleotídeos em uma dada posição constitui um marcador do tipo SNP. Para ser considerado um SNP é necessário que o alelo

menos freqüente apresente freqüência igual ou superior a 1% na população em estudo. A origem de SNPs está em variações individuais, oriundas de mutações de ponto (substituições, adições ou deleções de nucleotídeos) (VIGNAL, 2002). Segundo Collins e Jukes (1994) ocorrem duas vezes mais transversões (purina→pirimidina ou pirimidina→purina) do que transições (purina→purina ou pirimidina→pirimidina).

Apesar de serem usualmente bialélicos, portanto com baixo conteúdo de polimorfismo por loco, os SNPs oferecem algumas vantagens como: baixa taxa de mutação, grande abundância no genoma, facilidade de automação, podendo ser utilizado em estudos de distribuição de freqüência alélica (como por exemplo, inferências de eventos demográficos) e de desequilíbrio de ligação (SCHLOTTERER, 2004). Ainda pode ser utilizado em estudos de associação de genes candidatos com uma dada característica e de detecção de QTLs.

1.3.10. Principais estratégias para prospecção de SNP

Muitas técnicas de detecção de SNPs têm sido descritas com base em comparação de seqüências loco-específicas originadas de diferentes cromossomos. Atualmente há muitas tecnologias que podem ser utilizadas na detecção de SNPs, como descrito a seguir.

1.3.10.1. Eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE)

É uma técnica baseada no princípio de separação de produto de PCR, tendo como base diferenças na seqüência do DNA que resultem em diferenças de desnaturação. Aplica-se um agente químico desnaturante em um gel de poliacrilamida e seqüências de DNA diferentes irão desnaturar em diferentes concentrações de agente desnaturante e migrarão em velocidades diferentes resultando em padrões de bandas específicos para cada polimorfismo (FISCHER e LERMAN, 1983).

1.3.10.2. Clivagem química de pareamento imperfeito (CCM)

A tecnologia é baseada no fato de que citosinas e timinas, quando em fita simples, são oxidadas por hidroxilamina e KMnO_4 , respectivamente. Assim, para detecção de mismatch (identificação de SNP) pode-se expor seqüências a esses agentes. A base modificada quimicamente é depois clivada com piperidina e o ponto de mismatch pode ser detectado pelo tamanho do produto gerado pela clivagem em eletroforese em gel (COTTON et al., 1988; COTTON, 1999). As variações poderão ser detectadas com o uso de sondas complementares.

1.3.10.3. Polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP)

O princípio desse método está baseado na observação de que fitas simples de DNA ao renaturarem adquirem conformações espaciais específicas (estrutura terciária) dependentes de suas seqüências de bases (estrutura primária), e a taxa de migração de um segmento de DNA quando submetido a uma eletroforese depende dessa estrutura terciária (LIU et al., 1999). Assim, fragmentos de DNA que diferirem em um única base (SNP) apresentarão diferenças em suas estruturas terciárias e migrarão em velocidades distintas (ORTÍ et al., 1997; SUNNUCKS et al., 2000).

1.3.10.4. Cromatografia líquida desnaturante de alta performance (DHPLC)

Dois fragmentos são gerados por PCR, um no qual se deseja investigar a presença de SNPs e outro dito normal. Os fragmentos são desnaturados e submetidos a reanelamento gradual. Os produtos reanelados são aplicados em uma coluna de DHPLC. Se não houver SNP serão formados apenas homoduplex. Mas se o DNA contiver SNP, serão formados heteroduplex de DNA normal e mutado. Assim, homoduplex e heteroduplex apresentarão temperaturas de anelamento diferentes e

os últimos não serão retidos na coluna, gerando um padrão cromatográfico distinto do gerado quando não há SNP (OEFNER e UNDERHILL, 1995).

1.3.10.5. Finger printing mediado por RNA em espectrofotometria de massa

A espectrofotometria de massa de fragmentos de DNA pode ser empregada para detecção de SNPs, pois qualquer alteração de base irá mudar a massa do fragmento. No entanto, fragmentos de DNA grandes sofrem fragmentação no processo reduzindo a resolução e a sensibilidade (NORDHOFF et al., 1994). Assim, diferenças de uma única base podem ser adequadamente detectadas em fragmentos menores. No caso de fragmento grande, será necessária digestão com enzimas de restrição (CHIU et al., 2000), o que pode tornar o processo caro e trabalhoso. Ao contrário, o RNA sofre fragmentação mínima e consegue alta resolução sendo assim atrativo para utilização de espectrofotometria de massa (KWON et al., 2001; KREBS et al., 2001).

1.3.10.6. Sequenciamento por hibridização

É uma técnica em que é necessário conhecer a priori a seqüência a ser analisada. São construídos pequenos oligonucleotídeos que representam todos os segmentos do DNA alvo e estes são colocados sobre um chip. Conhecendo-se a seqüência do oligo de cada posição no chip, se pode inferir a seqüência de DNA em estudo por meio de uma sonda de DNA marcada com fluorescência, por análise do modelo de hibridização (PEASE et al., 1994). A maior vantagem desse método é a possibilidade de sequenciamento de grandes seqüências.

1.3.10.7. Sequenciamento direto

Há dois principais métodos de sequenciamento direto de DNA: o método químico de degradação de bases desenvolvido por Allan Maxam e Walter Gilbert em 1977 e o método didesoxi ou terminação da cadeia de Fred Sanger e colaboradores, em 1978 (REGITANO et al., 2007). Ambos os métodos se baseiam na produção de um conjunto de fitas simples de DNA que depois são separadas por eletroforese (OKUBO, 1992). No entanto, o método de Sanger gera dados simples de serem interpretados e é facilmente automatizado. Por este motivo essa técnica tem sido mais utilizada (STERKY e LUNDEBERG, 2000).

A partir de 2005, tecnologias denominadas de sequenciamento de nova geração começaram a ser comercializadas e vêm evoluindo com rapidez. Essas tecnologias proporcionam o sequenciamento de milhares de bases em uma só corrida, no entanto de fragmentos pequenos. Muitas plataformas vêm ganhando espaço no mundo todo como, por exemplo, a plataforma 454 FLX da Roche, a Solexa da Illumina, *SOLiD System* da Applied Biosystems e o *HeliscopeTrue Single Molecule Sequencing* (tSMS) da Helicos. A maior eficiência dessas plataformas, em relação ao método de Sanger, vem da utilização da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento (CARVALHO e SILVA, 2010).

1.3.10.7.1. Seqüenciamento didesoxi ou por terminação da cadeia

Este método se baseia na incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma fita de DNA que está sendo formada utilizando como molde o DNA de interesse. Assim que os ddNTPs são adicionados a cadeia, a extensão da mesma é interrompida pois os ddNTPs não possuem um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo (dNTP). Esses ddNTPs são marcados podendo ser detectados e a seqüência dos nucleotídeos identificada. Ao final de vários ciclos são obtidas várias cadeias de DNA de diversos tamanhos terminadas com diferentes ddNTPs

que posteriormente serão identificados em seqüenciador automático (REGITANO et al., 2007). Não é viável para detecção de SNPs em larga escala devido ao custo (VIGNAL, 2002).

1.3.11. Metodologias para genotipagem de SNPs

No processo de genotipagem de SNP geralmente ocorre geração de um produto alelo específico para o SNP de interesse com posterior detecção do genótipo. A maioria dos métodos inicia-se com a realização de PCR (KIM e MISRA, 2007). As metodologias de discriminação alélica são realizadas por meio de reações bioquímicas alelo-específicas. Segundo KIM e MISRA (2007) os métodos de extensão de primer, hibridização, ligação e clivagem enzimática são os mais utilizados. Após a reação de discriminação alélica os genótipos do SNP podem ser identificados com base em sua massa, fluorescência ou quimiluminescência.

A metodologia de extensão de primer é baseada na incorporação de deoxirribonucleotídeos específicos complementares a sequência de DNA alvo. Há muitas variações dessa tecnologia, no entanto segundo Kwok (2001) elas podem ser agrupadas em duas classes. Na primeira é utilizada uma adaptação do seqüenciamento, com a utilização de ddNTPs para identificação do nucleotídeo polimórfico, utilizando um primer comum para amplificação de ambos alelos. A segunda classe consiste numa PCR alelo-específica, em que a DNA polimerase amplifica o DNA alvo somente se os primers são perfeitamente complementares ao sítio do DNA alvo, utilizando-se assim primers específicos para detectar cada alelo. Os genótipos do SNP podem ser revelados segundo a massa ou fluorescência.

A hibridização tem como base a estabilidade térmica do DNA dupla fita para distinguir entre pares de sonda-DNA alvo perfeitos, para discriminar alelos de um SNP. A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA alvo. Assim, pode ser construída uma sonda para cada alelo. Uma ferramenta que utiliza esse princípio é o ensaio para genotipagem de SNP TaqMan® (Applied Biosystems, CA) que constitui uma combinação da hibridização e da atividade exonucleásica 5' da DNA polimerase, acoplada a detecção de fluorescência. (VEGA et al., 2005). Nesta metodologia há utilização de 2 sondas de oligonucleotídeos

alelo-específicas que possuem um corante fluorescente em uma extremidade (repórter), específico para cada sonda, e um corante não fluorescente na outra extremidade (quencher). A sonda intacta não apresenta fluorescência devido a proximidade entre repórter e quencher. A reação também conta com 1 par de primers flanqueando a região do SNP de interesse. Durante a reação, a DNA polimerase com sua atividade exonucleásica 5' cliva a sonda que se encontra perfeitamente hibridizada ocasionando separação entre repórter e quencher, provocando assim liberação de fluorescência. Dessa forma, ambos os alelos do SNP podem ser identificados segundo a fluorescência emitida por cada sonda específica (LIVAK et al., 1999).

A terceira metodologia de discriminação alélica mais popular é a ligação. É sabido que quando 2 oligonucleotídeos hibridizam perfeitamente a um DNA fita simples ficando um adjacente ao outro, a enzima DNA ligase tende a uni-los formando um único nucleotídeo. É nessa característica que essa metodologia se baseia. A reação consta de 3 sondas de oligonucleotídeos, sendo 2 alelo-específicas marcadas cada uma com um corante fluorescente diferente e a outra contendo biotina ligada e, que se ligará adjacientemente a sonda alelo-específica (LANDEGREN et al., 1988). Quando ocorre ligação perfeitamente complementar de uma sonda alelo-específica e, em sua adjacência, a ligação da sonda com biotina, a ligase as une formando um único oligonucleotídeo. Essa reação pode ser analisada, por exemplo, em eletroforese capilar para detecção dos alelos do SNP. Uma ferramenta que se utiliza dessa metodologia é o CFET (*combinatorial fluorescence energy transfer*) (TONG et al., 2001).

A habilidade de certas enzimas reconhecerem sequências específicas do DNA e efetuar clivagem nesse ponto constitui outra forma de discriminação alélica. Assim um alelo de um SNP pode criar ou destruir um sítio de restrição diferenciando o padrão eletroforético entre alelos de um dado SNP. Uma característica marcante de muitos desses sítios de clivagem é que estes possuem uma dupla simetria rotacional, isto é, a seqüência de reconhecimento é palindrômica e os sítios de clivagem são simetricamente posicionados. (BERGER et al., 2002). Uma técnica que utiliza tais enzimas para discriminar alelos de SNPs é o RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*).

Outra técnica que vem sendo empregada na discriminação alélica de SNPs é o ARMS (*Amplification Refractory Mutation Systems*). Há muitas variações

dessa técnica. A mais tradicional (ARMS-PCR) é realizada com a utilização de quatro primers: dois primers internos alelo específicos (denominados *inner primers*) e dois primers complementares à sequência que flanqueia o SNP, os primers externos (*outer primers*). Como os dois primers internos possuem sequência complementar à alelos específicos do SNP, cada primer se anelará apenas a região genômica que contém o alelo correspondente. Esses primers alelo-específicos contêm um mismatch no antepenúltimo nucleotídeo da extremidade 3' para aumentar a especificidade alélica. Os primers externos se ligam às regiões flanqueadoras à distâncias distintas em relação ao SNP, de forma a amplificar regiões de diferentes tamanhos dependendo do alelo presente. A Figura 3, retirada de YE et al. (2001), esquematiza o ARMS-PCR.

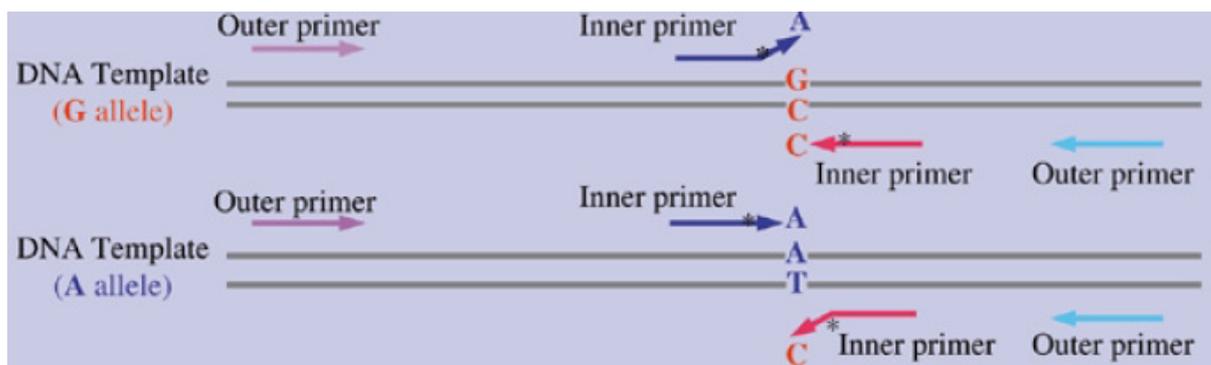


Figura 3. Representação esquemática do ARMS-PCR. Um único SNP foi usado como exemplo, uma substituição G/C. Dois amplicons alelo-específicos são gerados, usando 2 pares de *primers*, um par (indicado por setas em roxa e vermelha, respectivamente) gerando um amplicon que representa o alelo G, e outro par (indicado por setas azuis clara e escura, respectivamente) gerando um amplicon que representa o alelo A. A especificidade é garantida por um mismatch entre a extremidade 3' do *primer* (nucleotídeo específico de cada alelo do SNP) e por outro mismatch no antepenúltimo nucleotídeo da extremidade 3' do *primer* em relação ao DNA molde. O posicionamento dos 2 primers outer a diferentes distâncias do sítio polimórfico, faz com que os 2 amplicons alelo-específicos possuam tamanhos diferentes, tornando possível a discriminação alélica em um sistema de eletroforese.

Buitkamp e Semmer (2004) desenvolveram uma metodologia que denominaram de ARMS PRNP, baseada no ARMS-PCR. Essa metodologia é muito semelhante ao ARMS-PCR, exceto pelo fato de que possui apenas 3 primers, sendo 1 primer outer e 2 primers específicos. Outra diferença está no fato de que um dos primers alelo-específicos contém uma cauda degenerada de 4 pares de base, fato este que irá gerar amplicons de tamanhos diferentes específicos para cada alelo.

Novas tecnologias e equipamentos têm permitido a genotipagem de milhares de SNPs de uma só vez. Inicialmente, a impressão de oligonucleotídeos

em lâminas de vidro constituíram um grande avanço na quantidade de SNPs a serem genotipados de uma só vez, com o chamado microarranjo de DNA (HACIA et al., 1999). No entanto, o sucesso de tal metodologia consiste no processo de fabricação das lâminas, que é muito oneroso e difícil de padronizar.

Atualmente existem diversas empresas que desenvolveram tecnologias diferentes com a mesma finalidade: genotipagem de milhares de SNPs ao mesmo tempo. Uma dessas tecnologias que consiste em chips, que se constituem de sondas de pequenos oligonucleotídeos para interrogar sítios bialélicos, é a mais moderna tecnologia para genotipagem simultânea de milhares de SNPs. Para cada SNP avaliado no chip são construídas 4 sondas, sendo que para cada SNP, uma sonda com pareamento perfeito e outra com pareamento imperfeito para cada alelo do SNP analisado (XIAO et al., 2007).

Outra metodologia utiliza o sistema *BeadArray*, um microarranjo baseado na utilização de micro esferas de sílica (3 microns) que estão reunidas em micropoços contidos em substratos de feixes de fibras ópticas ou lâminas de sílica planas. Cada esfera é coberta com centenas de milhares de cópias de um oligonucleotídeo específico que capturam seqüências no ensaio de genotipagem. Os micropoços são uniformemente gravados na superfície do substrato a uma profundidade de 3 microns. As microesferas são inseridas nos micropoços e mantidas nestes por forças de Van der Waals e interações hidrostáticas com as paredes dos poços. Existem no mercado chips de SNPs para bovinos que genotipam cerca de 54.000 SNPs que estão espalhados por todo o genoma e que apresentam uma média de espaçamento entre os SNPs de 51,5 Kb. E, está para ser lançado o chip que interrogará 800.000 SNPs cobrindo todo o genoma (Disponível em http://www.illumina.com/technology/beadarray_technology.ilmn). Outras espécies também já possuem chips de SNPs disponíveis como humanos, ovinos, eqüinos, suínos e caninos (Illumina,Inc) e muitas outras estão em processo de desenvolvimento, demonstrando a alta posição que essas novas tecnologias têm tomado no cenário científico.

1.3.12. Marcadores moleculares e genes candidatos para associação com deposição de gordura em bovinos

Atualmente existem QTLs descritos para composição de carcaça e qualidade de carne que poderão ser utilizados em programas de melhoramento (STONE et al., 1999; CASAS et al., 2000; CASAS et al., 2001; MACNEIL e GROSZ, 2002; KIM et al., 2003; ABE et al. 2008; MALTECCA et al., 2009; GUTIE´RREZ-GIL et al., 2008; SHERMAN et al., 2009).

No que se refere à deposição de gordura, muitos trabalhos também têm demonstrado muitas regiões associadas a tal característica em bovinos. Casas et al. (2003) e Stone et al. (1999) identificaram um QTL significativo para marmoreio no cromossomo 2 de bovinos (BTA2). Li et al. (2004) identificaram associações significativas para EBV (valor genético estimado) para espessura de gordura subcutânea no BTA5, BTA6, BTA21 e no BTA23 de animais *Bos taurus*. Casas et al. (2000) encontraram um QTL para deposição de gordura no BTA5 e Mizoguchi et al. (2006) encontraram regiões de QTL para marmoreio no BTA6, BTA4 e BTA21. Taylor et al. (1998) detectaram um QTL para espessura de gordura subcutânea no BTA19.

Apesar das associações de regiões genômicas com características de interesse econômico geralmente apresentarem intervalos de confiança grandes, de vários centimorgans, é possível indicar alguns genes dentro desses intervalos como candidatos a influenciar a variação da deposição de gordura em bovinos.

O gene da leptina foi mapeado no BTA4 (STONE et al., 1996). Buchanan e colaboradores (2002), estudando um SNP do exon 2 do gene da leptina, demonstraram que o mesmo está associado com a quantidade de gordura na carcaça. No entanto, Santiago, A.C. e colaboradores (2008) estudando um polimorfismo do intron 2 do gene da leptina em populações de Canchim e MA não encontraram efeito significativo sobre a variação de espessura de gordura subcutânea. Próximo à região do QTL para marmoreio detectado entre 59-67 cM do BTA4 por Mizoguchi e colaboradores (2006) está o gene IGFBP3 (*proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*). Como o BTA4 possui relatos de QTL para deposição de gordura e na população Canchim em estudo o gene da leptina, um dos prováveis candidatos, não foi associado à espessura de gordura

subcutânea (SANTIAGO, A.C., et al., 2008), o gene IGFBP3 pode ser um candidato a influenciar tal característica nessa população.

Nos BTAs 6 e 10 a literatura aponta os genes PPARGC1A (*coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A*) (WEIKARD et al., 2005) e PSMC1 (*subunidade 26S ATPse do proteassomo*) (GUO et al., 2008) como relacionados à deposição de gordura em bovinos.

A região centromérica do BTA14 (cromossomo 14 de *Bos taurus*) é conhecida por conter QTL para produção e porcentagem de gordura no leite (COPPIETERS et al., 1998; HEYEN et al., 1999; RIQUET et al., 1999). Grisart e colaboradores (2002) e Winter e colaboradores (2002) sugeriram uma mutação no gene *diacilglicerol aciltransferase* (DGAT1) como possível causa da variação atribuída a este QTL. Moore e colaboradores. (2003) não encontraram associação entre *DGAT1* e EBV para espessura de gordura. Casas e colaboradores (2000) e Moore e colaboradores (2003) descreveram um QTL para espessura de gordura na região centromérica do BTA14. Nessa região foi mapeado o gene para *tireoglobulina* (THREADGILL et al., 1990; DASKALCHUK e SCHMUTZ, 1997) e, por algum tempo, este foi apontado como um gene candidato para características de deposição de gordura em gado de corte. Barendse et al. (2001) e Wood et al. (2006) associaram um polimorfismo na sequência 5' líder do gene da *tireoglobulina* (Tg5) com marmoreio e este polimorfismo é a base do teste comercial GeneStar Marbling™ (Genetic Solution). No entanto, Casas e colaboradores (2005) encontraram associação do mesmo polimorfismo com espessura de gordura, mas não com marmoreio, assim como Rincker et al. (2006) que também não encontraram associação de Tg5 com gordura intramuscular. Gan e colaboradores (2008) identificaram 6 SNPs na região 3' desse gene e os SNPs G133C, G156A, C220T e A506C foram significativamente associados com escore de marmoreio. Ressalta-se que esses resultados são frutos de estudos realizados com animais *Bos taurus*. Em 2007 foi realizado um estudo de associação de espessura de gordura com Tg5 em animais Canchim (5/8 Charolês e 3/8 Zebu) e, não foi obtido resultado significativo (VENERONI, 2007). Naquele estudo foi também testada associação com o microsatélite CSSM066, localizado a 3,9 Mb (mega base) no BTA14, próximo ao gene da *tireoglobulina*, e o mesmo foi significativo para a característica em questão. Esses resultados corroboram os resultados de Moore et al. (2003), que também não identificaram associação entre Tg5 e estimativas de valores genéticos (EBV) para

espessura de gordura, mas sim com o *locus* CSSM066. A montagem do genoma bovino “Build 4.1 - based on Btau_4.0”, disponível no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<www.ncbi.nlm.nih.gov>) relatou outros genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e diferenciação de adipócitos e que, se encontram na região de QTL para espessura de gordura na região centromérica do BTA14, como os genes do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* (DDEF1), do *hormônio liberador de corticotrofina* (CRH) e da *proteína ligante de ácido graxo 4* (FABP4) que poderiam ser testados para associação.

1.3.13. IGFBP3

O gene IGFBP3 está localizado a 78,8 Mb no BTA4. Possui 7.426 pb, um transcrito de 2.434 pares de bases e sete exons (BIRNEY et al., 2009).

IGFBPs (proteínas ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina) regulam, juntamente com o hormônio de crescimento (GH) e outros moduladores endócrinos, a atividade de IGF (fator de crescimento semelhante à insulina). A ação de IGF é muito influenciada pela presença de IGFBPs. Ballard e colaboradores (1988) clonaram e caracterizaram seis IGFBPs em humanos e roedores e propuseram que estas seriam similares as de animais domésticos. A ação de IGFBPs pode ter caráter endócrino, parácrino ou autócrino e seu mecanismo de ação pode ser de forma a estimular ou inibir a atividade de IGF (HOSSNER et al., 1997). IGFBP1, 2, 3 e 5 aumentam a atividade mitogênica em estudos *in vitro* (ZAPF, 1995) e IGFBP4 exibe somente efeitos inibitórios.

O gene IGFBP3 codifica uma proteína com um domínio IGFBP e um domínio da tireoglobulina tipo I. A proteína forma um complexo terciário com a subunidade ácido lábil do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFALS) e outro IGF I ou II. Nessa forma esta circula no plasma prolongando a meia vida de IGFs e também altera a interação de IGFs com receptores da superfície celular (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=3486).

Marcadores moleculares no gene IGF-I já foram associados com características de crescimento em bovinos da raça Canchim (ANDRADE et al., 2008). Em relação à porcentagem de gordura na carcaça, a literatura apresenta resultados conflitantes da relação entre essa característica e IGF-I em gado e ovelha (ANDERSON et al., 1988; MCCANN et al., 1997). Estudos com IGFBPs, influenciadores da atividade de IGF-I, para com essas características são escassos. Connor et al. (2000) associaram níveis de IGF-1 do plasma com área de olho de lombo e altura das ancas. Nesse mesmo estudo níveis de IGFBP-3 não se mostraram bons indicadores de desempenho de crescimento ou características de carcaça em bovinos em fase de crescimento. No entanto, modelos que combinaram idade a desmama, níveis de IGFBP-2 e GH foram eficientes para prever ganho médio diário de peso pós desmama em touros jovens.

Em humanos, níveis de IGFBP1 mostraram sugestiva associação com massa gorda (SOUREN et al., 2008). Um estudo realizado com crianças demonstrou que IGFBP1 e IGFBP3 são inversamente relacionados à adiposidade em crianças hispânicas (TOLEDO-CORRAL et al., 2008).

Em bovinos, os genes que codificam essas proteínas ainda não foram testados para associação com deposição de gordura. IGFBP3 está localizado no BTA4 (78,8 Mb) em uma região de QTL para marmoreio (MIZOGUCHI et al., 2006) próximo ao gene da leptina, podendo ser apontado como um gene candidato a ser testado para associação com tal característica.

1.3.14. PPARGC1A

O gene PPARGC1A foi mapeado a 44,7 Mb no BTA6 (WEIKARD et al., 2005). Possui 107.803 pb e 13 exons (BIRNEY et al., 2009). O produto desse gene é um co-ativador de um subconjunto de genes ligados a fosforilação oxidativa que controla o transporte e oxidação de glicose e lipídios, está envolvido na formação das fibras do músculo esquelético e biogênese mitocondrial (SORIA et al., 2009). Esse gene é altamente expresso em organismos com metabolismo ativado e o produto dele controla ações ligadas a termogênese adaptativa, adipogênese e gliconeogênese. A expressão de genes envolvidos nesses processos é controlada

por interações entre uma variedade de fatores de transcrição (PUIGSERVER, 2005; LIANG e WARD, 2006).

A literatura tem apontado vários indícios que reforçam que o gene PPARGC1A é um forte gene candidato para características de deposição de gordura. Em humanos foram descritos polimorfismos do gene PPARGC1A, em uma região associada com concentração de insulina sérica e obesidade, que foram associados com resistência à insulina, suscetibilidade a diabetes tipo II (SUN et al., 2006) e indicadores de obesidade (SEMPLE et al., 2003). Stachowiak e colaboradores (2007) associaram um SNP desse gene com características de gordura em suínos. Weikard e colaboradores (2005) identificaram um SNP no intron 9 (T/C) do gene PPARGC1A que se mostrou associado com produção de gordura no leite em bovinos.

1.3.15. PSMC1

O gene PSMC1 foi mapeado no BTA10 (104,9 Mb), possui 9.855 pb e 10 exons (BIRNEY et al., 2009). O produto desse gene é uma enzima multicatalítica que possui papel central em muitas vias regulatórias, como as vias de ciclo celular, diferenciação celular e apoptose (Guo et al., 2008). Guo e colaboradores (2008) identificaram um SNP (A/G) no intron 9 desse gene, que foi associado com média de consumo alimentar diário, ganho médio diário, ganho médio diário em terminação, comprimento do corpo, eficiência alimentar, espessura de gordura subcutânea e área de olho de lombo.

1.3.16. DDEF1

O gene DDEF1 encontra-se a 9,7 Mb no BTA14, possui 31 exons e um transcrito de 5,330 pares de bases (BIRNEY et al., 2009). DDEF1, também conhecido como Arf-GAP, é uma proteína ligante de SH3 Src (domínios que se ligam a proteínas alvos por meio de seqüências que contêm prolina e aminoácidos

hidrofóbicos), possui repetições anquirinas (proteínas globulares que unem o citoesqueleto à membrana plasmática, além de promover o ligamento entre o mesmo e membranas de organelas intracelulares, e caracterizam-se por apresentar repetições altamente conservadas, constituídas por -G-TPLH-AA—GH---V/A—LL—GA---N/D---- (CARVALHO et al., 2003) além de domínios plequistrinos (domínios comumente encontrados em proteínas de sinalização eucarióticas, que possuem muitas funções, dentre elas a habilidade de se ligar a fosfatos inositois). DDEF1 é uma proteína ativadora do fator de GTPase (domínio Arf-GAP) que ribosila ADP. Interage com proteínas de transdução de sinais envolvidas no crescimento e diferenciação celular (como SRK, FAK, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato e CRK) e ainda regula o remodelamento do citoesqueleto de actina, que é necessário para a motilidade celular (LIU et al., 2002; BROWN et al., 1998; KING et al., 1999).

A motilidade celular envolve uma inibição da expansão celular seguida por extensão da lamela elástica periférica na direção de locomoção, que requer o contínuo remodelamento do citoesqueleto de actina e reunião/separação de adesões focais, conduzindo e arrastando as extremidades, resultando na motilidade celular (STOSSEL, 1993). A proteína DDEF1 se localiza em complexos focais em formação na periferia das células e regula a mudança cíclica no citoesqueleto e adesões focais (RANDAZZO et al., 2000). A super expressão da proteína DDEF1 interrompe a re-adesão focal, desse modo bloqueando a expansão e promovendo a motilidade celular (FURMAN et al., 2002). A relação entre DDEF1 e adipogênese foi demonstrada por King et al. (1999) que purificaram e clonaram a proteína DDEF1 de células de cérebro bovino e observaram, *in vitro*, que a expressão desta proteína resultou na diferenciação de fibroblastos em adipócitos.

1.3.17. CRH

O gene para o hormônio liberador de corticotrofina foi mapeado no BTA14 (30,4 Mb). Possui 1.617 pb, um transcrito de 584 pares de bases e dois exons (BIRNEY et al., 2009).

O produto desse gene está envolvido na secreção da adrenocorticotrofina pituitária (SEASHOLTZ et al., 2002). O CRH liberado do

hipotálamo para a hipófise anterior sob condições de estresse estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico, que aumenta os níveis de cortisol. O cortisol pode exercer vários efeitos no metabolismo como estimular a gliconeogênese, inibir captação de glicose no músculo e tecido adiposo e estimular a liberação de gordura do tecido adiposo (WIBOWO et al., 2007). Entre os efeitos do cortisol estão o aumento da atividade locomotora e inibição do consumo de alimentos (ROTHWELL, 1990). Wibowo et al. (2007) identificaram cinco SNPs nesse gene (um na região promotora e quatro no exon 2) e encontraram associação do SNP contido no promotor (g.9657C>T), e de dois SNPs do exon 2 (c.10718G>C e 10936G>C), com deposição de gordura subcutânea em uma população F2 de Wagyu x Limousin, sugerindo ser esse gene um candidato a influenciar a deposição de gordura em bovinos. No entanto, Sherman e colaboradores (2008) estudando características de deposição de gordura, dentre outras, em bovinos não verificaram associação destas com dois SNPs denominados pelos autores como CRH SNP1 e CRH SNP2 (os mesmos SNPs avaliados por Wibowo et al. 2007 e nomeados por esses autores como c.10718G>C e 10936G>C, respectivamente) presentes no exon 2 do gene da corticotrofina discordando dos resultados de Wibowo et al. (2007) que encontraram associação de tais SNPs do exon 2 com a característica.

1.3.18. FABP4

O Gene FABP4 foi mapeado a 41,9 Mb no BTA14, possui 5.591 pb e 4 exons (BIRNEY et al., 2009). É um componente da família de proteínas ligantes de ácido graxo que tem grande papel na regulação de homeostase de lipídeos e glicose. Codifica uma proteína citoplasmática que liga longas cadeias de ácidos graxos e outros ligantes hidrofóbicos (DAMCOTT et al., 2004). Essa proteína ativa uma isoforma de receptores PPAR - gama (*peroxisome proliferator activated receptors*) que regulam a transcrição do gene FABP4. Desempenha um papel importante na absorção de ácidos graxos e interage com lipases (MICHAL et al., 2006). SNPS do gene FABP4 foram relacionados com marmoreio e deposição de gordura subcutânea em uma população de Wagyu x Limousin (MICHAL et al., 2006).

1.4. Referências Bibliográficas

ABE, T. et al. Bovine quantitative trait loci analysis for growth, carcass, and meat quality traits in an F2 population from a cross between Japanese Black and Limousin. **Journal of animal science**, v. 86, n. 11, p. 2821-32, 2008.

ALENCAR, M. M. Utilização do touro Canchim em cruzamento comercial. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 3., 1997, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa pecuária sudeste/São Paulo: ABCCAN, 1997. p.19-33.

ANDERSON, P. T. et al. The relationship between composition of gain and circulating hormones in growing beef bulls fed three dietary crude protein levels. **Journal of animal science**, v. 66, p. 3059–3067, 1988.

ANDRADE, P. C. et al. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics**, v. 39, p. 480–485, 2008.

AZEVEDO, D.M. **A pecuária de corte no Brasil: a importância da fêmea bovina.** Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/colunistas/ColunaDetalhe.aspx?CodColuna=2796>>. Acesso em: 10/04/2008.

BALLARD, F. J. et al. Specific binding of insulin-like growth factors I and II to the type I and type II receptors respectively. **Biochemistry Journal**, v. 249, p. 721-726, 1988.

BARBOSA, P. F.; PRIMAVESI, O.; TUPY, O. Impacto econômico da utilização de touros da raça canchim em sistemas de cruzamento terminal com fêmeas nelore. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., julho/2004, Pirassununga/SP **Anais....** Pirassununga/SP, 2004.

BARBOSA, P. F.; SILVEIRA, F. J. **Utilização do Canchim em cruzamentos.** São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Canchim, 1979.

BARENDSE, W. et al. **The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle.** Disponível em: <www.Beef.crc.org.au/Publications/Marblingsym/Day1/Tg5DNA>. Acesso em: Março 2006, 2001.

BERGE, P. et al. Variations of meat composition and quality in different commercial lamb types. In: 45th ICoMST, v. 45, n. 45, 1999, p. 502-503.

BERGER, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. 6.1: The basic tools of gene exploration. In: **Biochemistry**. 5th ed. 2002

BIRNEY, E. et al. Ensembl 2009. **Nucleic Acids Research**, Jan 1; 34. Database issue:D556-D561. 2009.

BRITO, F.V. et al. **A biotecnologia no melhoramento genético animal**. 26/12/2006 Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/?noticialID=33237&actA=7&areaID=60&secaoID=170>. Acesso em: 02/-5-2008.

BROWN, M.T. et al. ASAP1, a phospholipid-dependent arfG TPaseactivating protein that associates with and is phosphorylated by Src. **Molecular and cellular biology**, v.18, p.7038-51, 1998.

BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and the leptin mRNA levels. **Genetics, Selection and Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.

BUITKAMP, J. e SEMMER, J. A robust, low- to medium-throughput prnp genotyping system in sheep. **BMC Infectious Diseases**, v.4, p .30, 2004.

CARVALHO, I. C.; SAAD, S. T. O. Clonagem e caracterização de um novo gene humano relacionado à família das anquirinas. In: XI CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP. **Anais...** 2003.

CARVALHO, M.C.C.G e SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.3, p.735-744, 2010.

CASAS, E. et al. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 2-6, 2003.

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E. et al. A comprehensive search for QTL affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 854–860, 2001.

CASAS, E. et al. 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**, v. 83, p.13–19, 2005.

CHIU, N. H. et al. Mass spectrometry of single-stranded restriction fragments captured by an undigested complementary sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 28, e.31, 2000.

CHRISTOFARI, L. F. et al. Tendências na comercialização de bezerros relacionadas às características genéticas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, n.1, p.171-176, 2008.

COLLINS, D.W. e JUKES, T.H. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence, **Genomics**, v. 20, p. 386-396, 1994.

CONNOR, E. E. et al, Predicting growth in angus bulls: the use of GHRH challenge, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins. **Journal of animal science**, v. 78, p. 2913-2918, 2000.

COPPIETERS, W. et al. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. **Mammalian genome**, v. 9, p. 540–544, 1998.

COTTON, R. G. Mutation detection by chemical cleavage. **Genet. Anal.**, v.14, p. 165-168, 1999.

COTTON, R. G.; RODRIGUES, N. R.; CAMPBELL, R. D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 85, p. 4397-4401, 1988.

DAMCOTT, C.M. et al. Genetic variation in uncoupling protein 3 is associated with dietary intake and body composition in females. **Metabolism**, v. 53, p.458-464, 2004.

DASKALCHUK, T. E.; SCHMUTZ, S. M. Genetic mapping of thyroglobulin on bovine chromosome 14. **Mammalian genome**, v. 8, p. 74-76, 1997.

DAVIS, G. P. e DeNise, S. K. The Impact of Genetic Markers on Selection. **Journal of Animal Science**, v. 76, p.2331–2339, 1998.

DeROUEN, S.M. et al. Direct and maternal genetic effects for carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p. 3677-3685, 1992.

EENENNAAM, A. V. **Marker-Assisted Selection in Beef Cattle**. Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf> Acesso em: março de 2006, 2004.

EUCLIDES FILHO, K. Programas em raças sintéticas. In: III SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL. **Anais....** 2000

EUCLIDES FILHO, K.; FIGUEIREDO, G. R. Retrospectiva e perspectivas de cruzamentos no Brasil. In: 1º. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CRUZAMENTO DE BOVINOS DE CORTE. 20 e 21 de novembro, Londrina/Pr. 2003. **Anais...** Londrina/Pr. 2003.

FAVA NEVES, M.; SCARE, R. F.; CAVALCANTI, M. DA R. **Comercialização internacional de produtos animais provenientes de pastagens**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br>>. Acesso em: 22 de setembro, 2003.

FERGUSON, D. M. New technologies: ultrasonics (Contract review). Proceedings of the Australian Society of Animal Production, **Perth**, v. 20, p. 40-42, 1994.

FERNANDES, A. R. M et al. Composição em ácidos graxos e qualidade da carne de tourinhos Nelore e Canchim alimentados com dietas à base de cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 2, p. 328-337, 2009.

FIGUEIREDO, F. G. G. **Estimativas de parâmetros genéticos de características de carcaça feitas por ultrassonografia em bovinos da raça Nelore**. 2000. 52 p. Tese (mestrado) Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2000.

FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 80, p.1579-1583, 1983.

FRANCO, M. M.; MELO, E. O. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Brasília. Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 14 p. (Documentos, Embrapa recurso genéticos e biotecnologia 0102-0110; 188), 2006.

FREITAS, A. K. **Características da carcaça, da carne e perfil dos ácidos graxos de novilhos Nelore inteiros ou castrados em duas idades**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2006.

FRENCH, P. et al. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate based diets. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 11, p. 2849-2855, 2000.

FURMAN, C. et al. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, p. 7962-9, 2002.

GAN, Q. F. et al. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. **Journal of applied genetics**, v.49(3) , p. 251–255. 2008.

GELDERMANN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers: I. Methods. **Theoretical and applied genetics**, v. 46, p. 319-330, 1975.

GEORGES, M. Animal breeding in the genomics era. In: XXIV WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2006, NICE, FRANCE. **Anais...2006**

GOULART, R. S. et al. Composição corporal e exigências líquidas de proteína e energia de bovinos de quatro grupos genéticos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 926-935, 2008.

GRISART, B. 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, 2002.

GUO, H. et al. Mapping, expression, and association study of the bovine PSMC1 gene. **Biochemical genetics**, v. 46; n. 5-6, p. 347-55, 2008.

GUTIE´RREZ-GIL, B. et al. Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. **Animal Genetics**, v. 39, p. 51-61, 2008.

HACIA, J.G. et al. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, v.22, n.2, p.164-7, 1999.

HEDRICH, H. B. Methods of estimating live animal and carcass composition. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 5, p. 1316-26, 1983.

HEYEN, D. W.; WELLER, J. I.; RON, M. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiological genomics**, v.1, p. 165–175, 1999.

HOSSNER, K.L.; MCCUSKER, R.H.; DODSON, M.V. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. **Animal Science**, v. 64, p. 1-15, 1997.

IBGE, **Estatística da produção pecuária**, 31 p. Março de 2008.

IBGE, **Estatística da produção pecuária**, p.4. Dezembro de 2009.

IBGE, **Produção da pecuária municipal**, v.34, 2006.

JENKINS, T.G.; LEIMASTER, K.A.; MACNEIL, M.D. Development and evaluation of a regression equation of prediction for fat-free soft tissue in heterogenous populations of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3627-32, 1995.

JUNQUEIRA, J. O.; ALEONI, G. O. O ponto de vista das áreas de ensino e pesquisa. In. WORKSHOP EM QUALIDADE DA CARNE E MELHORAMENTO GENETICO DE BOVINOS DE CORTE, São Carlos, 1998. **Anais...** São Carlos Embrapa pecuaria Sudeste, 1998. p. 69-75.

KEMPSTER, A. J.; OWEN, M. G. A note of the accuracy of an ultrasonic technique for selecting cattle of different breeds for slaughter at equal fatness. **Animal Production**, v. 32, p. 113-115, 1981.

KIM, J. J. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1933–1942, 2003.

Kim, S.; Misra, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 9, p. 289–320, 2007.

KING, F. J. et al. DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 2330-7, 1999.

KINGHORN, B.; WERF, J. V. D.; RYAN, M. Capítulo3. **Melhoramento animal: uso de novas tecnologias**. Piracicaba: FEALQ, 367p., 39-40. 2006

KOGER, M. Effective crossbreeding systems utilizing zebu cattle. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 1213-1220, 1980.

KREBS, S.; SEICHTER, D.; FORSTER, M. Genotyping of dinucleotide tandem repeats by MALDI mass spectrometry of ribozyme-cleaved RNA transcripts. **Nature biotechnology**, v. 19, p. 877-880, 2001.

KUYPERS, R. Meat tenderness: an examination of breed differences, post mortem processing, and their interactions. **S.I. : Food Science Australia**, 114p. (Final report of project STR023 meat and livestock australia). 2000.

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Annual review of genomics and human genetics**, v.2, p. 235–58, 2001.

KWON, Y. et al. DNA sequencing and genotyping by transcriptional synthesis of chain-terminated RNA ladders and MALDI-TOF mass spectrometry. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p.11. 2001.

LANDEGREN, U. et al. A ligase-mediated gene detection technique. **Science**, v. 241, p. 1077–80, 1988.

LAWRIE, R. **A Meat Science**. Pergamon Press, Oxford. 293p. 1985.

LEIDENZ, N. H. Parâmetros de qualidade de carne para o início do milênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 2000, Uberaba. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 2000. p. 243-259.

LI, C. et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 967-972, 2004.

LIANG H. e WARD W.F. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. **Advances in physiology education**, v. 30, p.145–151, 2006.

LINDSTRON, U. B. Utilizing animal gene resources. **World Animal Review**, Rome, v.18, p.1-8, 1976.

LIU, Q. et al. Detection of virtually all mutations-SSCP (DOVAM-S): a rapid method for mutation scanning with virtually 100% sensitivity. **Biotechniques**, v. 26, p. 932-942. 1999.

LIU, Y. et al. The association of AS AP1, an ADP ribosylation factor-GTPase activating protein, with focal adhesion 18 kinase contributes to the process of focal adhesion assembly. **Molecular and cellular biology**, v. 13. p. 2147-56, 2002.

LIVAK, K.J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. **Genetic analysis : biomolecular engineering**, v.14, p. 143–49, 1999.

LOBATO, J. F. e FREITAS, A. K. Carne bovina: mitos e verdades: Parte da apresentação do primeiro autor no Simpósio Pré-Congresso do 60^o Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia, FIERGS, Porto Alegre, 17/09/2005.

LOZEMAN, F. J. et al. Characterization of microsomal diacylglycerol acyltransferase activity from bovine adipose and muscle tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 105–115, 2001.

LUCHIARI FILHO, A. **Characterization and prediction of carcass cutability traits of zebu and crossbreed types of cattle produced in southeast Brazil**. 1986. 89p. Tese (Doctor of philosophy) - Kansas State University. Manhattan, 1986.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife. 134p. 2000.

LUCHIARI FILHO, A. et al. Efeito do tipo de animal no rendimento da porção comestível da carcaça. I. Machos da raça Nelore vs Zebu x europeu terminados em confinamento. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 42, n. 1, p. 31-39, 1985a.

LUCHIARI FILHO, A. et al. Efeito do tipo de animal no rendimento da porção comestível da carcaça. II. Machos da raça Nelore vs Zebu x europeu terminados a pasto. **Boletim Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 42, n. 2, p. 143- 148, 1985b.

MACNEIL, M.D. e GROSZ, M.D. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford X composite double backcross populations. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2316–2324, 2002.

MacRac, J.; O'REILLY, L.; MORGAN, P. Desirable characteristics of animal products from a human health perspective. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 95–103, 2005.

MALTECCA, C. et al. Whole genome scan for quantitative trait loci associated with birth weight, gestation length and passive immune transfer in a Holstein · Jersey crossbred population. **Animal Genetics**. doi:10.1111/j.1365-2052. 2009.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. Livraria Nobel, 3ª. edição, 1976.

MATHIAS, M. M.; DUPONT, J. The relationship of dietary fats to prostaglandin biosynthesis. **Lipids**, v.14, p. 247-252, 1979.

MAZZA, M. C. M. et al. **Etnobiologia e conservação do bovino Pantaneiro**. EMBRAP-CPAP - Corumbá. 61 p. 1994.

MCCANN, J. P. et al. Differential effects of GH stimulation on fasting and prandial metabolism and plasma IGFs and IGF-binding proteins in lean and obese sheep. **The Journal of endocrinology**, v. 154, p. 329–346, 1997.

MICHAL, J.J. et al. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, p. 400-402, 2006.

MIZOGUCHI, Y. et al. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. **Animal Genetics**, v. 37, p. 51-54, 2006.

MOLETTA, J. L. e RESTLE, J. Desempenho em confinamento de novilhos de diferentes grupos genéticos. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p. 227-233, 1992.

MOLETTA, J. L. e RESTLE, J. Características de carcaça de novilhos de diferentes grupos genéticos terminados em confinamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 5, p. 876-888, 1996.

MOORE, S.S. et al. 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.

NORDHOFF, E. et al. Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 2460-2465. 1994.

NUERNBERG, K. et al. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of Longissimus muscle in different cattle breeds. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 137–147, 2005.

OEFNER, P.J. e UNDERHILL, P.A. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). **American journal of human genetics**, v. 57, p. 266, 1995.

OKUBO, K. et al. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nature Genetics**, v. 2, p. 173–179, 1992.

OLIVEIRA, C. A. L. Avanços em melhoramento genético de raças de bovinos de corte: melhoramento da habilidade materna In: II SIMBOI - SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 2., 29 a 30.04.2006, Brasília-DF. **Anais...** 2006.

ORTÍ, G.; HARE, M.P.; AVISE, J.C. Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP, **Molecular ecology**, v. 6, p. 575-580, 1997.

PEASE, A. C. et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 91, p. 5022-5026, 1994.

PEROTTO, D.; MOLETTA, J. L.; CUBAS, A. C. características da carcaça de bovinos canchim e aberdeen angus e de seus cruzamentos recíprocos terminados em confinamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 331-338, 1999.

PINEDA, N.R. Influência do zebu na produção de carne no brasi. In. III SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL; Português; Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte, MG; BRASIL; Impresso. 2000. **Anais...** 2000.

PRESTON, T. R. e WILLIS, M. B. **Intensive beef production**. Oxford: Pergamon Press 544p. 1970.

PRIMO, A. T. The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals. In: V Global Conference on Conservation of Domestic Animal Genetic Resource, 2000, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. CD-ROM. CD59. 2000.

PUIGSERVER, P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. **International journal of obesity**, v. 29, p. S5–S9, 2005.

RANDAZZO, P. A. et al. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 97. p. 4011- 6, 2000.

REGITANO, L. C. A.; VENERONI, G. B. In: XV CURSO DE MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE DA EMBRAPA – GENEPLUS. Palestra, meio digital, 28 a 31 março de 2006, 2006.

REGITANO, L. C. A., et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1. ed. on-line. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

RESTLE, J.; FELTEN, H. G.; VAZ, F. N. Efeito da raça e heterose para características quantitativas da carcaça de novilhos de 24 meses terminados em confinamento. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 14., 1995, Mar del Plata. **Memorias...** Balcare: ALPA, n.3-4, p.857-859. 1995.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; FEIJÓ, G. L. D. et al. Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes composições raciais Charolês e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1371-1379, 2000.

RESTLE, J.; PASCOAL, L. L.; FATURI, C. et al. Efeito do grupo genético e da heterose nas características quantitativas da carcaça de vacas de descarte terminadas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p.350-362, 2002 (suplemento).

RESTLE, J.; VAZ, F. N. Eficiência e qualidade na produção de carne bovina. (compact disc.) IN. REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40. Santa maria, 2003. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003

RINCKER, C. B. et al. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 686-692, 2006.

RIQUET, J. et al. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred population: Application to milk production in dairy cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9252–9257, 1999.

RITCHIE, H. Available Technology Tools to Produce and Deliver Final Products. 2002, **ASAS Western Section Meeting**, Montana, 2001.

ROCHA, J. C. M. C. A importância da carne na nutrição humana (parte 1). **Agropecuária Tropical**, n. 111, 2000. p. 15-18.

ROTHWELL, N.J. Central effects of CRF on metabolism and energy balance. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 14, p. 263-271. doi:10.1016/S0149-7634(05)80037-5. PMID:2234606. 1990.

ROUSE, G. H. et al. The accuracy of real-time ultrasound scans taken serially on small-, medium, and large-frame steers and bulls slaughtered at three endpoints. **Beef & Sheep Research Report. Ames: Iowa State University**, p.14-19, 1992.

SAINZ, R. D. e ARAÚJO, F. R. C. Uso de tecnologias de ultrassom no melhoramento do produto final carne. In: 5° CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, Uberaba/MG, 20 a 23 de outubro, 2002. **Anais...** 2002.

SANTIAGO, A. A. **Gado Nelore: 100 anos de seleção**. Editora dos Criadores. 1987. p.591.

SANTIAGO, A. A. **Pecuária de corte no Brasil Central**. Instituto de Zootecnia. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. 1970, p.635.

SANTIAGO, A. C. et al. A espessura de gordura subcutânea independe do genótipo de leptina em bovinos da raça Canchim criados a pasto. In. VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. **Anais...**São Carlos, SP. 2008.

SCHLOTTERER, C. Opinion: The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? **Nature**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SEASHOLTZ, A. F.; VALVERDE, R. A.; DENVER, R. J. Corticotropin-releasing hormone binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals. **The Journal of endocrinology**, v.175, p. 89-97. doi:10. 1677/joe.0.1750089. PMID: 12379493. 2002.

SEMPLE, R.K. et al. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. **International Journal of Obesity**, v. 28, p.176-179, 2003.

SESSLER, A. M. e NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Journal of Nutrition**, v.128, p. 923-926, 1998.

SHERMAN, E. L. et al. Fine mapping quantitative trait loci (QTL) for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, n. 1, p. 37-45, 2009.

SHERMAN, E. L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1-16, 2008.

SIMM, G. The use of ultrasound to predict the carcass composition of live cattle – a Review. **Animal Breeding Abstracts**, v. 58, n. 12, p. 853-875, 1983.

SORIA, L.A. et al. Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth, slaughter and meat quality traits in Brangus steers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23(6), p.304-308, 2009.

SOUREN, N. Y. et al. Anthropometry, carbohydrate and lipid metabolism in the East Flanders Prospective Twin Survey: linkage of candidate genes using two sib-pair based variance components analyses. **Twin research and human genetics**, v. 11, p. 505-16, 2008.

SPECTOR, A. A. e YOREK, M. A Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of lipid research**, v. 26, p. 1015-1035, 1985.

STACHOWIAK, M. et al. SNPs in the porcine PPARGC1a gene: Interbreed differences and their phenotypic effects. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 2, p.231-239, 2007.

STERKY, F. e LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of biotechnology**, v. 76, p. 1-31, 2000.

STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; BEATTIE, C. Two polymorphic within an 18 kb genomic clone containing the bovine *ob* gene. **Animal Genetics**, v. 27(Suppl. 2), p. 64, 1996.

STONE, R. T. et al. A primary screen of the bovine genome for QTL affecting carcass and growth traits. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1379–1384, 1999.

STOSSEL, T. P. On the crawling of animal cells. **Science**, v. 260, p. 1086-94, 1993.

STOUFFER, J. R.; WALLENTINE, M. V.; WELLINGTON, G. A. Development and application of ultrasonic methods for measuring fat thickness and rib-eye area in cattle and rib-eye in cattle and hogs. **Journal of Animal Science**, v.18, n.4, p.759-767, 1961.

SUN, L.; YANG, Z.; JIN, F.; ZHU, X.Q.; QU, Y.C.; SHI, X.H.; WANG,L. The Gly482Ser variant of the PPARGC1 gene is associated with Type 2 diabetes mellitus in northern Chinese, especially men. **Diabetic medicine**, v.23, n.10, p.1085-1092, 2006.

SUNNUCKS, P. et al. SSCP is not difficult: the application of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1699-1710. 2000.

TOGASHI, K. & LIN, C.Y. Theoretical efficiency of multiple-trait quantitative trait loci-assisted selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 127, n. 1, p. 53-63, 2010.

TAKASUGA, A. et al. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 2, p. 125-36, 2007.

TAYLOR, J. F. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194–201, 1998.

THREADGILL, D. W. et al. The thyrolobulin gene is syntenic with the *myc* and *mos* protooncogenes and carbonic anhydrase ii and maps to chromosome 14 in cattle. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 53, p. 32, 1990.

THWAITS, C. J. Ultrasonic estimation of carcass composition – Review. **Australian Meat Research Committee**, n. 47, 29 p, 1984.

TOLEDO-CORRAL, C. M. et al. Insulin-like growth factor-I is inversely related to adiposity in overweight Latino children. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 21, n. 9, p. 855-64, 2008.

TONG, A. K. et al. Combinatorial fluorescence energy transfer tags for multiplex biological assays. **Nature biotechnology**, v. 19, p. 756–59, 2001.

TOPEL, D. G. e KAUFFMAN, R. Live animal and carcass composition measurement. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Designing foods, animal product options in the marketplace. Washington, p. 258-272. 1988.

USDA. PRODUCTION, SUPPLY AND DISTRIBUTION ONLINE. Reports. Livestock. **Cattle selected countries summary**. Washington, D.C., 2009. Disponível em: < <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cattle+Summary+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=1648&hidReportRetrievalTemplateID=7> >. Acesso em: jan. 2009.

VANDEN HEUVEL, J. P. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 575S-580S. 1999.

VAZ, F. N. et al. Características da carcaça e da carne de novilhos e de vacas de descarte Hereford, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1501-1510, 2002.

VEGA, F. M. et al. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPlex™ Genotyping System. **Mutation Research**, v. 573, p. 111–135, 2005.

VENERONI, G. B. **Associação de marcadores moleculares do bta14 com espessura de gordura em bovinos da raça canchim**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, 2007.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, INRA, EDP Sciences, 2002 DOI: 10.1051/gse:2002009. 2002.

WAHLE, K. W. J. Fatty acid modification and membrane lipids. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 42, p. 273-287, 1983.

WARRIS, P. D. **Ciencia de la carne**. Zaragoza: Acribia, 309p. 2003.

WEIKARD R. et al. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, v. 21, p.1-13, 2005.

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**, v. 72, p. 3145–3151, 1994.

WIBOWO, T. A. et al. Corticotropin releasing hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat depth in beef cattle. **Genome**, v. 50, p. 939-945, 2007.

WILLIAMS, J. L. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), v. 24, p. 379-391, 2005.

WILLIAMS, P. **Nutrition & Dietetics**; v. 64 (Suppl. 4), p. S113–S119, 2007.

WILSON, D. E. Application of ultrasound for genetic improvement. **Journal of Animal Science**, v.70, p.973-983, 1992.

WINTER, A. et al. 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 the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 99, p. 9300–9305, 2002.

WOOD, I. A. et al. A meta-analytic assessment of a Thyroglobulin marker for marbling in beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 38, p. 479-494, 2006.

XIAO, Y. et al. A multi-array multi-SNP genotyping algorithm for Affymetrix SNP microarrays. **Bioinformatics**, v. 23, n. 12, p. 1459–1467, 2007.

YE, S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**., v. 29, n. 17 e 88, 2001.

ZAPF, J. Physiologicalrole of the insulin-like factor binding proteins. **European Journal of Endocrinology**, v. 132, p. 645-654, 1995.

ZEMBAYASHI, M. et al. Effects of breed type and sex on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular lipids of finishing steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3325-3332, 1995.

CAPITULO 2. ASSOCIAÇÃO DE GENES CANDIDATOS COM ESPESSURA DE GORDURA SUBCUTÂNEA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM

RESUMO - O Canchim é uma raça de bovinos de corte composta, desenvolvida no Brasil para intensificar a produção. Os cromossomos 4, 6, 10 e 14 de bovinos foram relacionados à deposição de gordura em estudos com outras populações de bovinos. Nesses cromossomos estão posicionados os genes da *proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3* (BTA4), *coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A* (BTA6), *subunidade 26S ATPse do proteassomo* (BTA10), *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* (BTA14), *hormônio liberador de corticotrofina* (BTA14) e *proteína ligante de ácido graxo 4* (BTA14). Os objetivos deste trabalho foram: Identificar SNPs nos genes do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* e da *proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*, bem como testar a associação de SNPS presentes nos genes da *proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*, do *coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A*, da *subunidade 26S ATPse do proteassomo 1*, do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* e do *hormônio liberador de corticotrofina* e *proteína ligante de ácido graxo 4* com espessura de gordura em animais Canchim e MA. Nenhuma associação foi encontrada entre os SNPs testados dos genes da *proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*, *coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A*, *subunidade 26S ATPse do proteassomo 1* e *hormônio liberador de corticotrofina*. Foi encontrada associação significativa a 7% para um SNP do gene *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1* e associação significativa a 5% entre SNP do gene da *proteína ligante de ácido graxo 4* com espessura de gordura subcutânea na população de Canchim e MA estudada.

PALAVRAS-CHAVE: genes candidatos. identificação de SNPs. espessura de gordura subcutânea. Canchim

CANDIDATE GENES ASSOCIATION WITH BACKFAT THICKNESS IN CANCHIM CATTLE

ABSTRACT - The Canchim is a synthetic beef cattle breed, developed in Brazil to increase production. The bovine chromosomes 4, 6, 10 and 14 were related to fat deposition. In these chromosomes *insulin-like growth factor binding protein 3* (BTA4), *peroxisome proliferative active receptor gamma coactivator 1A* (BTA6) *proteasome 26S subunit ATPase 1* (BTA10), *development and differentiation enhancing factor 1* (BTA14), *corticotropin releasing hormone* (bta14) and *fatty acid binding protein 4* (BTA14) genes are positioned. The objectives of this study were to identify SNPs in *development and differentiation enhancing factor 1* and *insulin-like growth factor binding protein 3* genes, and to test the association of SNP in the *insulin-like growth factor binding protein 3*, *peroxisome proliferative active receptor gamma coactivator 1A*, *proteasome 26S subunit ATPase 1*, *development and differentiation enhancing factor 1*, *corticotropin releasing hormone* and *fatty acid binding protein 4* genes with backfat thickness in Canchim and MA populations. No association was found between the SNPs in *insulin-like growth factor binding protein 3*, *peroxisome proliferative active receptor gamma coactivator 1A*, *proteasome 26S subunit ATPase 1* and *corticotropin releasing hormone* genes with backfat thickness. Significant association at 7% was found for the *development and differentiation enhancing factor 1* gene SNP studied and significant association at 5% between the SNP in *fatty acid binding protein 4* genes and the trait in the population studied.

KEY WORDS: candidate genes. SNP identification. backfat thickness. Canchim

2.1. Introdução

O Canchim é uma raça composta constituída pelos grupos genéticos Canchim (5/8 Charolês + 3/8 Zebu) e MA (descendentes de touros Charoleses e de 1/2 Canchim + 1/2 Zebu). É uma raça que apresenta boas características de produção, como precocidade e musculabilidade adequada. No entanto, é tardio quanto à deposição de gordura.

Os cromossomos 4, 6, 10 e 14 de bovinos (BTA4, BTA6, BTA10 e BTA14, respectivamente) possuem relatos de QTLs para espessura de gordura subcutânea (EGS) e/ou marmoreio (MOORE et al., 2003; MIZOGUCHI et al., 2006; TAKASUGA et al., 2007; MALTECCA et al., 2009). Alguns genes localizados nesses cromossomos são relatados pela literatura como candidatos a influenciar a variação de tais características, como o gene *PPARGC1A* (*coativador de proliferação de peroxissomo ativo por receptor gama 1A*) no BTA6 (WEIKARD et al., 2005), o gene *PSMC1* (*subunidade 26S ATPase do proteassomo 1*) no BTA10 (GUO et al., 2008), *CRH* (*hormônio liberador de corticotrofina*) e *FABP4* (*proteína ligante de ácido graxo 4*) no BTA14 (WIBOWO et al., 2007; CHO et al., 2008). Estudos anteriores, em uma população de Canchim, demonstraram que a região centromérica do BTA14 está relacionada a variação da EGS (VENERONI, 2007).

As recentes anotações do genoma bovino têm revelado a presença de genes, nas regiões de QTLs relatadas acima, que estão envolvidos no metabolismo de lipídeos, ou interação com produtos que estão envolvidos com o metabolismo de ácidos graxos ou ainda, que possuem relatos de envolvimento com diferenciação de adipócitos ou deposição de gordura em outras espécies. Por estarem contidos em regiões de QTL para EGS ou marmoreio seria interessante testá-los. Um desses genes é o *IGFBP3* (*proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3*) presente no BTA4 e que foi relacionado a massa gorda em humanos (TOLEDO-CORRAL et al., 2008). No BTA14 está o gene *DDEF1* (*fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1*) cujo produto foi relacionado a diferenciação de fibroblasto em adipócitos (KING et al., 1999).

2.2. Objetivos

- _Identificar polimorfismos nos genes DDEF1 e IGFBP3;
- _Avaliar a associação de polimorfismos identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 com a espessura de gordura de bovinos Canchim e MA;
- _Testar a associação de SNPs nos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4, já descritos na literatura, com espessura de gordura subcutânea em populações de Canchim e MA.
- _Testar a presença de interação entre os alelos dos marcadores que mostrarem-se significativos na análise de substituição alélica.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Animais

Um total de 1.171 animais dos grupos genéticos CA (5/8 Charolês + 3/8 Zebu) e MA (filhos de touro Charolês e vacas 1/2 Canchim + 1/2 Zebu), machos e fêmeas, nascidos nos anos de 2003 a 2005, criados em regime de pastagem em sete fazendas, localizadas nos estados de SP e GO, foi avaliado para espessura de gordura subcutânea aos 18 meses de idade.

Os animais nascidos em 2003 e 2004 pertenciam a apenas dois locais (Campo experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, localizado na cidade de São Carlos, 21° 57' S, 47° 50' W, no estado de São Paulo, e fazenda Ipameri, localizada no município de Jussara, 15° 55' S, 50° 50' W, no estado de Goiás, Brasil). A amostra de animais nascidos em 2005 incluiu, além dos dois locais amostrados nos anos anteriores, os animais provenientes de cinco fazendas do estado de São Paulo. Todos esses animais tiveram amostras de sangue coletadas para extração de DNA e foram avaliados para EGS.

2.3.2. Mensuração da espessura de gordura subcutânea

As medidas ultra-sonográficas dos animais nascidos em 2003 foram realizadas em março de 2005 na fazenda da Embrapa, em São Carlos-SP, e na fazenda Ipameri, em Jussara-GO. Para os animais nascidos em 2004 tais medidas foram realizadas em março de 2006 na fazenda da Embrapa, em São Carlos-SP e em abril de 2006 na fazenda Ipameri, em Jussara-GO. Os animais nascidos em 2005 tiveram sua espessura de gordura mensurada em março ou abril de 2007 na fazenda de Goiás (Santa Helena do grupo Ipameri) e nas fazendas de São Paulo (Embrapa, Água Marinha, Calabilu, Paraíso, Santo Antonio e Vista Bonita).

Em 2005 e 2006 foi utilizado um equipamento de ultrassom Piemedical Scanner 200 Vet, com transdutor linear de 18 cm e 3,5 MHz, enquanto que em 2007 foi utilizado um aparelho Aloka 500V, com sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz. As imagens foram obtidas na região entre a 12^a e 13^a costela do animal, logo acima do músculo *longissimus*. Essas imagens foram analisadas para obtenção da espessura de gordura.

2.3.3. Obtenção das amostras de sangue e sêmen

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue por punção da veia jugular ou da veia caudal em tubos para coleta a vácuo contendo 50 µl de EDTA potássico (K3) a 15% como anti-coagulante e mantidas refrigeradas até o início do processo de extração. Palhetas de sêmen de alguns reprodutores foram fornecidas pelas fazendas, que foram mantidas congeladas até o processo de extração de DNA, o qual foi utilizado para confirmação de paternidade.

2.3.4. Extração de DNA

Os protocolos utilizados nos processos de extração de DNA a partir de leucócitos do sangue e de sêmen são adaptações dos protocolos descritos em Regitano (2001).

2.3.4.1. Extração de DNA de amostras de sangue

Para obtenção de leucócitos, as células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM), e o resíduo celular peletizado por centrifugação (700 g, 10 min). A desintegração foi repetida três vezes ou até que um precipitado branco fosse obtido.

As células brancas do sangue foram ressuspensas com uma solução que continha 500 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 0,5% SDS, 2 µg de proteínase K e então incubadas a 55°C até que o pellet fosse dissolvido (por 4 a 6 horas ou overnight). Após a incubação foram adicionados 240 µl NaCl 5M e 210µl de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6 + EDTA 1mM pH 8,0). O material foi agitado por inversão dos tubos até formar pequenos coágulos de proteína e centrifugado por 15 minutos a 16.000 g, para promover a precipitação das proteínas.

O sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado. Logo em seguida foi lavado com etanol 70% gelado e, depois secado em capela de fluxo laminar. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em 250 µl de solução TE + RNase (10 µg por ml de amostra) e incubado por uma hora a 37 °C. Ao final do procedimento, as amostras foram armazenadas em freezer.

2.3.4.2. Extração de DNA de amostras de sêmen

Amostras de sêmen obtidas de palhetas foram descongeladas em microtubos de 1,5 ml, centrifugadas por 8 minutos a 5.000 g e os sobrenadantes foram descartados. O pellet, de cada amostra, foi lavado 4 vezes em 1 ml de solução PBS 1X (KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 8 mM; pH7,0). A seguir o pellet foi ressuspensionado em 100 μl de PBS 1X e adicionou-se 400 μl de solução de lise (2-mercaptoetanol 2%, Tris.HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA pH 8.0 10 mM; SDS 0,5%). Incubou-se por 30 minutos a 50°C. Foi adicionada Proteínase-K (200 $\mu\text{g/ml}$) e as amostras foram vortexadas e incubadas por 16 horas a 50°C.

Para a precipitação das proteínas com sal, foram adicionados 90 μl de TE e 160 μl de NaCl 5 M. Os tubos foram agitados por inversão, incubados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, acrescentou-se 1 ml de etanol absoluto a cada tubo, os quais foram agitados por inversão e centrifugados a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, secou-se o pellet, ressuspendeu-se em 100 μl de TE + RNase e incubou-se por 1 hora. As amostras foram armazenadas em freezer.

2.3.5. Quantificação e verificação da qualidade do DNA

Foi utilizado um espectrofotômetro para a quantificação do DNA. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para estimar a concentração de DNA utilizou-se a seguinte relação: 1 OD₂₆₀ = 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA dupla-hélice. Dessa forma a concentração de DNA na amostra, foi obtida pelo cálculo: [DNA] = Valor da leitura em O.D. 260 X 50 X Fator de diluição (REGITANO, 2001).

Sabendo-se que as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm, a relação A₂₆₀/A₂₈₀ fornece um parâmetro de avaliação da qualidade

das preparações de ácidos nucleicos e, valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água para se obter uma concentração final de 40 ng/μl e conservadas em freezer – 30 C°. A qualidade do DNA extraído foi também verificada pela aplicação do mesmo em gel de agarose 1%.

2.3.6. Amostras utilizadas na identificação de polimorfismos dos genes DDEF1 e IGFBP3

A busca por polimorfismos nos genes DDEF1 e IGFBP3 foi realizada nos ancestrais de animais com valores genéticos extremos para a característica EGS.

Primeiramente foi calculado o valor genético (VG) para espessura de gordura de 113 touros, pais de 1.171 animais avaliados para espessura de gordura nos anos de 2005 a 2007. O valor genético foi calculado utilizando o método de Máxima Verossimilhança Restrita Livre de Derivadas (REML), com o programa computacional MTDFREML (BOLDMAN et al., 1995). Utilizou-se um modelo animal com os efeitos fixos de grupo de contemporâneos e da covariável idade do animal na data da medida (efeito linear), além dos efeitos aleatórios genéticos aditivos diretos e residuais. O grupo de contemporâneos (GC) foi formado pelas variáveis ano de nascimento, rebanho, grupo genético e sexo. Os GC com menos de dois animais foram excluídos. O modelo estatístico, na forma matricial, foi o seguinte:

$$y = X\beta + Za + e,$$

em que: y = vetor das variáveis dependentes; β = vetor de soluções de efeitos fixos (grupo de contemporâneos e covariável); a = vetor de efeitos genéticos aditivos diretos; e = vetor de erros aleatórios residuais associados às observações; e X e Z = são as respectivas matrizes de incidência para cada efeito.

Em seguida os touros foram classificados segundo o valor genético e acurácia e, desta classificação, foram escolhidos seis touros com maior valor genético e maior acurácia e seis touros com menor valor genético e maior acurácia.

Os DNAs desses touros foram utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento, para identificação de polimorfismos nos genes DDEF1 e IGFBP3.

2.3.7. Primers

2.3.7.1. Desenho de primers para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

O gene DDEF1 possui 339.054 pb, o que inviabiliza o seu sequenciamento completo direto de produtos de PCR sem clonagem. Por esse motivo, com base nos dados depositados no GeneBank (Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram identificados os domínios conservados da proteína codificada por esse gene. Esses domínios são: o domínio homólogo da centaurina plecstrina (*Centaurin Plekstrin Homology domain* -P H centaurina), repetições anquinas (ANK), domínio homólogo Src 3 (*Src homology 3 domains* – SH3) e ArfGap (Figura 1). Em seguida foram identificadas no RNAm as bases codificadoras desses domínios. Logo após, foram localizadas, na seqüência genômica, as regiões correspondentes a tais domínios.

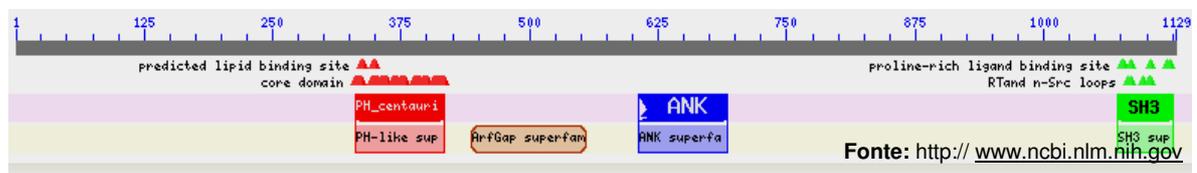


Figura 1. Posição dos 4 domínios conservados na seqüência de aminoácidos na proteína DDEF1

De posse dessas informações, foi verificado que os exons codificadores dos 4 domínios conservados do gene DDEF1 distavam muito uns dos outros. Sendo assim, não havia possibilidade de amplificação de um conjunto ou conjuntos de exons simultaneamente. Assim, foram desenhados 13 pares de *primers* (um para cada exon). Além disso, na base de dados miRBase (Disponível

em http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/targets/v5/detail_view.pl?transcript_id=ENSMMUT00000017009) verificou-se que o gene DDEF1 é sítio alvo do miRNA mmu-miR-721 em *M. mulatta* e, está envolvido com a regulação da expressão do gene da *AcilCoa sintetase* e com o segundo ciclo da divisão celular. A seqüência deste sítio alvo é homeóloga a seqüência do gene DDEF1 bovino. Sendo assim, foi desenhado também um par de *primer* flaqueando o sítio alvo do miRNA mmu-miR-721 no gene DDEF1.

O gene IGFBP3 contém sete exons. Foram desenhados seis pares de *primers* para amplificar todos os exons, sendo um para cada exon, exceto os exons 3 e 4 que encontram-se próximos e que puderam ser amplificados pelo mesmo par de *primer*.

Os *primers* foram desenhados com a utilização do programa Primer3 (Disponível em http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). A qualidade dos *primers* foi verificada no site <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, tomando-se cuidado para optar por *primers* que possuíssem ΔG maior que 0 (ideal para que reações espontâneas não ocorram), que não formassem *hairpin* (*primers* auto complementares) e que formassem amplicons menores que 600 pb. É sabido que as primeiras e as últimas dezenas de pares de bases de um sequenciamento dificilmente atingem boa qualidade. Assim, para evitar que as regiões de exons perdessem qualidade, desenhou-se *primers* que amplificassem uma pequena região de intron antes e depois dos exons de interesse.

2.3.7.2. Primers para análise dos SNPs contidos nos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4

Os *primers* utilizados nas análises dos SNPs dos genes PPARGC1A, PSMC1 e CRH foram os descritos por Weikard et al. (2005), Guo et al. (2008) e Wibowo et al. (2007), respectivamente. Para analisar o SNP no exon 2 do gene FABP4 os *primers* foram desenhados com auxílio do software Primer 3 plus, disponível on line (Disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e a qualidade

dos *primers* foi verificada pelo software OligoAnalyzer do site <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>.

2.3.7.3. *Primers* para análise do SNP DDEF1g.279401A>G e do SNP IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg)

Os *primers* para análise do SNP DDEF1g.279401A>G foram desenhados com o auxílio do site <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html> como descrito por Ye et al. (2001) mas, seguindo adaptações de Buitkamp et al. (2004). O site <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html> desenha 4 *primers* (1 par de *primers* externos e 2 *primers* alelo-específicos). No entanto utilizamos apenas o *primer* externo *reverse* e os 2 *primers* alelo-específicos. O *primer* externo foi marcado com fluorescência na extremidade 5'. Os *primers* e sonda utilizados na análise do SNP IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg) foram desenhados e sintetizados pela empresa Applied Biosystems.

2.3.8. Otimização das condições de PCR para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

Foram realizados testes com diversas concentrações dos componentes de uma reação de PCR e, um gradiente com uma variação de 5 graus acima e 5 graus abaixo da temperatura de anelamento, calculada com base na seqüência dos *primers* desenhados para seqüenciar parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 (Figura 2).

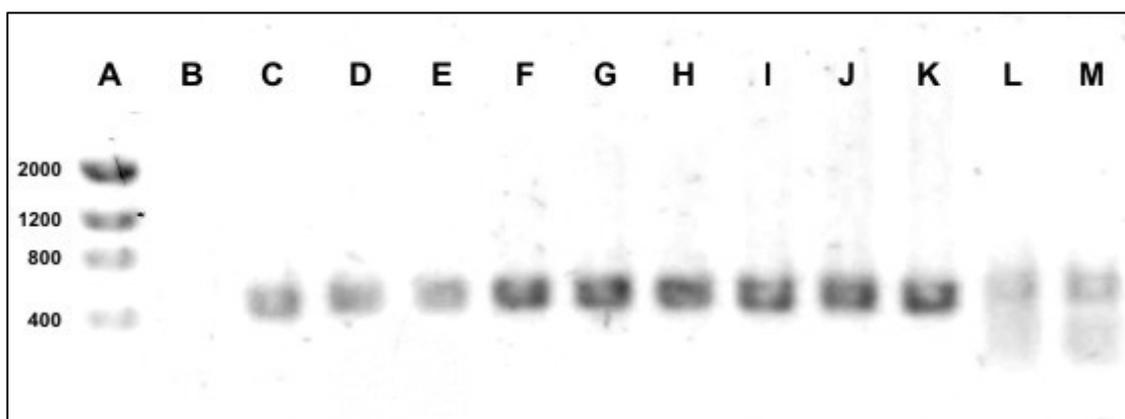


Figura 2: Gradiente de temperatura de anelamento do primer RAG4 com uma variação de 5 graus acima e de 5 graus abaixo da temperatura de anelamento indicada pelo fabricante dos *primers* (TM 50). As colunas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L e M representam respectivamente: padrão de tamanho Low DNA mass, 45.0°C, 45.1°C, 45.7°C, 46.6°C, 47.0°C, 49.0°C, 50.4°C, 51.8°C, 53.0°C, 54.1°C, 55.0°C, 55.4°C.

Ao final dos testes de gradiente os *primers* RA1, RA2, RP2, RP3, RP4, RP5, RAG2 foram utilizados em uma reação que conteve 200 ng de DNA genômico, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,95 mM, KCl 50 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,165 µM de cada *primer* e 1,3 unidades de Taq DNA Polimerase em um volume final de reação de 30 µl. Os *primers* RP1, RAG3, RAG4, RS1, RS2, RA3, miRNA, E1, E2, E3_4, E5, E6 e E7 foram utilizados sob as mesmas condições exceto na quantidade de MgCl₂ que foi de 1,5 mM. As temperaturas de anelamento de cada *primer* são descritas na Tabela 1:

Tabela 1. Temperaturas de anelamento dos *primers* utilizados nos seqüenciamentos de regiões dos genes DDEF1 e IGFBP1.

Temperatura de anelamento	Primers
51.0 °C	E1
52 °C	miRNA, E2, E3_4, E6, E7
53 °C	RP2, RAG2, RA3, RS1
54.1 °C	RA1, RP1
55.0 °C	RA2, R3AG, R4AG
55.4 °C	RP4, RP3, RP5, RS2
62 °C	E5

A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento, com temperatura específica de cada *primer*, por 30 segundos, e

extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos.

2.3.9. Purificação dos produtos da PCR para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

Foram amplificadas, purificadas e seqüenciadas as 14 regiões do gene DDEF1 (RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, RGA2, RGA3, RGA4, RA1, RA2, RA3, RS1, RS2, Mirna) referentes aos domínios PH Centaurina, ArfGap, ANK, SH3 e ao sítio alvo do miRNA e, as 6 regiões referentes aos 7 exons do gene IGFBP3 dos 12 touros com maior e menor valor genético para espessura de gordura subcutânea. As reações de PCR foram purificadas com a utilização do *kit Wizard SV gel and PCR clean-up system*.

As reações de purificação de PCR foram realizadas da seguinte forma: 25 µl de uma solução denominada *membrane binding solution* (4,5 M isotiocianato de guanidina, 0,5 M acetato de potássio) foram adicionados a 25 µl de PCR. Em seguida essa mistura foi dispensada em uma mini-coluna de celulose que foi colocada sobre um tubo coletor. Incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se por 2 minutos a 14000 rpm. Logo depois foram acrescentados 700 µl de uma solução denominada *membrane wash solution* (10 mM potassium acetate, 80% ethanol, 16,7 uM EDTA) à coluna e centrifugou-se por 1,5 minutos a 14.000 rpm. Em seguida foram acrescentados 500 µl de *membrane wash solution* novamente à coluna, que foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. Por último, a coluna foi colocada sobre um tubo de 1,5 ml e foram adicionados 40 µl de água livre de nuclease à coluna para eluir o produto de PCR purificado. Incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente e depois centrifugou-se por 1 minuto a 14.000 rpm. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em espectrofotômetro e diluídos a uma concentração final de 32 ng/µl.

2.3.10. Reação de seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo adaptações do protocolo descrito por Regitano et al. 2007 utilizando o *Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing* da Applied. Cada reação constou de:

- _ 2 µL de água
- _ 2 µL de Big dye (DNA Polimerase, dNTPs e ddNTPs)
- _ 2 µL de tampão (Mg^{+2} e Tris-HCl)
- _ 2 µL de *primer* (2 pmol)
- _ 2 µL de produto de PCR (32 ng/µL)

As condições para a reação de sequenciamento foram:

- _ Pré-incubação: 94 °C por 2 minutos

_ Amplificação:

25 ciclos de

{	96 °C por 20 segundos
	Temperatura em °C específica de cada primer por 10 segundos
	60 °C por 04 minutos

- _ Resfriamento: 4 °C por ∞.

Foram sequenciadas duas vezes cada fita de DNA das regiões analisadas para o gene DDEF1, produzindo quatro reações de sequenciamento para cada animal. Foi verificado que o mesmo resultado era obtido quando se sequenciava apenas 1 vez cada fita de DNA, sendo assim, esse procedimento foi adotado para o sequenciamento dos exons do gene IGFBP3.

2.3.11. Purificação e precipitação das reações de seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

Os produtos de sequenciamento foram purificados e precipitados para evitar que os ddNTPs, dNTPs, *primers* e enzima não incorporados interferissem na leitura do seqüenciador. Para isso foi utilizada a seguinte adaptação do protocolo descrito por Regitano et al. 2007:

- _Adicionou-se 40µL de isopropanol 65% a temperatura ambiente;
- _Vortexou-se a mistura alguns segundos e incubou-se no escuro a temperatura ambiente (TA) por 15 minutos;
- _Em seguida centrifugou-se por 25 minutos a 14000 rpm a TA;
- _Descartou-se o sobrenadante por inversão;
- _Foram adicionados 200 µL de etanol 60%, a temperatura ambiente, e centrifugou-se por 5 minutos a 14000 rpm a TA;
- _Descartou-se o sobrenadante por inversão (a lavagem com etanol 60% foi repetida duas vezes);
- _As reações ficaram secando no escuro por 1 hora e depois foram armazenadas em freezer -20°C.

2.3.12. Análise das reações de sequenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3

Os produtos de amplificação dos genes DDEF1 e IGFBP3 foram submetidos à reação de sequenciamento e aplicados em um seqüenciador automático ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas gerados pelo seqüenciador foram submetidos ao programa de base calling Phred, que reconhece dados de cromatogramas e identifica a sequência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Quanto maior o valor de qualidade do Phred, menor a probabilidade de ter ocorrido um erro na designação do nucleotídeo. Em seguida tais seqüências foram submetidas ao programa de montagem Phrap (*Phragment*

Assembly Program), em que as seqüências foram agrupadas e organizadas em *contigs*. A visualização das seqüências geradas foi realizada por meio do programa Consed, em que foi possível a observação dos SNPs (PROSDOCIMI et al., 2002). Para esta visualização foram agrupadas as 4 seqüências de cada animal, no caso do gene DDEF1, e as 2 seqüências de cada animal, no caso do gene IGFBP3. Cada agrupamento, referente a um animal, foi analisado isoladamente.

Esta metodologia permite identificação de polimorfismos somente em indivíduos heterozigotos para o SNP, isto é, se ocorrer indivíduos diferentes que são homozigotos para alelos distintos de um polimorfismo esta metodologia não identifica o SNP. Para identificação de polimorfismos entre indivíduos homozigotos para um dado SNP, a seqüência consenso de cada animal (uma vez que cada animal possui 4 ou 2 reações de sequenciamento) foi obtida a partir dos programas Phred, Phrap e Consed para cada região analisada. Em seguida, as seqüências consenso foram alinhadas pelo programa BioEdit (HALL, 1999) que utiliza o algoritmo do programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994).

2.3.13. Teste de independência e de alteração de aminoácidos para escolha do SNP a ser genotipado na população

Dois testes foram levados em consideração para a determinação dos SNPs, identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3, que teriam avaliadas suas estimativas de parâmetros para associação com EGS nas populações Canchim e MA em estudo. Primeiramente, todos os touros utilizados nas reações de sequenciamento, foram genotipados para todos os SNPs identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3. Para verificar se houve predominância de um alelo de um dado SNP em algum dos extremos de valor genético para espessura de gordura subcutânea foi aplicado um teste exato de Fisher, teste esse recomendado quando se tem poucas observações ($N < 20$) (SNEDECOR e COCHRAN, 1967). A segunda análise foi a verificação de alteração de aminoácidos para SNPs presentes em exons com a utilização do programa BioEdit (HALL, 1999). Nos casos em que houve alteração do aminoácido, foi feita uma averiguação da alteração da propriedade química do aminoácido.

2.3.14. Padronização das reações de genotipagem dos SNPs DDEF1g.279401A>G e IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg)

O SNP DDEF1g.279401A>G foi genotipado segundo a adaptação da metodologia de ARMS desenvolvida por Buitkamp et al. (2004). Um gradiente de temperatura com uma variação de 5 graus acima e de 5 graus abaixo da temperatura de anelamento, calculada com base na seqüência dos *primers*, foi realizado. Também foram testadas várias concentrações de MgCl₂ e de *primers*.

Ao final, as PCR's foram realizadas a partir de 40 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 10 µl. Para a PCR contendo o *primer* alelo-específico A a reação constou de Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, DMSO (5% do volume final da reação), MgCl₂ 1,5 mM, 0,025 µM de cada dNTP, 0,1 µM de *primer* outer, 0,15 µM de *primer* alelo-específico A e 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase. A reação com o *primer* alelo-específico G foi realizada sob as mesmas condições exceto na quantidade de *primer*-específico G que foi de 0,1 µM. Foram realizadas 2 reações de PCR para cada animal, uma para cada *primer* alelo-específico.

As análises dos produtos de PCR foram realizadas em um seqüenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems). Os genótipos foram determinados com a utilização do programa GeneScan (versão 3.7.1) que realiza a leitura dos eletroferogramas indicando a amplificação dos alelos pela altura dos picos detectados e estima o tamanho desses alelos em relação à um padrão.

O SNP IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg) do gene IGFBP3 foi genotipado pelo método TaqMan, que consiste de um par de *primers* e 2 sondas alelo específicas que permitem a identificação das variantes alélicas.

A reação constou de 15 ng de DNA genômico, 0,25 µl de Assay Mix[®] 1X (Applied Biosystems) que contém o par de *primers* e *sondas*, 5,0 µl de Taqman[®] Master Mix Universal PCR 2X (Applied Biosystems). A reação se deu com uma primeira e única etapa de 10 minutos a 95^o C, seguidas com 45 ciclos de 15 segundos a 92^o C e 1 minuto a 60^o C. As reações foram realizadas e analisadas em equipamento de PCR em Tempo Real Modelo 7500 da Applied Biosystems.

2.3.15. Genotipagem dos SNPs contidos nos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4

Os SNPs analisados nos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4 foram genotipados por PCR/RFLP. Para a genotipagem, dentre todos os animais contidos no projeto, foram selecionadas famílias com mais de oito indivíduos. A Tabela 2 apresenta o número de indivíduos genotipados por marcador, a localização deles nos respectivos genes e a literatura, fonte para o estudo, de cada um deles.

Tabela 2. SNPs dos genes PPARGC1A, PSMC1, CRH e FABP4 analisados com suas respectivas localizações, citações e número de animais genotipados

Gene	SNP	Localização	Descrito por	Número de animais genotipados
PPARGC1A	T/C	Intron 9	Weikard et al. (2005)	595
PSMC1	A/G	Intron 9	Guo et al. (2008)	648
CRH	C/T	Promotor	Wibowo et al. (2007)	641
FABP4	A/G	Exon 2	Cho et al. (2008)	558

A PCR da região de 179 pb do intron 9 que contém o polimorfismo (T/C) do gene PPARGC1A foi realizada com tampão de reação 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,1 mM de cada dNTP, 0,25 μM de cada *primer*, 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase, 25 ng de DNA em uma reação com volume final de 15 μL . A reação foi constituída das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 49°C, 45 segundos a 72°C. Em seguida, o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima *BsuRI*. O volume final da reação de digestão foi de 10 μL , sendo 8 μL do produto da PCR e 2 μL de Mix de digestão que continha 1 unidade da enzima *BsuRI*, tampão da enzima contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA. A reação de digestão ocorreu durante 3 horas a 37°C.

A enzima *BsuRI* reconhece um sítio de quatro bases: GGCC e o cliva. Animais que apresentam o genótipo TT possuem uma substituição de uma base citosina por uma timina. Essa alteração suprime o sítio de restrição da enzima na região do intron 9 do gene PPARGC1A amplificada, resultando em um padrão com apenas o fragmento amplificado pela PCR (179 pb). Animais com o genótipo CC são

caracterizados por possuírem o sítio de restrição da enzima e apresentam um padrão de restrição de 2 fragmentos (20 e 159 pb). A análise dos produtos de PCR e digestão foi realizada no seqüenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems). Os genótipos foram determinados com a utilização do programa GeneScan (versão 3.7.1).

A amplificação da região do SNP (A/G) do gene PSMC1 foi realizada utilizando tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,07 mM de dNTP mix, 0,21 µM de cada *primer*, 1 unidade de enzima *Taq* DNA polimerase e 50 ng de DNA em uma reação de volume final de 15 µL. A reação se deu por 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, após os 35 ciclos o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos dessa reação foram digeridos com a enzima *Mva*I em uma reação de digestão com volume final de 12 µL, sendo 10 µL do produto da PCR e 2 µL de Mix de digestão que continha 1 U da enzima *Mva*I, tampão da enzima contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA. A reação de digestão ocorreu durante 3 horas a 37°C.

A enzima *Mva*I reconhece o sítio composto pelas cinco bases CCAGG e cliva o DNA neste ponto. Animais que apresentam o genótipo GG possuem uma substituição de uma base adenina por uma guanina, e perdem um sítio de restrição na região do intron 9 amplificada e apresentam um padrão de restrição com 4 fragmentos (13, 83, 128 e 285 pb). Animais com o genótipo AA são caracterizados pelo padrão de restrição de 5 fragmentos (13, 83, 87, 128 e 198 pb).

O SNP g.9657C>T contido no promotor do gene CRH foi genotipado por PCR-RFLP com uma adaptação do protocolo descrito em Wibowo et al. (2007). A reação de PCR conteve 200 ng de DNA genômico, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,165 µM de cada *primer* e 1,3 unidades de *Taq* DNA Polimerase em um volume final de reação de 30 µl. Constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento, com temperatura específica de cada *primer*, por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos.

Na reação de digestão foi utilizada a enzima *Hha*I que reconhece a seqüência GCGC e a cliva. O SNP está contido na última base do sítio de restrição,

assim animais portadores da variante delta T (nesse caso substituição da citosina por uma timina) perdem um sítio de restrição. A variante delta C é caracterizada pela presença de 5 fragmentos (de aproximadamente 2, 5, 27, 234 e 243 pb) e a variante delta T é caracterizada pela presença de 4 fragmentos (de aproximadamente 5, 27, 477 pb). O volume final da reação de digestão de CRH foi de 10 µl sendo 8 µl de produto de amplificação e 2 µl de Emix de digestão. Este último consistiu de 1,3 unidade da endonuclease de restrição *HhaI*, Tris-acetato 33 mM (pH 7.9), acetato de magnésio 10 mM, acetato de potássio 66mM e 0,1 mg/ml de BSA. A reação de digestão foi incubada a 37°C por 3 horas em aparelho termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorff).

Para a análise do SNP contido no gene FABP4 foi utilizado tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada *primer*, 1 unidade de enzima *Taq* DNA polimerase e 100 ng de DNA em uma reação com volume final de 20 µL. As etapas para amplificação da região foram: 2 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C, após os 35 ciclos o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram digeridos com a enzima *NmuCI* em uma reação de digestão com volume final de 12 µL, sendo 10 µL do produto da PCR e 2 µL de Mix de digestão que continha 1 U da enzima *NmuCI*, tampão da enzima contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl e 0,1 mg/ml BSA. A reação de digestão ocorreu durante 3 horas a 37°C.

A endonuclease de restrição *NmuCI* reconhece o sítio de cinco bases: GTCAC na sequência do DNA e o cliva. Animais que apresentam o genótipo GG, possuem uma substituição de uma base adenina por uma guanina, que produz um sítio de restrição adicional na região amplificada e apresentam um padrão de restrição com 3 fragmentos (72, 121 e 160 pb). Animais com o genótipo AA são caracterizados pelo padrão de restrição de 2 fragmentos (160 e 193 pb).

Para análise dos genótipos de PSMC1, CRH e FABP4, os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 3%. Esse procedimento foi realizado com tampão de eletroforese TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM pH 8,0), submetido a uma voltagem de 3 V/cm e, corado com brometo de etídeo incorporado no gel. Foram aplicados no gel 10 µl do produto de

digestão acrescidos de 2 µl de *loading buffer*. No primeiro poço de cada fileira do gel foi aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA Fiex também acrescido de *loading buffer* na mesma proporção acima. Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e registrados por uma câmera fotográfica digital. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrão de tamanho de DNA e assim o genótipo de cada animal pôde ser determinado.

2.3.16. Análise de associação dos SNPs dos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 com espessura de gordura subcutânea

A associação entre os genótipos dos marcadores e medidas de espessura de gordura subcutânea foi analisada com um modelo animal, usando o método de máxima verossimilhança restrita.

Esta análise foi realizada com a utilização do programa ASREML (GILMOUR et al., 2000) de acordo com Schenkel et al. (2005). Foram formados grupos de contemporâneos (GC) com as variáveis: ano de nascimento, rebanho, grupo genético (CA or MA) e sexo. Grupos de contemporâneos com menos de dois indivíduos foram excluídos das análises. Para verificar a influência de cada marcador sobre a espessura de gordura subcutânea foi utilizado um modelo animal considerando como efeitos fixos o GC e os genótipos e, a idade do animal na data da medida (efeito linear) como covariável, além dos efeitos aleatórios genéticos aditivo direto e residual.

O modelo estatístico usado foi:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}$$

Em que,

\mathbf{y} é o vetor de observações;

\mathbf{X} é a matriz de incidência dos efeitos do GC;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de soluções dos efeitos fixos (GC, idade e genótipos);

\mathbf{Z} é a matriz de incidência que relaciona os registros aos efeitos aleatórios genéticos;

\mathbf{a} é o vetor de soluções de efeitos aleatórios desconhecidos que representam os valores genéticos aditivos de cada animal;

\mathbf{e} é o vetor de erros aleatórios residuais associados às observações.

Quando um efeito significativo a 7% de genótipo de um dado marcador foi observado, o efeito de substituição de alelo, como desvio do alelo com maior frequência, foi estimado pela substituição do efeito de genótipo por co-variáveis representando o número de cada alelo no genótipo. Uma comparação, entre o modelo contendo os genótipos de um dado marcador e o modelo usado nas análises de efeito de substituição alélica, foi realizada pelo teste de razão de verossimilhança (MOOD et al., 1974) para testar a presença de desvios de dominância do modelo aditivo.

2.3.17. Estimativa da porcentagem da variância fenotípica e aditiva total explicada pelo marcador

A porcentagem da variância fenotípica total explicada pelo marcador que obteve, no mínimo, efeito significativo a 7% nas análises de associação, foi realizada conforme descrito em Shenckel et al. (2005).

As saídas de dados das análises de associação entre os genótipos dos marcadores e as medidas de espessura de gordura subcutânea utilizando um modelo animal e o método de máxima verossimilhança restrita continham as estimativas para cada efeito fixo, inclusive para a combinação genotípica (AA, Aa e aa) dos SNPs avaliados. Essas soluções foram utilizadas para calcular os efeitos do valor genotípico de AA como desvio da média ($a=(AA-aa)/2$) e do valor genotípico de Aa como desvio da média ($d=Aa-((AA+aa)/2)$) de cada marcador.

Juntamente com esses dados e, com base nas frequências alélicas dos SNPs avaliados, foram obtidas as porcentagens das variâncias aditiva e fenotípica explicadas pelo marcador, usando fórmulas padrões descritas em Falconer e Mackay (1996). Dessa forma, foi calculado o efeito de substituição alélica ($\alpha =a+d(q-p)$), em seguida a variância aditiva ($v(am)$) foi obtida pela fórmula $2pq\alpha^2$ e a variância de dominância pela fórmula $(2pqd)^2$. A variância devida ao marcador ($v(m)$) é a soma das variâncias aditiva e de dominância.

Para determinar quanto o marcador representa da variância fenotípica total, inicialmente calculamos a herdabilidade (h^2) para a característica em questão (EGS) com o programa ASREML (GILMOUR et al., 2000). A saída dessa estimativa

nos dá as variâncias fenotípicas ($v(f)$) e aditiva ($v(a)$) da característica. Para obtenção da porcentagem da variância fenotípica total representada pelo marcador dividiu-se a variância total do marcador ($v(m)$) pela variância fenotípica da característica e, para o cálculo da porcentagem da variância aditiva total explicada pelo marcador dividiu-se a variância aditiva do marcador ($v(am)$) pela variância aditiva da característica ($v(a)$).

2.3.18. Análise de interação entre os alelos dos marcadores com efeito significativo na análise de variância

Os marcadores que apresentaram efeito significativo ($P \leq 0,07$) na análise de associação por REML (DDEF1 e FABP4) tiveram calculados os efeitos de substituição alélica, como desvio do alelo de maior frequência. Os alelos dos marcadores com efeito significativo foram testados para presença de interação entre os respectivos marcadores por meio de uma análise de regressão pelo método REML. Para isso, foram consideradas como efeito aditivo as co-variáveis representando o número de cópias de cada alelo no marcador e, para obter o efeito de desvios de dominância, foram calculados os efeitos quadráticos de cada uma das co-variáveis citadas acima.

Em todos os modelos constava o GC como efeito fixo e a idade como co-variável. Quando a interação aditiva X aditiva foi testada, o modelo conteve as co-variáveis dos alelos de cada marcador e a interação entre esses alelos. Para se testar a interação aditiva X dominante, o modelo conteve a co-variável do alelo de um marcador, o efeito quadrático da co-variável do alelo do outro marcador e a interação entre esses alelos. No caso da averiguação da interação dominante X aditiva se procedeu como descrito na interação aditiva X dominante, apenas substituindo as co-variáveis dos marcadores. No teste de interação dominante X dominante o modelo conteve as co-variáveis quadráticas de cada marcador e a interação entre elas. Dessa forma foram calculadas as interações: aditiva X aditiva, aditiva X dominante, dominante X aditiva, dominante X dominante entre os alelos dos marcadores nos genes FABP4 e DDEF1.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Estatística descritiva dos dados fenotípicos

As medidas de espessura de gordura subcutânea apresentaram média de 1,90 com desvio padrão de 0,77 mm, sendo que o menor valor observado foi de 0,60 mm e o maior valor observado foi de 5,4 mm. A característica apresentou coeficiente de variação de 40,67%. Segundo Meirelles (2007), a variância aditiva direta dessa característica nessa população de Canchins foi de 0,065, a variância residual foi de 0,210 e a herdabilidade foi de $0,24 \pm 0,09$. Pode-se observar que a herdabilidade foi moderada indicando que a característica pode responder à seleção nessa população. No entanto, é uma característica de manifestação tardia, sendo assim a utilização da informação de marcadores moleculares, validados na população, poderia possibilitar a identificação precoce de animais com potencial para o acabamento desejável de EGS.

2.4.2. Verificação da qualidade da extração do DNA

A qualidade do DNA extraído foi verificada em espectrofotômetro, em que foram verificados valores para a relação 260/280 acima de 1,6 que indicam boa qualidade. Ela também foi verificada por meio da aplicação do DNA total em gel de agarose 1%, permitindo a observação de uma única banda, o que indica ausência de degradação (Figura 3).

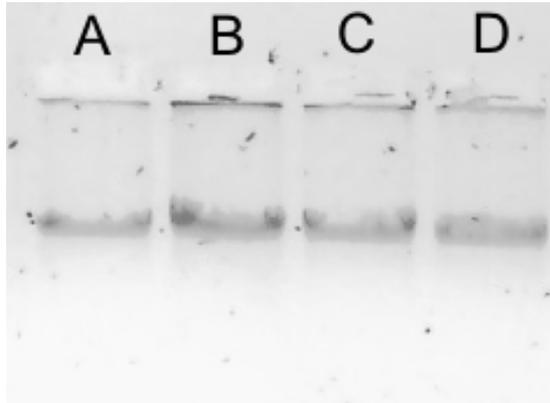


Figura 3. Gel de agarose 1% para verificação da integridade do DNA extraído. A canaleta A corresponde ao controle positivo e as canaletas B, C e D correspondem a DNAs extraídos.

2.4.3. Amostras utilizadas na identificação de SNPs nos genes DDEF1 e IGFBP3

Para a escolha dos animais que seriam seqüenciados para detecção de polimorfismos nos genes DDEF1 e IGFBP3 levou-se em consideração, além do valor genético extremo, a acurácia dessa estimativa. Os touros foram ordenados em ordem crescente, segundo o valor genético e acurácia. Os animais selecionados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Valor genético (VG) para espessura de gordura e acurácia da estimativa de valor genético dos touros Canchins utilizados na detecção de SNP

Touros com menor VG	VG (mm)	Erro	Acurácia
1	-0,311	0,17	0,74
2	-0,298	0,18	0,70
3	-0,258	0,17	0,74
4	-0,251	0,17	0,73
5	-0,219	0,17	0,73
6	-0,205	0,18	0,70
Touros com maior VG	VG (mm)	Erro	Acurácia
7	0,304	0,19	0,66
8	0,286	0,19	0,64
9	0,283	0,15	0,79
10	0,253	0,17	0,74
11	0,16	0,16	0,77
12	0,077	0,16	0,78

2.4.4. Primers para seqüenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 e genotipagem do gene FABP4

Os 14 pares de *primers* desenhados para amplificação e posterior seqüenciamento dos 4 domínios de DDEF1 e do sítio alvo do miRNA, e os 6 pares de *primers* desenhados para amplificação e posterior seqüenciamento dos 7 exons de IGFBP3 estão representados na Tabela 4. Nessa Tabela também estão dispostos os primers desenhados para amplificação da região que contém o SNP avaliado em FABP4.

Tabela 4. Primers desenhados para amplificação de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 para posterior sequenciamento.

P	Gene	Domínio	Localização	Seqüência	A
RP1	DDEF1	PH Centaurina	Exon 12, 13	Left:ATTGCTCACCTGCCCAGTTT Right:GCCTTCCTCAAACCACACAT	517
RP2	DDEF1	PH Centaurina	Exon 14	Left: TAATAAACGGCAGCCCAGAC Right:CCCCACATGTTAAACACACG	323
RP3	DDEF1	PH Centaurina	Exon 15	Left: CGCACAGTTAAAAGCCATTG Right:CCAGCATACACCTCCTCTCA	399
RP4	DDEF1	PH Centaurina	Exon 16	Left: GCTGAAACAAAAGGTGCAA Right:ACAGCTAAGCAGGGGAAACC	322
RP5	DDEF1	PH Centaurina	Exon 17	Left: TTCCCTCCTGTTACTGCTTGA Right: CTCCACGTCCATAATGCTGA	488
R2AG	DDEF1	ArfGap	Exon 18	Left: GGGTGTTCATAGGCCTCAC Right: CATGATTGCGCCAGTTCTTCA	557
R3AG	DDEF1	ArfGap	Exon 19	Left: CATGGTCCACCAGTCCATT Right: CGATTGAAGCCACTGAACAA	506
R4AG	DDEF1	ArfGap	Exon 20	Left:TCAGCTGGAATGTTGAAGAGAA Right: TAACAGCAGCCCCTTTCAGT	466
R1A	DDEF1	ANK	Exon 21	Left: TGAAAGGGGCTGCTGTTAAT Right: TGGCCATGCTCACTTGTTTA	408
R2A	DDEF1	ANK	Exon 22	Left: TCGTCTTCCCTGCCTCTAAG Right: GAATGGGCATGTCTCAGTTG	476
R3A	DDEF1	ANK	Exon 23	Left: ATGCCATTCCGTTGTACTC Right: GTGCTGGCCTGAATTTCTTT	296
R1S	DDEF1	SH3	Exon 30	Left: CCGTGATGTTTGCTCTCAGAT Right: GGGCCAGTGTTGAATGAGTT	379
R2S	DDEF1	SH3	Exon 31	Left: GGTCATCGTGCCTCCTTTC Right: GGGCCAGTGTTGAATGAGTT	550
miRNA	DDEF1	.	Exon 31	Left: ATCAGTTCTGCCACCGTTT Right:GATGGTCTTGATGGTCTGATGA	283
E1	IGFBP3	.	Exon 1	Left: AGCTATTCCAAGCTGAGTGTC Right: CAACGTCAGTGC GGTCAAAG	175
E2	IGFBP3	.	Exon 2	Left: GGAATTGTTGAGTCACGTTTCTG Right: CATCAGCAAGAAGAAAAGCTCTC	369
E3_4	IGFBP3	.	Exon 3 e Exon 4	Left: CACAGGAACGGTGACA ACTAAAT Right: TGGTAGGAGTTGTCCC ACTAAAA	± 800
E5	IGFBP3	.	Exon 5	Left: GAATTAATCACAGAACAGCACAGC Right: CAACTGATTAAGGCCTTGTGTG	400
E6	IGFBP3	,	Exon 6	Left: GCCTCCTCAGGGCTCATTTA Right: AGAGCTCTGTCTTGTGTGTAGGC	283
E7	IGFBP3	.	Exon 7	Left: GACCTTTTGATTTGGGGAGAT Right: ATTCTCTCCACTTGTTC CAAGC	600
FABP4	FABP4	.	Exon 2	Left: AATACACACACACACCTGCTC Right: AATACACACACACACCTGCTC	353

P= Nome do Primer; A= Tamanho do amplicon em pb

A especificidade dos *primers* foi comprovada pela aplicação do produto de PCR em gel de agarose 1%, permitindo a observação de uma única banda para cada produto de amplificação. A Figura 4 apresenta um exemplo da especificidade obtida com os *primers* desenhados.

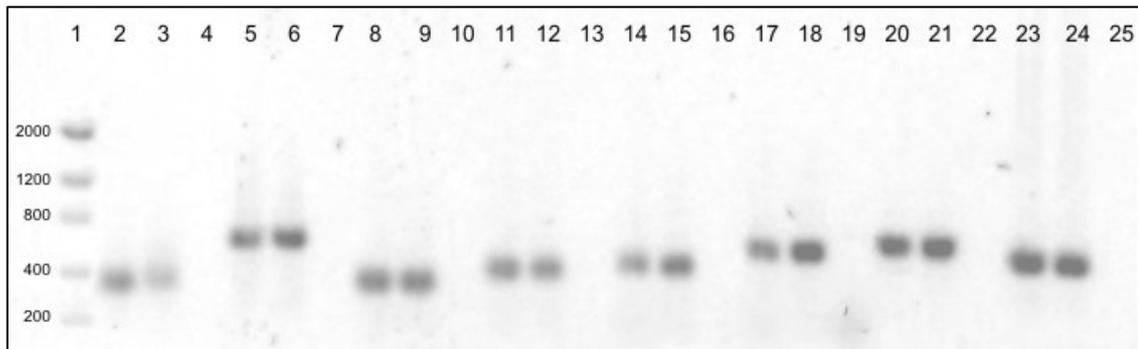


Figura 4: Gel de agarose 1% para visualização dos fragmentos amplificados em DDEF1. A canaleta 1 corresponde ao marcador de peso molecular Low DNA mass, e as canaletas 2 a 25 correspondem respectivamente aos amplicons dos primers RP2,RP2, negativo de RP2, R2AG, R2AG, negativo de R2AG, R3A, R3A, negativo de R3A, R2S, R2S e negativo de R2S, R1A, R1A e negativo de R1A, RP1, RP1, negativo de RP1, R1S, R1S, negativo de R1S, R2A, R2A, negativo de R2A.

2.4.5. Sequenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 e identificação de SNPs

Os produtos de sequenciamento de parte dos genes DDEF1 e IGFBP3 foram analisados em um equipamento ABI 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados demonstraram qualidade adequada para utilização na identificação de SNPs. Na Figura 5 pode-se observar o cromatograma obtido no sequenciamento dos produtos de PCR de parte do domínio PH Centaurina.

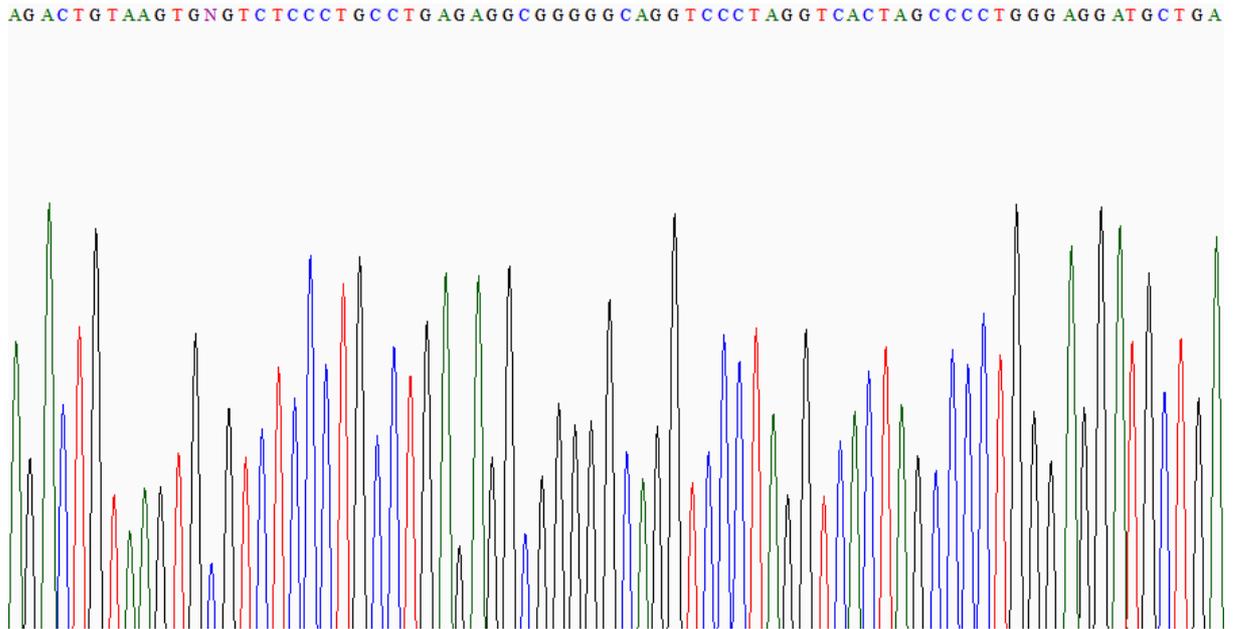


Figura 5. Cromatograma obtido no sequenciamento do produto de PCR de parte do domínio PH Centaurina.

A identificação de SNPs em indivíduos heterozigotos foi realizada com a utilização do pacote de programas Phred/Phrap/Consed. A presença de 2 picos no eletroferograma foi interpretada como um polimorfismo (Figura 6).

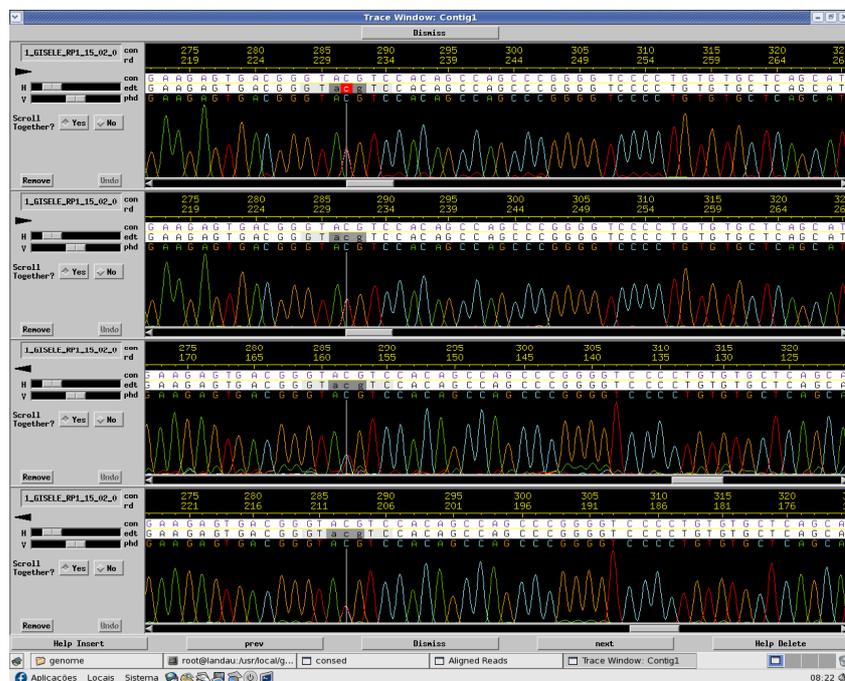


Figura 6. Saída da análise de seqüências de um touro pelo pacote Phred/Phrap/Consed e exemplo de um SNP (representado pela presença de 2 picos sobrepostos).

Polimorfismos encontrados entre indivíduos homozigotos para um dado SNP foram detectados por meio de alinhamentos entre as seqüências consensos de cada região avaliada de todos os animais seqüenciados. Essa análise foi realizada com a utilização do programa Bioedit (HALL, 1999) (Figura 7).

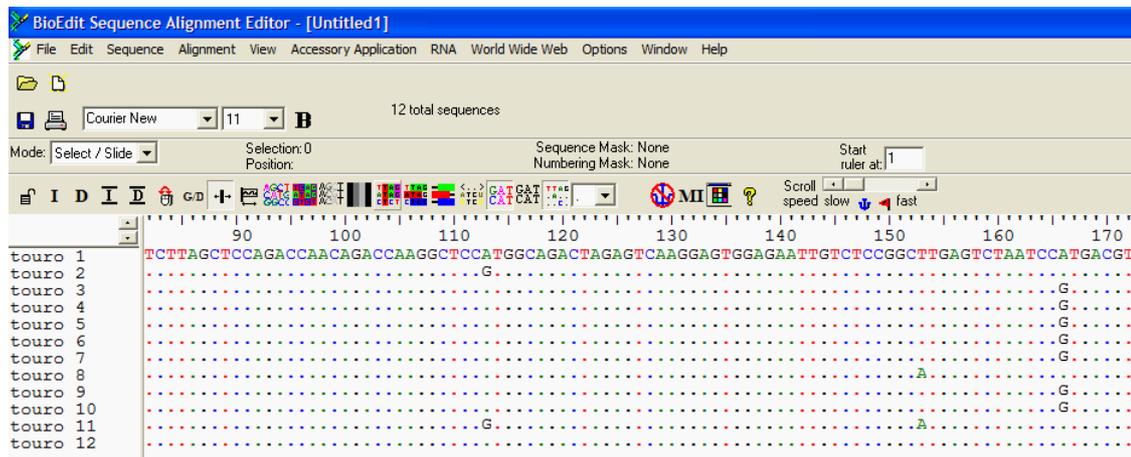


Figura 7. Seqüências consenso dos touros alinhadas pelo programa BioEdit que utiliza o algoritmo do programa Clustal W para identificação de polimorfismos entre indivíduos. Sendo que os pontos (“.”) representam nucleotídeos comuns à seqüência do touro 1 e as letras “G, A” representam polimorfismos.

2.4.6. SNPs identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3

Foram identificados 76 SNPs nas regiões analisadas do gene DDEF1, sendo que 17 SNPs encontram-se em exons (Tabela 5) e um SNP está localizado no primeiro nucleotídeo do sitio alvo do miRNA mmu-miR-721 (localizado no exon 31 na posição 338.616 pb do gene DDEF1). Nas regiões analisadas do gene IGFBP3 foram identificados nove SNPs, estando seis contidos em exons (Tabela 5). Todos os SNPs identificados foram depositados no banco de dados de SNPs do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os números de identificação de cada SNP fornecido pelo banco de dados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Polimorfismos nas regiões RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, R1AG, R2AG, R3AG, R4AG, R1A, R2A, R3A, R1S, R2S e miRNA do gene DDEF1 e dos exons 1 a 7, e introns circundantes destes, do gene IGFBP3.

Gene	Primer	Localização no gene em pb	Região do gene	Sequência	Nucleotídeo consenso	Nucleotídeo mutante	NCBI_ss#
DDEF1	RP1	279270	Intron 12	TCCACTA	A	G	181800425
DDEF1	RP1	279348	Intron 13	TCCGTGG	G	A	181800426
DDEF1	RP1	279388	Intron 13	GGCATGA	A	T	181800427
DDEF1	RP1	279401	Intron 13	TCCATGA	A	G	181800428
DDEF1	RP1	279481	Exon 13	CGGCAGA	C	T	181800429
DDEF1	RP1	279523	Intron 14	GTATGTC	T	C	181800430
DDEF1	RP1	279578	Intron 14	AGTGACC	G	A	181800431
DDEF1	RP1	279616	Intron 14	GACGCAC	G	A	181800432
DDEF1	RP1	279624	Intron 14	TTACAGT	C	G	181800433
DDEF1	RP1	279709	Intron 14	CTGATCT	A	G	181800434
DDEF1	RP2	280448	Intron 14	TATTGGG	T	C	181800435
DDEF1	RP2	280457	Intron 14	GTGTTTG	T	A	181800436
DDEF1	RP2	280466	Intron 14	TCCATCC	A	G	181800437
DDEF1	RP2	280559	Intron 15	GCTTGTT	T	C	181800438
DDEF1	RP2	280615	Intron 15	AGCGCAT	G	T	181800439
DDEF1	RP3	289610	Intron 15	AGTATTC	A	G	181800440
DDEF1	RP3	289636	Intron 15	TTATCGA	T	C	181800441
DDEF1	RP3	289705	Intron 15	TGCGTTT	G	A	181800442
DDEF1	RP3	289729	Intron 15	TCATGTC	T	C	181800443
DDEF1	RP3	289732	Intron 15	TGTCCAG	C	T	181800444
DDEF1	RP3	289777	Exon 15	CCAGGTG	G	A	181800445
DDEF1	RP3	289810	Exon 15	TTTCGAC	C	T	181800446
DDEF1	RP3	289841	Intron 16	TCCTGGG	T	C	181800447
DDEF1	RP3	289874	Intron 16	CCCATTC	A	G	181800448
DDEF1	RP4	291964	Intron 17	CACGGCA	G	A	181800449
DDEF1	RP5	294998	Intron 17	TCCGAGT	G	A	181800450
DDEF1	RP5	295023	Intron 17	AACGCAG	G	A	181800451
DDEF1	RP5	295041	Intron 17	GCACTCA	C	T	181800452
DDEF1	RP5	295067	Intron 17	TGGCGGC	C	T	181800453
DDEF1	RP5	295091	Exon 17	GACGAAC	G	A	181800454
DDEF1	RP5	295106	Exon 17	GGAGGCC	G	A	181800455
DDEF1	R1AG	295211	Exon 17	CGACGTC	C	T	181800456
DDEF1	R1AG	295266	Intron 18	GCACGCC	C	T	181800457
DDEF1	R1AG	295277	Intron 18	CACGCCC	G	A	181800458
DDEF1	R1AG	295286	Intron 18	CACATAC	A	G	181800459
DDEF1	R1AG	295293	Intron 18	TCCCAAC	C	G	181800460
DDEF1	R1AG	295316	Intron 18	TCCGAGT	G	A	181800461
DDEF1	R1AG	295321	Intron 18	GTGCGGT	C	T	181800462
DDEF1	R1AG	295329	Intron 18	ACCCGTG	C	T	181800463
DDEF1	R2AG	296675	Intron 18	AGTTTTA	T	C	181800464
DDEF1	R2AG	296691	Intron 18	GCTCCCT	C	A	181800465

Tabela 5: Polimorfismos nas regiões RP1, RP2, RP3, RP4, RP5, R1AG, R2AG, R3AG, R4AG, R1A, R2A, R3A, R1S, R2S e miRNA do gene DDEF1 e dos exons 1 a 7, e introns circundantes destes, do gene IGFBP3 (Continuação...).

Gene	Primer	Localização no gene em pb	Região do gene	Sequência	Nucleotídeo consenso	Nucleotídeo mutante	NCBI_ss#
DDEF1	R2AG	296709	Intron 18	CTTTCCC	T	C	181800466
DDEF1	R2AG	296728	Intron 18	AAAATTT	A	T	181800467
DDEF1	R2AG	296765	Intron 18	CACTCTA	T	A	181800468
DDEF1	R2AG	296805	Exon 18	AGAACCC	A	G	181800469
DDEF1	R2AG	296832	Exon 18	GGGTATC	T	C	181800470
DDEF1	R2AG	296956	Intron 19	TCACGAA	C	T	181800471
DDEF1	R2AG	297005	Intron 19	TACAAAG	A	C	181800472
DDEF1	R2AG	297037	Intron 19	TGCGTAG	G	A	181800473
DDEF1	R3AG	298765	Intron 19	ACTATCT	A	C	181800474
DDEF1	R3AG	298842	Intron 19	GAGGGAA	G	A	181800475
DDEF1	R3AG	298921	Intron 19	TGCGTTT	G	A	181800476
DDEF1	R3AG	299054	Intron 20	GAATTCT	T	A	181800477
DDEF1	R3AG	299072	Intron 20	TAACTGT	C	T	181800478
DDEF1	R3AG	299102	Intron 20	TTCATGG	A	G	181800479
DDEF1	R4AG	302193	Intron 20	CTTGCGC	G	C	181800480
DDEF1	R4AG	302287	Exon 20	GACCGTA	C	T	181800481
DDEF1	R4AG	302353	Exon 20	ATCCTCA	C	T	181800482
DDEF1	R4AG	302359	Exon 20	ATCAGCT	A	T	181800483
DDEF1	R4AG	302361	Exon 20	GAACGAA	C	T	181800484
DDEF1	R4AG	302428	Exon 20	TGCAGAG	A	C	181800485
DDEF1	R4AG	302474	Intron 21	GTAACAG	A	C	181800486
DDEF1	R4AG	302499	Intron 21	GAGGAGG	G	C	181800487
DDEF1	R1A	302926	Intron 22	GGTATCT	A	G	181800488
DDEF1	R2A	304327	Intron 23	AAACTCC	C	T	181800490
DDEF1	R2A	304307	Intron 23	CACTGGA	T	C	181800489
DDEF1	R2A	304153	Exon 22	CCTAGAT	A	G	181800491
DDEF1	R3A	304683	Intron 24	GGGCGTT	C	T	181800492
DDEF1	R1S	335016	Intron 31	TGCATGG	A	G	181800493
DDEF1	R1S	335110	Intron 31	CTTATCA	A	G	181800494
DDEF1	R1S	334712	Intron 30	GGCCCTT	C	T	181800495
DDEF1	R1S	334730	Intron 30	GCACCCA	C	T	181800496
DDEF1	R1S	334788	Intron 30	GCTCGGC	C	T	181800497
DDEF1	mi_RNA	338565	Exon 31	TCTGTTG	G	A	181800499
DDEF1	mi_RNA	338514	Exon 31	TTTTTTC	T	C	181800498
DDEF1	mi_RNA	338616	Exon 31	ACGCTGC	C	G	181800500
IGFBP3	E 3_4	4394	Exon 4	TGTTGGA	T	C	181800501
IGFBP3	E 3_4	4416	Intron 5	TGCCCTC	C	T	181800503
IGFBP3	E 3_4	4412	Intron 5	CCCCTGC	G	A	181800502
IGFBP3	E 5	4622	Intron 5	TCAATCA	A	G	181800504
IGFBP3	E 5	4748	Exon 5	GTACGCT	C	T	181800506
IGFBP3	E 5	4729	Exon 5	CACGTAC	G	A	181800505
IGFBP3	E 7	6903	Exon 7	TTAGAAA	G	A	181800507
IGFBP3	E 7	7034	Exon 7	GCACGGT	C	T	181800509
IGFBP3	E 7	6942	Exon 7	TGGTGAA	T	G	181800508

Todos os SNPs identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 apresentaram frequência superior a 4% nos extremos de valor genético analisados (Tabela 6)

Tabela 6. Frequências dos polimorfismos identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 nos extremos de valor genético

Gene	Localização do SNP no gene em pb	NCBI_ss#	Nucleotídeo consenso	Frequência do	Nucleotídeo mutante	Frequência do
				nucleotídeo consenso		nucleotídeo mutante
DDEF1	279270	181800425	A	30,00%	G	70,00%
DDEF1	279348	181800426	G	29,17%	A	70,83%
DDEF1	279388	181800427	A	16,67%	T	83,33%
DDEF1	279401	181800428	A	58,33%	G	41,67%
DDEF1	279481	181800429	C	95,83%	T	4,17%
DDEF1	279523	181800430	T	25,00%	C	75,00%
DDEF1	279578	181800431	G	87,50%	A	12,50%
DDEF1	279616	181800432	G	87,50	A	12,50%
DDEF1	279624	181800433	C	95,83%	G	4,17%
DDEF1	279709	181800434	A	41,67%	G	58,33%
DDEF1	280448	181800435	T	12,50%	C	87,50%
DDEF1	280457	181800436	T	33,33%	A	66,67%
DDEF1	280466	181800437	A	79,17%	G	20,83%
DDEF1	280559	181800438	T	12,50%	C	87,50%
DDEF1	280615	181800439	G	95,45%	T	4,55%
DDEF1	289610	181800440	A	79,17%	G	20,83%
DDEF1	289636	181800441	T	62,50%	C	37,50%
DDEF1	289705	181800442	G	79,17%	A	20,83%
DDEF1	289729	181800443	T	91,67%	C	8,33%
DDEF1	289732	181800444	C	16,67%	T	83,33%
DDEF1	289777	181800445	G	87,50%	A	12,50%
DDEF1	289810	181800446	C	41,67%	T	58,33%
DDEF1	289841	181800447	T	66,67%	C	33,33%
DDEF1	289874	181800448	A	8,33%	G	91,67%
DDEF1	291964	181800449	G	91,67%	A	8,33%
DDEF1	294998	181800450	G	95,00%	A	5,00%
DDEF1	295023	181800451	G	85,00%	A	15,00%
DDEF1	295041	181800452	C	75,00%	T	25,00%
DDEF1	295067	181800453	C	95,00%	T	5,00%
DDEF1	295091	181800454	G	80,00%	A	20,00%
DDEF1	295106	181800455	G	85,00%	A	15,00%
DDEF1	295211	181800456	C	95,00%	T	5,00%
DDEF1	295266	181800457	C	85,00%	T	15,00%
DDEF1	295277	181800458	G	95,00%	A	5,00%
DDEF1	295286	181800459	A	60,00%	G	40,00%
DDEF1	295293	181800460	C	85,00%	G	15,00%
DDEF1	295316	181800461	G	95,00%	A	5,00%
DDEF1	295321	181800462	C	95,00%	T	5,00%
DDEF1	295329	181800463	C	70,00%	T	30,00%
DDEF1	296675	181800464	T	95,83%	C	4,17%
DDEF1	296691	181800465	C	37,50%	A	62,50%

Tabela 6. Frequências dos polimorfismos identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 nos extremos de valor genético (Continuação...).

Gene	Localização no gene em pb	NCBI_ss#	Nucleotídeo consenso	Frequência do nucleotídeo consenso	Nucleotídeo mutante	Frequência do nucleotídeo mutante
DDEF1	296709	181800466	T	83,33%	C	16,67%
DDEF1	296728	181800467	A	83,33%	T	16,67%
DDEF1	296765	181800468	T	95,83%	A	4,17%
DDEF1	296805	181800469	A	79,17%	G	20,83%
DDEF1	296832	181800470	T	41,67%	C	58,33%
DDEF1	296956	181800471	C	91,67%	T	8,33%
DDEF1	297005	181800472	A	91,67%	C	8,33%
DDEF1	297037	181800473	G	20,83%	A	79,17%
DDEF1	298765	181800474	A	83,33%	C	16,67%
DDEF1	298842	181800475	G	79,17%	A	20,83%
DDEF1	298921	181800476	G	79,17%	A	20,83%
DDEF1	299054	181800477	T	95,83%	A	4,17%
DDEF1	299072	181800478	C	16,67%	T	83,33%
DDEF1	299102	181800479	A	12,50%	G	87,50%
DDEF1	302193	181800480	G	87,50%	C	12,50%
DDEF1	302287	181800481	C	83,33%	T	16,67%
DDEF1	302353	181800482	C	50,00%	T	50,00%
DDEF1	302359	181800483	A	87,50%	T	12,50%
DDEF1	302361	181800484	C	91,67%	T	8,33%
DDEF1	302428	181800485	A	91,67%	C	8,33%
DDEF1	302474	181800486	A	83,33%	C	16,67%
DDEF1	302499	181800487	G	91,67%	C	8,33%
DDEF1	302926	181800488	A	12,50%	G	87,50%
DDEF1	304327	181800490	C	95,83%	T	4,17%
DDEF1	304307	181800489	T	33,33%	C	66,67%
DDEF1	304153	181800491	A	87,50%	G	12,50%
DDEF1	304683	181800492	C	95,83%	T	4,17%
DDEF1	335016	181800493	A	62,50%	G	37,50%
DDEF1	335110	181800494	A	95,83%	G	4,17%
DDEF1	334712	181800495	C	91,67%	T	8,33%
DDEF1	334730	181800496	C	91,67%	T	8,33%
DDEF1	334788	181800497	C	91,67%	T	8,33%
DDEF1	338565	181800499	G	95,83%	A	4,17%
DDEF1	338514	181800498	T	95,83%	C	4,17%
DDEF1	338616	181800500	C	16,67%	G	83,33%
IGFBP3	4394	181800501	T	54,17%	C	45,83%
IGFBP3	4416	181800503	C	91,67%	T	8,33%
IGFBP3	4412	181800502	G	75,00%	A	25,00%
IGFBP3	4622	181800504	A	91,67%	G	8,33%
IGFBP3	4748	181800506	C	91,67%	T	8,33%
IGFBP3	4729	181800505	G	91,67%	A	8,33%
IGFBP3	6903	181800507	G	95,83%	A	4,17%
IGFBP3	7034	181800509	C	91,67%	T	8,33%
IGFBP3	6942	181800508	T	95,83%	G	4,17%

2.4.7. Teste de independência e de alteração de aminoácidos para escolha do SNP a ser testado na população

Os 12 touros utilizados na identificação de SNPs foram genotipados para todos os SNPs detectados e um teste exato de Fisher foi realizado para cada SNP. Um valor de $P = 0.0167$ foi revelado para o SNP (DDEF1g.279401A>G) localizado no intron 13 na posição 279.401 pb do gene DDEF1 (Tabela 7). Além desses polimorfismos, outros dois polimorfismos foram significativos ($P < 0,05$) nas posições 279.348 e 302.474 desse gene (Tabela 7). Nenhum SNP identificado no gene IGFBP3 apresentou efeito significativo no teste exato de Fisher (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado do teste exato de Fisher para todas as regiões analisadas dos genes DDEF1 e IGFBP3, organizado de forma decrescente segundo o valor de P.

Gene	Primer	Localização no gene DDEF1 em pb	Região do gene	Sequência	Genótipo	P
DDEF1	RP1	279401	Intron 13	TCCATGA	A/G	0.0167*
DDEF1	RP1	279348	Intron 13	TCCGTGG	G/A	0.032*
DDEF1	R4AG	302474	Intron 21	GTAACAG	A/C	0.0466*
DDEF1	RP1	279523	Intron 14	GTATGTC	T/C	0.0706
DDEF1	RP3	289841	Intron 16	TCCTGGG	T/C	0.0829
DDEF1	RP1	279709	Intron 14	CTGATCT	A/G	0.0888
DDEF1	RP3	289810	Exon 15	TTTCGAC	C/T	0.0888
DDEF1	RP1	279578	Intron 14	AGTGACC	G/A	0.1087
DDEF1	R4AG	302359	Exon 20	ATCAGCT	A/T	0.1087
DDEF1	R3AG	298921	Intron 19	TGCGTTT	G/A	0.1398
DDEF1	RP3	289636	Intron 15	TTATCGA	T/C	0.1555
DDEF1	R1S	335016	Intron 31	TGCATGG	A/G	0.1555
DDEF1	R1AG	295329	Intron 18	ACCCGTG	C/T	0.1635
DDEF1	RP3	289729	Intron 15	TCATGTC	T/C	0.2391
DDEF1	R2AG	297005	Intron 19	TACAAAG	A/C	0.2391
DDEF1	R4AG	302361	Exon 20	GAACGAA	C/T	0.2391
DDEF1	R1S	334712	Intron 30	GGCCCTT	C/T	0.2391
DDEF1	R1S	334730	Intron 30	GCACCCA	C/T	0.2391
DDEF1	R1S	334788	Intron 30	GCTCGGC	C/T	0.2391
DDEF1	RP1	279388	Intron 13	GGCATGA	A/T	0.2484
DDEF1	mi_RNA	338616	Exon 31	ACGCTGC	C/G	0.2484
DDEF1	R1AG	295286	Intron 18	CACATAC	A/G	0.2751
DDEF1	R2AG	296691	Intron 18	GCTCCCT	C/A	0.2998
DDEF1	RP1	279270	Intron 12	TCCACTA	A/G	0.3
DDEF1	R2AG	296832	Exon 18	GGGTATC	T/C	0.3198
DDEF1	RP2	280457	Intron 14	GTGTTTG	T/A	0.3332
DDEF1	R2A	304307	Intron 23	CACTGGA	T/C	0.3332
DDEF1	RP2	280466	Intron 14	TCCATCC	A/G	0.3416
DDEF1	RP3	289610	Intron 15	AGTATTC	A/G	0.3416
DDEF1	RP3	289705	Intron 15	TGCGTTT	G/A	0.3416

Tabela 7. Resultado do teste exato de Fisher para todas as regiões analisadas dos genes DDEF1 e IGFBP3, organizado de forma decrescente segundo o valo de P. (Continuação...).

Gene	Primer	Localização no gene DDEF1 em pb	Região do gene	Sequência	Genótipo	P
DDEF1	R2AG	296805	Exon 18	AGAACCC	A/G	0.3416
DDEF1	R2AG	297037	Intron 19	TGCGTAG	G/A	0.3416
DDEF1	R3AG	298842	Intron 19	GAGGGAA	G/A	0.3416
DDEF1	RP5	295091	Exon 17	GACGAAC	G/A	0.3633
DDEF1	RP1	279616	Intron 14	GACGCAC	G/A	0.3913
DDEF1	RP2	280448	Intron 14	TATTGGG	T/C	0.3913
DDEF1	RP2	280559	Intron 15	GCTTGTT	T/C	0.3913
DDEF1	RP3	289777	Exon 15	CCAGGTG	G/A	0.3913
DDEF1	R3AG	299102	Intron 20	TTCATGG	A/G	0.3913
DDEF1	R4AG	302193	Intron 20	CTTGCGC	G/C	0.3913
DDEF1	R1A	302926	Intron 22	GGATCT	A/G	0.3913
DDEF1	R2A	304153	Exon 22	CCTAGAT	A/G	0.3913
DDEF1	RP5	295041	Intron 17	GCACTCA	C/T	0.3973
DDEF1	RP5	294998	Intron 17	TCCGAGT	G/A	0.4
DDEF1	RP5	295067	Intron 17	TGGCGGC	C/T	0.4
DDEF1	R1AG	295211	Exon 17	CGACGTC	C/T	0.4
DDEF1	R1AG	295277	Intron 18	CACGCCC	G/A	0.4
DDEF1	R1AG	295316	Intron 18	TCCGAGT	G/A	0.4
DDEF1	RP3	289732	Intron 15	TGTCCAG	C/T	0.4099
DDEF1	R2AG	296709	Intron 18	CTTTCCC	T/C	0.4099
DDEF1	R2AG	296728	Intron 18	AAAATTT	A/T	0.4099
DDEF1	R3AG	298765	Intron 19	ACTATCT	A/C	0.4099
DDEF1	R3AG	299072	Intron 20	TAAGTGT	C/T	0.4099
DDEF1	R4AG	302287	Exon 20	GACCGTA	C/T	0.4099
DDEF1	RP2	280615	Intron 15	AGCGCAT	G/T	0.4545
DDEF1	R4AG	302353	Exon 20	ATCCTCA	C/T	0.4545
DDEF1	RP5	295023	Intron 17	AACGCAG	G/A	0.4632
DDEF1	RP5	295106	Exon 17	GGAGGCC	G/A	0.4632
DDEF1	R1AG	295266	Intron 18	GCACGCC	C/T	0.4632
DDEF1	R1AG	295293	Intron 18	TCCCAAC	C/G	0.4632
DDEF1	RP1	279481	Exon 13	CGGCAGC	C/T	0.5
DDEF1	RP1	279624	Intron 14	TTACAGT	C/G	0.5
DDEF1	R2AG	296675	Intron 18	AGTTTTA	T/C	0.5
DDEF1	R2AG	296765	Intron 18	CACTCTA	T/A	0.5
DDEF1	R3AG	299054	Intron 20	GAATTCT	T/A	0.5
DDEF1	R2A	304327	Intron 23	AAACTCC	C/T	0.5
DDEF1	R3A	304683	Intron 24	GGGCGTT	C/T	0.5
DDEF1	R1S	335110	Intron 31	CTTATCA	A/G	0.5
DDEF1	mi_RNA	338565	Exon 31	TCTGTTG	G/A	0.5
DDEF1	mi_RNA	338514	Exon 31	TTTTTTC	T/C	0.5
DDEF1	RP3	289874	Intron 16	CCCATTC	A/G	0.5217
DDEF1	RP4	291964	Intron 17	CACGGCA	G/A	0.5217
DDEF1	R2AG	296956	Intron 19	TCACGAA	C/T	0.5217
DDEF1	R4AG	302428	Exon 20	TGCAGAG	A/C	0.5217
DDEF1	R4AG	302499	Intron 21	GAGGAGG	G/C	0.5217
DDEF1	R1AG	295321	Intron 18	GTGCGGT	C/T	0.6
IGFBP3	E 3_4	4394	Exon 4	TGTTGGA	T/C	0.1571
IGFBP3	E 3_4	4412	Intron 5	CCCGTGC	G/A	0.2427
IGFBP3	E 7	6903	Exon 7	TTAGAAA	G/A	0.5

Tabela 7. Resultado do teste exato de Fisher para todas as regiões analisadas dos genes DDEF1 e IGFBP3, organizado de forma decrescente segundo o valor de P. (Continuação...).

Gene	Primer	Localização no gene		Sequência	Genótipo	P
		DDEF1 em pb	Região do gene			
IGFBP3	E 7	6942	Exon 7	TGGTGAA	T/G	0.5
IGFBP3	E 3_4	4416	Intron 5	TGCCTTC	C/T	0.5217
IGFBP3	E 5	4622	Intron 5	TCAATCA	A/G	0.5217
IGFBP3	E 5	4748	Exon 5	GTACGCT	C/T	0.5217
IGFBP3	E 5	4729	Exon 5	CACGTAC	G/A	0.5217
IGFBP3	E 7	7034	Exon 7	GCACGGT	C/T	0.5217

* P ≥ 0,05;

SNPs localizados no exon 31 (NCBI_ss181800498, ss181800499 e ss181800500) do gene DDEF1 causaram mudança de aminoácidos na proteína. No entanto, essas substituições não afetaram a propriedade química dos aminoácidos na estrutura protéica (Tabela 8). SNPs localizados nos exons 4 (NCBI_ss181800501), 5 (NCBI_ss181800506) e 7 (NCBI_ss181800509) resultaram em alteração de aminoácido na proteína IGFBP3, sendo que os aminoácidos alterados possuem propriedades químicas distintas (não polar por polar ou vice-versa), o que pode indicar alteração funcional do produto gênico (Tabela 8).

Uma vez que vários trabalhos relataram a presença de um QTL para deposição de gordura no BTA 4 e no BTA14 (CASAS et al., 2000; MOORE et al., 2003) e há discussões contrastantes a respeito de qual gene dessas regiões influenciam a característica, os polimorfismos identificados nos genes DDEF1 e IGFBP3 podem ser candidatos a explicar a associação dessa região com a espessura de gordura em bovinos. Sendo assim, o SNP da posição 279.401 pb do gene DDEF1 (DDEF1g.279401A>G) foi eleito segundo o teste exato de Fisher e o SNP na posição 4.394 pb do gene IGFBP3 (IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg)) foi eleito segundo o critério de alteração de aminoácido na proteína para serem genotipados em uma população de Canchim e MA para investigação de associação com EGS. O SNP DDEF1g.279401A>G foi genotipado em 987 animais e o SNP IGFBP3c.4394T>C foi genotipado em 645 animais provenientes de famílias de meio-irmãos com mais de 8 animais.

Tabela 8. Resultado da avaliação de alteração de aminoácido nas proteínas DDEF1 e IGFBP3 em sequências que contêm SNPs.

Gene	Localização do SNP no gene em pb	Exon	Genótipo	AA normal	Propriedade do AA normal	AA mutante	Propriedade do AA mutante	Posição do aminoácido na proteína
DDEF1	279481	13	C/T	Glicina	Não polar, grupo R alifático	Glicina	Não polar, grupo R alifático	27
DDEF1	289810	15	C/T	Fenilalanina	Não polar, grupo R aromático	Fenilalanina	Não polar, grupo R aromático	288
DDEF1	295091	17	G/A	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	415
DDEF1	295106	17	G/A	Ácido glutâmico	Polar, Grupo R não carregado	Ácido glutâmico	Polar, Grupo R não carregado	420
DDEF1	295211	17	C/T	Ácido aspártico	Polar, Grupo R carregado negativamente	Ácido aspártico	Polar, Grupo R carregado negativamente	455
DDEF1	296805	18	A/G	Ácido glutâmico	Polar, Grupo R não carregado	Ácido glutâmico	Polar, Grupo R não carregado	464
DDEF1	296832	18	T/C	Glicina	Não polar, grupo R alifático	Glicina	Não polar, grupo R alifático	473
DDEF1	302287	20	C/T	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	540
DDEF1	302353	20	C/T	Serina	Polar, Grupo R não carregado	Serina	Polar, Grupo R não carregado	562
DDEF1	302359	20	A/T	Serina	Polar, Grupo R não carregado	Serina	Polar, Grupo R não carregado	564
DDEF1	302361	20	C/T	Asparagina	Polar, Grupo R não carregado	Asparagina	Polar, Grupo R não carregado	568
DDEF1	302428	20	A/C	Alanina	Não polar, grupo R alifático	Alanina	Não polar, grupo R alifático	587
DDEF1	304153	22	A/G	Leucina	Não polar, grupo R alifático	Leucina	Não polar, grupo R alifático	633
DDEF1	338514	31	T/C	Fenilalanina	Não polar, grupo R aromático	Leucina	Não polar, grupo R alifático	1528
DDEF1	338565	31	G/A	Valina	Não polar, grupo R alifático	Isoleucina	Não polar, grupo R alifático	1545
DDEF1	338616	31	C/G	Leucina	Não polar, grupo R alifático	Valina	Não polar, grupo R alifático	1562
IGFBP3	4394	4	T/C	Triptofano	Não polar, grupo R aromático	Arginina	Polar, grupo R carregado positivamente	416

Tabela 8. Resultado da avaliação de alteração de aminoácido nas proteínas DDEF1 e IGFBP3 em sequências que contêm SNPs (Continuação...).

Gene	Localização do SNP no gene em pb	Exon	Genótipo	AA normal	Propriedade do AA normal	AA mutante	Propriedade do AA mutante	Posição do aminoácido na proteína
IGFBP3	4748	5	C/T	Cisteína	Polar, Grupo R não carregado	Tirosina	Não polar, grupo R aromático	60
IGFBP3	4729	5	G/A	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	74
IGFBP3	6903	7	G/A	Stop codon		Stop codon	Stop codon	339
IGFBP3	7034	7	C/T	Treonina	Polar, Grupo R não carregado	Metionina	Não polar, grupo R alifático	383
IGFBP3	6942	7	T/G	Glicina	Não polar, grupo R alifático	Glicina	Não polar, grupo R alifático	352

2.4.8. Genotipagem dos SNPs DDEF1g.279401A>G e IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg)

O SNP DDEF1g.279401A>G foi genotipado por ARMS/PCR. O ideal seria obter condições de reação que permitissem a utilização dos três *primers* ao mesmo tempo, assim, dependendo do alelo (A ou G) do SNP DDEF1g.279401A>G que o animal possuísse anelariam o *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* A ou o *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* G. No entanto, após várias tentativas tais condições não foram obtidas, pois mesmo que o animal fosse homozigoto para o alelo A o *primer* alelo-específico *reverse* G também anelava e vice-versa. Sendo assim, para evitar erros de genotipagem, optou-se por realizar reações separadas para cada *primer* alelo-específico, isto é, duas reações para cada animal, uma contendo o *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* A e outra contendo o *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* G. Para servir de controle de amplificação positivo foi inserido em cada reação um outro *primer outer* só que *reverse*. Os quatro *primers* que foram desenhados e utilizados para genotipagem do SNP DDEF1g.279401A>G estão representados na Tabela 9:

Tabela 9. Primers desenhados para genotipagem do SNP DDEF1g.279401A>G

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Amplicon em pb</i>
DDEF1 In R alelo G	DDEF1	ATATGGGAATCCTAGAGAGGAGACG TAAC	234
DDEF1 In R alelo A	DDEF1	GGGAATCCTAGAGAGGAGACGTAAT	230
DDEF1 outer F	DDEF1	GACTAGAAATAGGAGACCCGGACC	
DDEF1 outer R	DDEF1	GCCTTCCTCAAACCACACAT	570

Dessa forma, em cada reação obteve-se a amplificação de duas regiões, isto é, uma formada pelos dois *primers outers* (pico controle) e outra formada pelo *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* G ou pelo *primer outer forward* e o *primer* alelo-específico *reverse* A, dependendo do genótipo do animal.

Quando o animal apresenta o alelo A aparecem dois picos, um referente ao controle de 570 pb e outro referente a amplificação alelo-específica de 230 pb (Figura 8b) e, se na reação onde é colocado o *primer* alelo-específico A o animal for homozigoto GG só aparecerá o pico controle de 570 pb (Figura 8a) quando o animal apresenta o alelo G aparecem também dois picos, um referente ao controle de 570 pb e outra referente a amplificação alelo-específica de 234 pb. Foram realizadas 2 reações de PCR para cada animal, uma para cada *primer* alelo-específico.

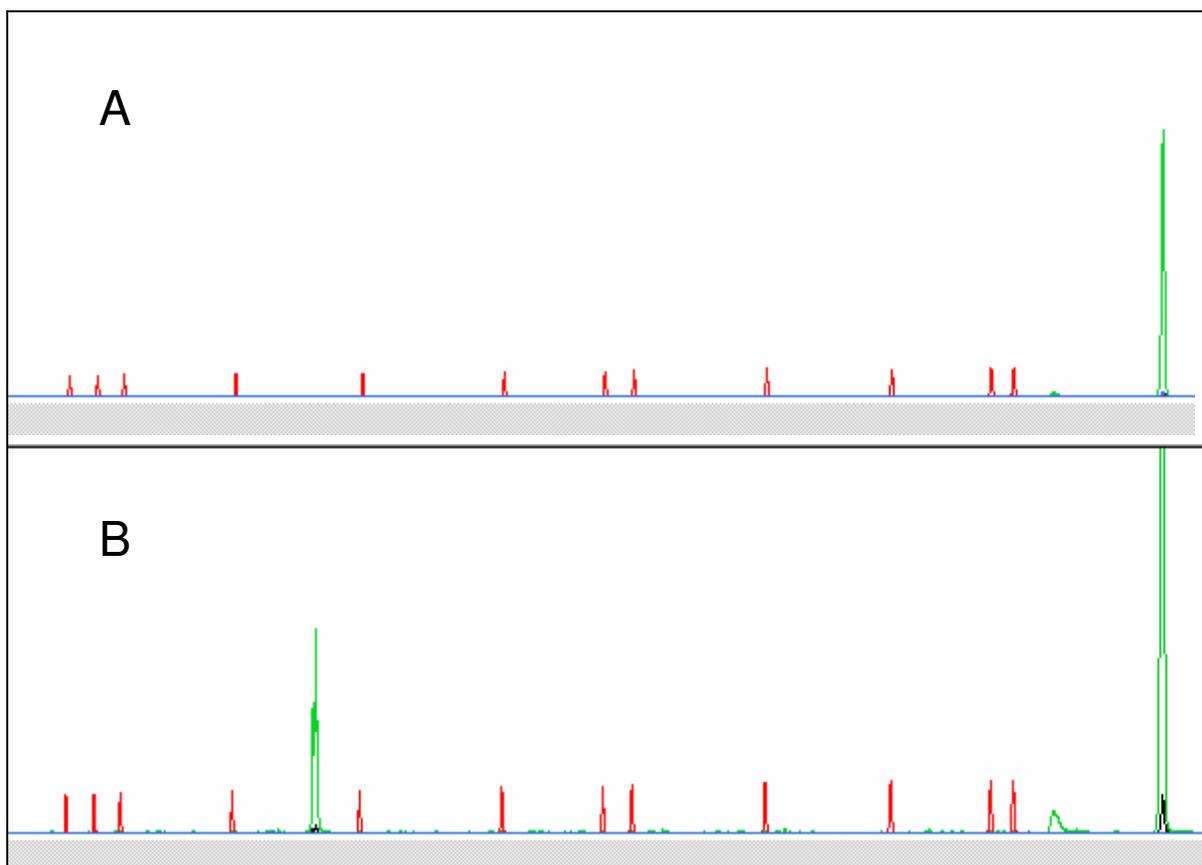


Figura 8. Eletroferograma de uma reação de genotipagem do SNP no gene DDEF1. **A.** Eletroferograma de uma reação de PCR com o primer alelo-específico A de um animal homocigoto GG, demonstrando a ausência de amplificação referente ao alelo A com presença apenas do pico controle de 570 pb (em verde). **B.** Eletroferograma de uma reação de PCR contendo o primer alelo-específico A de um animal que possui este alelo, onde tem-se a presença de 2 picos (em verde), um de 230 pb referente ao alelo A e outro de 570 pb referente ao pico controle.

O SNP IGFBP3c.4394T>C(Trp>Arg) do gene IGFBP3 foi genotipado pelo método TaqMan. Os *primers* e sondas utilizados estão representados na Tabela 10. Na Figura 9 está representado o resultado da genotipagem de dois animais, um heterocigoto e um homocigoto.

Tabela 10. Primers e sondas utilizados na genotipagem do SNP em IGFBP3

Primer Forward	Primer Reverse	Sonda para o alelo C	Sonda para o alelo T
GAAGCCTGATGTGATGTCCTATGG	CAGGAAGGCACGGGTGTATAA	TCCCATGTTGGACCC (fluoróforo: VIC)	CCATGTCGGACCC (fluoróforo: FAM)

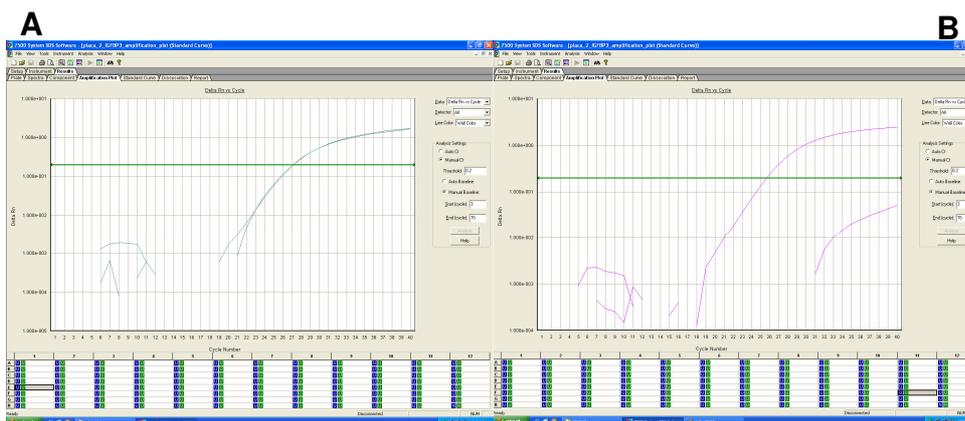


Figura 9. Representação da saída para genotipagem de um SNP pelo método TaqMan. Na Figura A está representado o genótipo de um indivíduo heterozigoto e na Figura B o genótipo de um indivíduo homozigoto.

2.4.9. Frequências alélicas dos marcadores IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4

As frequências alélicas de todos os marcadores utilizados nas análises apresentam-se na Tabela 11. Pode-se verificar que todos os marcadores apresentaram boa distribuição alélica, não apresentando nenhuma frequência abaixo de 10%. O alelo que apresentou menor frequência foi o alelo T do gene CRH.

Tabela 11. Frequência alélica dos marcadores IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 consideradas nas análises.

IGFBP3		PPARGC1A		PSMC1		DDEF1		CRH		FABP4	
Alelo	F (%)	Alelo	F (%)	Alelo	F (%)	Alelo	F (%)	Alelo	F (%)	Alelo	F (%)
C	43,5	C	85,63	A	74,45	A	35,65	C	87,87	A	49,1
T	56,5	T	14,36	G	25,54	G	63,35	T	12,12	G	50,9

F=Frequência

2.4.10. Resultado das análises de associação dos SNPs dos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4 com espessura de gordura subcutânea

Os SNPs estudados nos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1 e CRH não foram significativamente associados com espessura de gordura subcutânea na população Canchim e MA estudada (Tabela 12). O GC afetou as medidas de EGS em todos os modelos de análise de associação e a idade afetou as médias de EGS nos modelos de análise dos genes PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4.

Tabela 12. Resultado da análise de Máxima Verossimilhança Restrita para os SNPs analisados nos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1, DDEF1, CRH e FABP4.

Efeito	IGFBP3		PPARGC1A		PSMC1		DDEF1		CRH		FABP4	
	GL	Valor P	GL	Valor P	GL	Valor P	GL	Valor P	GL	Valor P	GL	Valor P
Média	1	0,676	1	0,326	1	<,001	1	<0,01	1	<,001	1	<,001
GC	29	<,001	32	<,001	29	<,001	32	<0,01	32	<,001	29	<,001
IGFBP3	2	0,449
PPARGC1A	.	.	2	0,378
PSMC1	2	0,412
DDEF1	2	0,07
CRH	2	0,462	.	.
FABP4	2	0,014
Idade	1	0,198	1	0,566	1	<,001	1	<0,01	1	<,001	1	<,001

GC= Grupo de contemporâneos; GL= Grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância.

Em humanos, níveis de IGFBP1 mostram associação sugestiva com massa gorda (SOUREN et al., 2008). Um estudo realizado com crianças hispânicas demonstrou que IGFBP1 e IGFBP3 são inversamente proporcionais a adiposidade (TOLEDO-CORRAL et al., 2008). IGFBP3 está localizado no BTA4 (78.899 pb) em uma região de QTL para marmoreio (MIZOGUCHI et al., 2006) próximo ao gene da leptina, que tem sido apontado pela literatura como gene candidato para explicar parte desse QTL (BUCHANAN et al., 2002). Um polimorfismo do gene da leptina foi estudado na população Canchim e MA em questão e, não foi encontrada associação

entre o mesmo e EGS (SANTIAGO, A.C. et al., 2008). Essas evidências nos levaram a apontar IGFBP3 como gene candidato a influenciar espessura de gordura subcutânea em populações de Canchim e MA. No entanto, nossa hipótese não encontrou suporte na análise realizada no presente trabalho (Tabela 12). Em suínos, haplótipos do gene IGFBP3 foram relacionados à variação da espessura de gordura (WANG et al., 2009). Em frangos, um SNP presente na região 3' do gene IGFBP2 foi associado com o peso e porcentagem de gordura abdominal (LENG et al., 2009).

QTLs para marmoreio têm sido descritos no BTA6 (MIZOGUCHI et al., 2006; TAKASUGA et al., 2007). Próximo de uma dessas regiões de QTL está localizado o gene PPARGC1A. Soria e colaboradores (2009) estudando um SNP do exon 8 desse gene em bovinos não detectaram associação do mesmo com ganho de espessura de gordura subcutânea na primavera e porcentagem de gordura intramuscular, dentre outras características. Em suínos, um SNP foi associado com taxa de conversão alimentar, gordura abdominal e EGS (Stachowiak et al., 2007). Erkens e colaboradores (2009) identificaram um SNP na região promotora do gene PPARGC1A em suínos e não encontraram associação com qualidade de carne e deposição de gordura. Associação significativa foi observada por Weikard e colaboradores (2005) entre um SNP do intron 9 desse gene e produção de gordura no leite em bovinos de leite. Esse SNP foi avaliado em nosso estudo, mas não foi encontrada associação com EGS (Tabela 12).

Um SNP no intron 13 do gene PSMC1 bovino foi associado com espessura de gordura subcutânea em bovinos, entre outras características (GUO et al., 2008) e, nesse cromossomo (BTA10) foi mapeado um QTL para marmoreio (TAKASUGA et al., 2007). No entanto, em nossa população nenhuma evidência de variação associada ao polimorfismo do gene PSMC1 foi observada (Tabela 12).

O SNP g.9657C>T contido no promotor do gene CRH não apresentou efeito significativo sobre a variação da espessura de gordura subcutânea na população em estudo (Tabela 12). Esse resultado corrobora os resultados de Sherman e colaboradores (2008), que não encontraram associação de SNPs desse gene com características de deposição de gordura. Mesmo considerando o fato de os polimorfismos avaliados não serem os mesmos, caso o SNP estudado por Sherman e colaboradores (2008) afetasse a deposição de gordura em Canchim, haveria grande probabilidade de observar associação decorrente de desequilíbrio de ligação do SNP g.9657C>T com aquele polimorfismo. Nossos resultados contrastam

com os obtidos por Wibowo et al. (2007) que associaram o polimorfismo g.9657C>T, contido no promotor do gene CRH, com espessura de gordura subcutânea em uma população F2 de Wagyu x Limousin.

Resultados conflitantes para genes candidatos podem ser atribuídos a diferenças genéticas entre as populações de bovinos ou subespécies utilizadas em cada estudo, além de efeitos ambientais, de manejo e dieta aos quais cada população foi submetida (RINCKER et al., 2006). Esses resultados confirmam a necessidade de testar um marcador na população e condições ambientais em que se pretende utilizar a informação.

QTLs para espessura de gordura subcutânea têm sido descritos no BTA14 (CASAS et al., 2000; MOORE et al., 2003). O gene da tireoglobulina foi mapeado a 7,8 M nesse cromossomo (THREADGILL et al., 1990; DASKALCHUK e SCHMUTZ, 1997) e, há muito tempo vem sendo apontado como gene candidato para características de deposição de gordura em bovinos (BARENDSE et al., 2001; CASAS et al., 2005; WOOD et al., 2006; GAN et al., 2008). No entanto, em 2007 foi realizado um estudo de associação de um SNP desse gene com EGS na população utilizada nesse projeto e não foi obtido resultado significativo (VENERONI, 2007).

O gene FABP4 vem sendo apontado mais recentemente como gene candidato para características de deposição de gordura em bovinos e também está localizado no BTA14. A literatura relatou associação do gene FABP4 e composição de ácido palmitoleico e ácido linoleico presentes na gordura intramuscular de bovinos (HOASHI et al., 2008). No presente estudo, os genótipos para o polimorfismo do exon 2 no gene FABP4 contribuíram significativamente ($P < 0,014$) para a variação de EGS nos animais estudados (Tabela 12). Esse SNP representou 1,87% da variância fenotípica total e 11,26% da variância aditiva total da característica em estudo. Cho e colaboradores (2008) encontraram associação entre dois SNPs localizados no gene FABP4 e deposição de gordura em bovinos nativos coreanos, sendo que um dos SNPs (exon 2) é o mesmo que se mostrou significativo nesse experimento. Associação significativa foi encontrada entre SNPs desse gene e escores de marmoreio e deposição de gordura subcutânea em animais F2 originados do cruzamento Wagyu x Limousin (MICHAL et al., 2006). Em 2009, Barendse e colaboradores identificaram uma mutação no sitio de splicing entre exon 3 e intron 3 e, esse SNP foi associado com gordura intramuscular em 7 raças de bovinos australianos.

As análises de substituição alélica permitem o cálculo do efeito direto de cada alelo por um modelo de substituição gênica que considera a média do efeito aditivo de um alelo na população. Um valor positivo para o efeito aditivo implica que o efeito do alelo resulta em aumento no fenótipo (KONING et al., 1999).

A substituição de um alelo G por um A do SNP estudado no gene FABP4 indicou efeito significativo ($P \leq 0,01$) (Tabela 13), sugerindo que esta substituição contribui para a variação na média da EGS na população em estudo. O alelo A diminuiria a média de EGS do homozigoto G em 0,1055 mm na população estudada (Tabela 13). Por meio de análises de alinhamento de seqüências utilizando a ferramenta BLAST do banco de dados do NCBI (Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), verificamos que o alelo A do SNP avaliado em FABP4, que diminuiria a EGS na população Canchim estudada, é mais freqüente em animais *Bos taurus* e, Tizioto (2010) estudando uma população de Nelores, verificou maior freqüência do alelo G desse mesmo SNP. Esses resultados condizem com as características dessas populações, pois animais *Bos taurus* tendem a depositar gordura mais tardiamente em relação aos zebuínos. A raça Canchim é formada por 5/8 Charolês+3/8 Zebu, sendo assim, é provável que o alelo A seja oriundo do Nelore e o alelo G do Charolês.

O teste de comparação dos modelos completo (genótipo como efeito fixo) e reduzido (alelos como co-variável em uma regressão), realizado por razão de verossimilhança, não demonstrou diferença significativa entre os mesmos, fato que indica que o efeito do marcador em FABP4 é somente aditivo, não possuindo efeitos de desvios de dominância.

Tabela 13. Resultados das análises de efeito de substituição alélica do marcador analisado no gene FABP4 sobre a espessura de gordura em animais Canchim e MA e, estimativas do coeficiente de regressão para determinar a contribuição do alelo A do marcador no fenótipo

FABP4			Efeito do alelo (mm)
Efeito	GL	Valor P	
Média	1	<0,01	.
GC	29	<0,01	.
Alelo A	1	0,004	- 0,1055
Alelo G	.	.	.
Idade	1	<0,01	.

GC= grupo de contemporâneos; GL= grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância .

Outro SNP analisado nesse estudo e que está contido em um gene presente no BTA 14 foi o DDEF1g.279401A>G no gene DDEF1. Nesse trabalho, encontramos associação significativa a 7% entre esse SNP e EGS na população analisada (Tabela 12) e, a variação atribuída à este polimorfismo correspondeu à 0,72% da variância fenotípica total e 4,19% da variância aditiva total da EGS nessa população. Sugerimos esse gene como candidato a influenciar tal característica por estar localizado na região centromérica do BTA14, a qual possui relatos de QTLs para deposição de gordura em bovinos (CASAS et al., 2000; MOORE et al., 2003) e, também, por indícios de envolvimento com o metabolismo de lipídeos e com diferenciação de fibroblastos em adipócitos (KING et al., 1999). Um SNP desse gene foi associado com marmoreio em gado de corte por Casas e colaboradores (2009).

A substituição do alelo G pelo alelo A do marcador DDEF1g.279401A>G indicou efeito significativo (Tabela 14), sugerindo que essa substituição contribui para a variação da média de EGS na população estudada. O alelo A aumentaria a média de EGS do homozigoto G em 0,063 mm (Tabela 14). Esse alelo foi o mais freqüente em um estudo realizado com Nelores (TIZIOTO, 2007). Análises de alinhamento de seqüências utilizando a ferramenta BLAST do banco de dados do NCBI (Disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indicaram que o alelo A do SNP avaliado em DDEF1, que diminuiria a EGS na população Canchim estudada, é mais freqüente em animais *Bos taurus*. Esses resultados concordam com a fisiologia de animais Nelores e *Bos taurus*, uma vez que animais *Bos taurus* tendem a depositar gordura mais tardiamente em relação aos zebuínos. Como o Canchim é formado por 5/8 Charolês+3/8 Zebu, é provável que o alelo A seja oriundo do Charolês e o alelo G do Nelore.

Tabela 14. Resultados das análises de efeito de substituição alélica do marcador analisado no gene DDEF1 sobre a espessura de gordura em animais Canchim e MA e, estimativas do coeficiente de regressão para determinar a contribuição do alelo A do marcador no fenótipo

DDEF1_g.279401(A>G)			Efeito do alelo (mm)
Efeito	GL	Valor P	
Média	1	<0,01	-
GC	32	<0,01	-
Alelo A	1	0,027	0,06322
Alelo G	-	-	-
Idade	1	<0,01	-

GC= grupo de contemporâneos; GL= grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância .

O modelo considerando o genótipo como efeito fixo não foi significativamente diferente ($P < 0.05$) do modelo que incluiu um alelo como co-variável do marcador DDEF1_g.279401(A>G) de acordo com o teste de comparação dos modelos por razão de verossimilhança. Assim, o efeito desse SNP pode ser considerado estritamente aditivo.

A maioria dos SNPs analisados nesse estudo demonstraram resultados conflitantes com a literatura, fato que demonstra a necessidade de novos estudos em busca de genes ainda não relatados que influenciem características de deposição de gordura em bovinos. O surgimento de novas tecnologias, como a possibilidade de genotipagem simultânea de milhares de SNPs, distribuídos por todo o genoma, pode ser a alternativa para identificação de regiões e genes causais que contribuem para a variação de tal característica economicamente importante.

2.4.11. Resultado das análises de interações entre os alelos dos marcadores

Os SNPs analisados nos genes DDEF1 e FABP4 apresentaram efeito significativo ($P \leq 0,07$) na análise de associação quando considerados como efeito fixo. Portanto, foram calculados os efeitos de substituição alélica para os mesmos. O alelo A do SNP em DDEF1 e o alelo A do SNP em FABP4 tiveram efeito significativo sobre a média da EGS na população estudada. Por esse motivo, foi testada a presença de interação (aditiva x aditiva, aditiva x dominante, dominante x aditiva, dominante x dominante) entre esses alelos. Nenhuma das interações testadas resultaram significativas, o que pode ser interpretado como ausência de epistasia entre esses 2 *loci* (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados das análises de interações entre os alelos dos marcadores DDEF1 e FABP4

Fonte de variação	Interação aditiva		Interação aditiva x dominante		Interação dominante x dominante	
	GL	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	
Média	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
GC	32	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Alelo A DDEF1	1	0,038	0,043	0,026	0,027	
Alelo A FABP4	1	0,002	0,002	0,002	0,002	
Alelo A DDEF1 x Alelo A FABP4	1	0,692	0,634	0,603	0,566	
Idade	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

2.5. Conclusões

O gene DDEF1 apresentou SNPs nas regiões codificantes dos domínios homólogo da centaurina plecstrina, repetições anquinas, homólogo Src 3, ArfGap, em regiões intrônicas que circundam tais domínios bem como na região em que se encontra o miRNA mmu-miR-721. O gene IGFBP3 apresentou SNPs nos exons 4, 5 e 7 e no intron 5. O seqüenciamento dos genes DDEF1 e IGFBP3 em uma amostra dos ancestrais da população avaliada para EGS permitiu verificar a existência de grande variabilidade para esses genes;

Os SNPs analisados nos genes IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1 e CRH não foram significativamente associados com espessura de gordura subcutânea na população Canchim e MA estudada, reforçando a necessidade de se testar um marcador que se deseja implementar no programa de melhoramento de um rebanho;

Parte da variação genética da espessura de gordura subcutânea na população Canchim e MA avaliada pode ser explicada pelos SNPs dos genes FABP4 e DDEF1;

Os efeitos atribuídos aos SNPs dos genes DDEF1 e FABP4 foram puramente aditivos. Além disso, não foi observada epistasia entre os alelos dos SNPs em DDEF1 e FABP4. Considerando esses resultados, esses SNPs poderiam

ser úteis para incorporação em programas de melhoramento para deposição de gordura nessa raça.

2.6. Referências Bibliográficas

BARENDSE, W. et al. **The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle.** Disponível em: <www.Beef.crc.org.au/Publications/Marblingsym/Day1/Tg5DNA>. Acesso em: Março 2006, 2001.

BARENDSE, W. et al. A splice site single nucleotide polymorphism of the *fatty acid binding protein 4* gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 770 – 773, 2009.

BOLDMAN, K. G. et al. A manual for use of MTDFREML. **A set of programs to obtain estimates of variances and covariances** [DRAFT]. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Lincoln, NE, 120 p. 1995.

BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and the leptin mRNA levels. **Genetics, Selection and Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.

BUITKAMP, J. e SEMMER, J. A robust, low- to medium-throughput prnp genotyping system in sheep. **BMC Infectious Diseases**, v. 4, p. 30, 2004.

CASAS, E. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes residing under quantitative trait loci in beef cattle [abstract]. In: **Plant and Animal Genome**, XVII Conference, **Proceedings...** Poster No. P477. 2009

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E. et al. 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**, v. 83, p.13–19, 2005.

CHO, S. et al. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB reports**, v. 41, n.1, p.29-34, 2008.

DASKALCHUK, T. E. e SCHMUTZ, S. M. Genetic mapping of thyroglobulin on bovine chromosome 14. **Mammalian genome**, v. 8, p. 74-76, 1997.

ERKENS, T. et al. SNP detection in the porcine PPARGC1A promoter region and 3'UTR, and an association analysis in a Landrace-Duroc-Yorkshire population. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n.9, p. 408-416, 2009.

FALCONER, D. S. e MACKAY, T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Ltd., Essex, U.K. 1996

GAN, Q. F. et al. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. **Journal of applied genetics**, v. 49(3), p. 251–255, 2008.

GILMOUR, A. R. et al. **ASREML Reference Manual**. IACR-Rothamsted Experimental Station, Harpenden, U.K, 2000.

GUO, H. et al. Mapping, expression, and association study of the bovine PSMC1 gene. **Biochemical genetics**, v. 46; n. 5-6, p. 347-55, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOASHI, S. et al. Association between fatty acid compositions and genotypes of *FABP4* and *LXR-alpha* in Japanese Black cattle. **BMC Genetics**, v. 9, p. 2156-2159, 2008.

KING, F. J. et al. DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and cellular biology**, v. 19, p. 2330-7, 1999.

KONING, D.J. et al. Detection of quantitative trait *loci* for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). **Genetics**, v. 152, p. 1679–1690, 1999.

LENG, L. et al. A polymorphism in the 3'-flanking region of insulin-like growth factor binding protein 2 gene associated with abdominal fat in chickens. **Poultry science**, v. 88(5), p. 938-42, 2009.

MALTECCA, C. et al. Whole genome scan for quantitative trait loci associated with birth weight, gestation length and passive immune transfer in a Holstein · Jersey crossbred population. **Animal Genetics**. doi:10.1111/j.1365-2052. 2009.

MEIRELLES, S. L. **Características de carcaça de bovinos da raça canchim – estimativas de parâmetros genéticos e associação com marcadores moleculares**. 2007. 90 p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2007.

MICHAL, J.J. et al. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, p. 400-402, 2006.

MIZOGUCHI, Y. et al. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. **Animal Genetics**, v. 37, p. 51-54, 2006.

MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. C. Tests of hypotheses. In Mood AM, Graybill FA and Boes DC (Eds), **Introduction to the Theory of Statistics**. McGraw-Hill, Tokyo, p. 401-470. 1974.

MOORE, S. S. et al. 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.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: Manual do Usuário Ano 5, Número 29 - Novembro/Dezembro 2002. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, 2002.

REGITANO, L. C. A. Introdução ao uso de marcadores moleculares In: Regitano Lca And Coutinho LL (Eds.) **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

REGITANO, L. C. A. et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1. ed. on-line. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

RINCKER, C. B. et al. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 686-692, 2006.

SANTIAGO, A. C. et al. A espessura de gordura subcutânea independe do genótipo de leptina em bovinos da raça Canchim criados a pasto. In. VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. **Anais...**São Carlos, SP. 2008.

SCHENKEL, F. S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2009-2020, 2005.

SHERMAN, E. L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1-16. 2008.

SNEDECOR, G. W. e COCHRAN, W. G. Chapter 4: The comparison of two samples. **Statistical methods**. p. 116. Sixth Edition. The Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.1967.

SORIA, L.A. et al. Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth, slaughter and meat quality traits in Brangus steers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23(6), p. 304-8, 2009.

SOUREN, N. Y. et al. Anthropometry, carbohydrate and lipid metabolism in the East Flanders Prospective Twin Survey: linkage of candidate genes using two sib-pair based variance components analyses. **Twin research and human genetics**, v. 11, p. 505-16, 2008.

STACHOWIAK, M. et al. SNPs in the porcine PPARGC1a gene: Interbreed differences and their phenotypic effects. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 2, p.231-239, 2007.

TAKASUGA, A. et al. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 2, p. 125-36, 2007.

TIZIOTO, P. C. **Genes candidatos para características de produção de carne em famílias de referência da raça Nelore**. 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, 2010.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22(22), p. 4673–4680, 1994.

THREADGILL, D. W. et al. The thyrolobulin gene is syntenic with the myc and mos protooncogenes and carbonic anhydrase ii and maps to chromosome 14 in cattle. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 53, p. 32, 1990.

TOLEDO-CORRAL, C. M. et al. Insulin-like growth factor-I is inversely related to adiposity in overweight Latino children. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism**, v. 21, n. 9, p. 855-64, 2008.

VENERONI, G. B. **Associação de marcadores moleculares do bta14 com espessura de gordura em bovinos da raça canchim**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, 2007.

WANG, W. et al. Genetic variation and association of insulin-like growth factor binding protein-3 with performance in Swine. **Biochemical genetics**, v. 47(3-4), p. 315-321, 2009.

WEIKARD, R. et al. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, v. 21, p.1-13, 2005.

WIBOWO, T. A. et al. Corticotropin releasig hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat deph in beef cattle. **Genome**, v. 50, p. 939-945, 2007.

WOOD, I. A. et al. A meta-analytic assessment of a Thyroglobulin marker for marbling in beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 38, p. 479-494, 2006.

YE, S. et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 17 e 88, 2001.

CAPITULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À ESPESSURA DE GORDURA SUBCUTÂNEA EM UMA RAÇA DE GADO DE CORTE COMPOSTA

RESUMO - O Canchim é uma raça composta desenvolvida no Brasil para melhorar a produção em gado de corte. Um dos objetivos dos criadores dessa raça é aumentar a deposição de gordura. Regiões genômicas associadas à deposição de gordura em bovinos têm sido descritas, dentre elas a região centromérica do BTA14. O objetivo desse trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com espessura de gordura subcutânea em bovinos Canchim e MA e validar a associação de alguns SNPs selecionados da análise inicial. Trinta animais com fenótipos extremos foram genotipados com um chip de 54 K SNPs, revelando 100 SNPs que mais discriminavam os extremos. A validação de SNPs contidos no BTA14 foi conduzida na população completa, revelando dois haplótipos, um na região centromérica e outro na região mediana do BTA14, significativamente associados com espessura de gordura subcutânea, ambos com efeito aditivo sobre essa característica.

PALAVRAS-CHAVE: chip de SNPs. espessura de gordura subcutânea. Canchim

IDENTIFICATION OF GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH BACKFAT THICKNESS IN SYNTHETIC BEEF CATTLE

ABSTRACT- The Canchim is a composite cattle breed developed in Brazil to improve beef production. One of the breeding goals in these breed is to increase fat deposition. There are genomic regions associated to the fat deposition already described, among them the centromeric region of BTA14. The scope of this work was to identify genomic regions associated with backfat thickness in Canchim cattle and to validate the associations found in the initial analysis for selected SNPs. Thirty animals with extreme phenotypes were genotyped with the 54 K SNP chip, revealing 100 most discriminant SNPs. Validation of the BTA14 SNPs was conducted in the whole population, revealing two haplotypes, one in the centromeric region and another in the middle region of BTA14, significantly associated with fat thickness, both with additive effects on the trait.

KEY-WORDS: SNPs chip. backfat thickness. Canchim

3.1. Introdução

O valor comercial da carcaça bovina é determinado por alguns fatores, dentre eles destaca-se a quantidade de gordura de cobertura. Os grupos genéticos Canchim (5/8 Charolês+ 3/8 Zebu) e MA (descendentes de touros Charoleses e vacas 1/2 Canchim + 1/2 Zebu) são bovinos de corte compostos que possuem bom potencial para crescimento e adaptação tropical, mas não são precoces quanto à deposição de gordura. QTLs para deposição de gordura em bovinos têm sido descritos nos cromossomos 2, 4, 5, 6,14, 19, 21, 23 (TAYLOR et al., 1998; CASAS et al., 2003; MOORE et al., 2003; LI et al., 2004; MIZOGUCHI et al., 2006).

Atualmente a utilização de chips de SNPs possibilita a análise de milhares de SNPs de uma só vez. É um método rápido e confiável para análise de múltiplos SNPs que depois de validados podem ser aplicados na seleção genômica, testes de associação com características economicamente importantes, testes de paternidade e em estudos de evolução (KAMIŃSKI et. al., 2006). Já existem alguns estudos que utilizaram essa técnica para testar associação de SNPs com características economicamente importantes, como o trabalho desenvolvido por Kamiński e colaboradores (2006) que utilizaram um chip de SNPs de genes envolvidos na biossíntese de proteínas do leite e encontraram quatro SNPs associados com características de leite em vacas holandesas. Daetwyler e colaboradores (2008) utilizando um chip com 9.919 SNPs, identificaram regiões associadas a produção de leite nos cromossomos 3, 5 e 16, a produção de gordura nos cromossomos 14 e 19 e a precocidade reprodutiva nos cromossomos 2 e 13.

3.2. Objetivos

Os objetivos desse estudo foram:

_Analisar a existência de regiões cromossômicas associadas com espessura de gordura subcutânea (EGS) em populações de Canchim e MA usando um chip de 54 K SNPs em fenótipos extremos;

_Eleger regiões associadas à EGS para validar a estratégia de associação em extremos, por análise de haplótipos em toda população;

_Testar a presença de interação entre haplótipos que mostrarem-se significativos na análise de substituição haplotípica.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Animais, dados fenotípicos e seleção dos indivíduos a serem genotipados com o chip de 54 k SNPs

Dados de 1.171 animais dos grupos genéticos Canchim (CA) e MA, machos ou fêmeas, criados em regime de pastagem em sete fazendas (uma localizada no estado de Goiás e seis localizadas no estado de São Paulo), nascidos entre os anos de 2003 e 2005, foram analisados para espessura de gordura subcutânea por ultrassom aos 18 meses de idade.

A seleção dos animais a serem genotipados com o chip de alta densidade de SNPs foi baseada no resíduo de um modelo pela metodologia dos quadrados mínimos utilizando o procedimento GLM do programa SAS (SAS, 2004). O modelo considerou como efeito fixo o grupo de contemporâneos (GC) e a idade do animal na data da medida (efeito linear) como covariável. Os GC consistiram de animais nascidos no mesmo ano, rebanho, grupo genético (CA ou MA) e sexo, perfazendo um total de 32 grupos de contemporâneos.

Os animais foram organizados em ordem crescente segundo o resíduo e, foram escolhidos 15 animais com maior resíduo e 15 com menor resíduo, que não possuíam grau de parentesco até a terceira geração.

Do conjunto de dados total, famílias de meio-irmãos que continham mais de oito indivíduos (644 animais) foram utilizadas para a estimativa de parâmetros dos SNPs selecionados na análise de extremos.

3.3.2. Genotipagem com o chip de alta de densidade de SNPs e determinação dos SNPs a serem validados na população

Amostras de DNA dos 30 animais extremos foram genotipadas com o BovineSNP50 BeadChip (Illumina, Inc) no laboratório de genômica funcional de bovinos (ARS/USDA) nos Estados Unidos. Os dados foram tratados para possíveis erros de genotipagem pelo grupo de pesquisa do ARS e os genótipos com alta confiabilidade de designação de alelo foram fornecidos em um arquivo texto.

Os genótipos foram analisados com a finalidade de identificar os SNPs mais informativos no Laboratório de Bioinformática da Embrapa Informática na Agropecuária em Campinas/SP. Para esse primeiro passo de mineração, foi aplicada a função “Ganho de Informação” (MOORE et al., 2006) da Teoria da Informação (PIERCE, 1980), que define como “significativo” de acordo com a quantidade de informação contida em um determinado SNP. Em seguida, foram escolhidos os SNPs que melhor separassem os grupos (extremos de resíduos) em termos de frequência alélica por meio de um classificador Bayesiano. Entre esses, foi dada maior atenção a SNPs que constituíssem blocos de SNPs significativos. Assim, SNPs significativos isolados não foram considerados.

Do conjunto de SNPs que atendiam a esses critérios, 10 SNPs contidos no cromossomo 14 (BTA14) foram escolhidos para validação da estratégia de genotipagem seletiva na raça Cachim.

3.3.3. Genotipagem dos SNPs na população e construção de haplótipos

Dez SNPs posicionados no BTA14 foram genotipados pelo método TaqMan. As reações constaram de 15 ng de DNA genômico, 0,25 µl de Assay Mix[®] 1X (*Applied Biosystems*) que contém o par de primers e sondas, 5,0 µl de Taqman[®] Master Mix Universal PCR 2X (*Applied Biosystems*). A reação se deu com uma primeira e única etapa de 10 minutos a 95° C, seguidas por 45 ciclos de 15 segundos a 92°C e 1 minuto a 60°C. As reações foram realizadas e analisadas em

um equipamento Tempo Real 7500 da Applied Biosystems. Os primers e sondas utilizados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Primers e sondas utilizados nas reações de genotipagem dos 10 SNPs do BTA14

Marcador do BTA14	Primer Forward	Primer Reverse	Sonda marcada com fluoroforo VIC	Sonda marcada com fluoroforo FAM
ARS-BFGL-NGS-31471	5'GGCAAATGTCCCAGA AGGTCTAAG3'	5'CCTTCCCAGTTTGCTC AGATTACT3'	5'TGTGGCCA TGGCTCT3' (alelo T)	5'TGGCCGTG GCTCT3' (alelo C)
Hapmap2451 8-BTC- 062393	5'GGGATGTTAGTAACTT GCGTCAGTA3'	5'TGGAAGTCTCTTTGT ATCACGAAA3'	5'TGGACAGG GTTTCGAG3' (alelo C)	5'TGGACAGGA TTTCGAG3' (alelo T)
ARS-BFGL-NGS-76248	5'AGTCTCATTTATAAAA CATCTGCAGGAATGT3'	5'AGCACTCAATAAATG GTGGCCAT3'	5'ACCATGTGA ATTAGACAGA CA3' (alelo G)	5'CCATGTGAA TTAAACAGAC A3' (alelo A)
ARS-BFGL-NGS-93878	5'GGCCTGCTTTCAGCC ATTG3'	5'GCCAGGGCAGTTGTT CTCT3'	5'TGCAGGGC TGTTACT3' (alelo C)	5'TGCAGGGCT ATTACT3' (alelo T)
Hapmap5096 0-BTA-43399	5'CCAAGGTCTTAAAAAA CAGAAAACAACCA3'	5'AGGCATTTCTAGATCA TCTTAAAAATAGTGAAG TT3'	5'TTTATGTGG AGAACCATTA G3' (alelo G)	5'TTTATGTGG AAAACCATTA G3' (alelo A)
UA-IFASA- 7599	5'TCTCCCATTTTCAACT ATTTCTCAAGACAA3'	5'GCAATGTTCGAAATG GATACTTGGT3'	5'ACGACAGG CGTCCTT3' (alelo C)	5'ACGACAAGC GTCCTT3' (alelo T)
UA-IFASA- 8067	5'GCCAAAGCAAGAATG TGTAAGTGAA3'	5'ACTTCGGCTTCTTTCC AAGGT3'	5'TTTGCTTTC TTTGAGCCC3' (alelo A)	5'TGCTTTCCT TGAGCCC3' (alelo G)
Hapmap3299 3-BTA-129125	5'CTCAATCCCGCTCTCA ATTATACCA3'	5'CGCTAGAATCTTTCAC CAGTGGTT3'	5'AAATTGCTA ATTTTCC3' (alelo A)	5'ATTGCTGAT TTTCC3' (alelo G)
Hapmap5180 8-BTA-117493	5'GCTATTTAGATCTACT TCAAGTTCTGAATTTA CAAC 3'	5'GTGTCACATTGATTAT TAGTTCAAAGTAAGTTC AT3'	5'TCACTTTAA ATCTTCTATT TT3'T (alelo C)	5'CACTTTAAA TCTTTTATTTT T 3' (alelo T)
Hapmap4051 9-BTA-34798	5'TTCTCAGGCAGCTGC AACAA3'	5'ACCCCAAGGGATGAC TTCCT3'	5'CTGCTCAG GATTGGTG3' (alelo A)	5'TGCTCAGGG TTGGTG3' (alelo G)

Os 10 SNPs genotipados estavam posicionados a 1,3; 6,4; 7,2; 29,4; 29,5; 33,5; 36,9; 37,1; 37,9 e 41,1 Mb no BTA14.

Para a construção de haplótipos, os marcadores foram divididos em dois blocos, devido a distância entre o terceiro e o quarto marcador (7,2 e 29,4 Mb, respectivamente). Um bloco contendo os três marcadores mais centroméricos e o outro contendo os sete marcadores da região mediana do cromossomo 14. Os haplótipos foram construídos com o programa PHASE v2.1.1 (Disponível em <<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>>).

3.3.4. Análise de associação das combinações haplotípicas com espessura de gordura subcutânea

As associações entre as combinações haplotípicas e as medidas de espessura de gordura subcutânea foram analisadas pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML) utilizando um modelo animal no programa ASREML, desenvolvido por Gilmour e colaboradores (2000). Grupos de contemporâneos com menos de dois indivíduos foram excluídos das análises. Os GC consistiram de animais nascidos no mesmo ano, rebanho, grupo genético (CA ou MA) e sexo, resultando em 30 GC. Essas análises consideraram como efeitos fixos o GC e as combinações haplotípicas e a idade do animal na data da medida (efeito linear) como covariável, além dos efeitos aleatórios genéticos aditivo direto e residual. As análises foram realizadas separadamente para cada bloco de combinações haplotípicas.

O modelo estatístico usado foi:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}$$

Em que,

\mathbf{y} é o vetor de observações;

\mathbf{X} é a matriz de incidência dos efeitos do GC;

$\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de efeitos fixos (GC, idade e combinações haplotípicas);

\mathbf{Z} é a matriz de incidência que relaciona os registros aos efeitos aleatórios genéticos;

\mathbf{a} é o vetor de efeitos aleatórios desconhecidos que representam os valores genéticos aditivos de cada animal;

e é o vetor de erros aleatórios residuais associados às observações.

Quando um efeito significativo ($P \leq 0,05$) de combinação haplotípica foi observado, o efeito de substituição de haplótipo, como desvio do haplótipo de maior frequência, foi estimado pela substituição do efeito de combinação haplotípica por co-variáveis representando o número de cópias de cada haplótipo. Uma comparação entre o modelo contendo as combinações haplotípicas e o modelo usado nas análises de efeito de substituição haplotípica foi realizada pelo teste de razão de verossimilhança (Mood et al., 1974), para testar a presença de desvios de dominância do modelo aditivo. Animais contendo combinações haplotípicas e haplótipos com frequência menor que 0,8% foram excluídos das análises.

3.3.5. Análise de ancestralidade dos haplótipos do BTA14

O Canchim é uma raça composta constituída de 5/8 Charolês e 3/8 Zebu. Inicialmente os zebuínos que mais contribuíram para a formação do Canchim foram animais da raça Indubrasil, no entanto, também foram utilizados animais das raças Guzerá e Nelore. Atualmente o zebuíno mais comumente utilizado na composição da raça Canchim é o Nelore. O consórcio HapMap bovino (Disponível em: <http://bfgl.anri.barc.usda.gov/cgi-bin/hapmap/affy2/m_session.pl>) genotipou várias raças para milhares de SNPs em diversas plataformas, inclusive da Illumina (Inc) utilizada nesse trabalho. Para a análise de ancestralidade foram utilizados genótipos de 26 animais Charoleses e de 24 animais Nelore para os 9 SNPs avaliados nesse estudo, fornecidos pelo Dr. Lakshmi Kumar Matukumalli da Universidade de Mason George nos Estados Unidos.

Haplótipos desses animais Charoleses e Nelores foram construídos com o programa PHASE v2.1.1 (Disponível em: <<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>>). Os marcadores foram divididos nos mesmos dois blocos descritos anteriormente (item 3.3.3).

3.3.6. Estimativa da porcentagem da variância fenotípica e aditiva total explicada por cada haplótipo significativo

A porcentagem da variância fenotípica total explicada por cada haplótipo que apresentou efeito significativo ($P \leq 0,05$) nas análises de associação foi calculada com uma adaptação da descrição em Shenckel et al. (2005).

Inicialmente, foi realizada uma análise de regressão, usando a metodologia de REML com o programa ASREML (GILMOUR et al., 2000), obtendo-se as estimativas para cada haplótipo (colocado no modelo como efeito aleatório), com efeito significativo ($P \leq 0,05$), na análise de efeito de substituição haplotípica. Isso foi realizado separadamente para cada região haplotípica analisada, com o objetivo de calcular o valor genotípico de homozigotos como desvio da média (estimativa obtida do efeito linear do haplótipo) e o valor genotípico de heterozigotos como desvio da média (estimativa obtida do efeito quadrático de cada haplótipo) de cada região haplotípica.

Para os cálculos das porcentagens das variâncias aditiva e fenotípica totais explicadas por cada haplótipo foram usadas fórmulas padrões descritas em Falconer e Mackay (1996). O efeito de substituição haplotípica foi calculado pela equação $\alpha = a + d(q - p)$, em seguida a variância aditiva ($v(a)$) de cada haplótipo foi obtida pela fórmula $2pq\alpha^2$ e a variância de dominância pela fórmula $(2pqd)^2$. Sendo que, nessas fórmulas, “ a ” corresponde ao valor genotípico de homozigotos obtido na análise de regressão, “ d ” corresponde ao valor genotípico de heterozigotos do haplótipo obtido na análise de regressão e, “ p ” e “ q ” as frequências alélicas na população em estudo. A variância devido ao haplótipo ($v(m)$) é a soma das variâncias aditiva e de dominância.

Para determinar quanto o haplótipo representa das variâncias fenotípica e aditiva totais, primeiramente foi calculada a herdabilidade (h^2) para a característica em questão (EGS) com o programa ASREML (GILMOUR et al., 2000). A saída dessa estimativa nos dá as variâncias fenotípica ($v(f)$) e aditiva ($v(a)$) da característica. Para obtenção da porcentagem da variância fenotípica total representada por cada haplótipo dividiu-se a variância total do haplótipo ($v(m)$) pela variância fenotípica da característica. E, para o cálculo da porcentagem da variância

aditiva total explicada por cada haplótipo dividiu-se a variância aditiva do haplótipo ($v(am)$) pela variância aditiva da característica ($v(a)$).

3.3.7. Análise de interação entre os haplótipos

O haplótipo da região centromérica que apresentou efeito significativo nas análises de substituição haplotípica foi testado para presença de interação com os haplótipos da posição mediana do cromossomo 14 por meio de uma análise de regressão pelo método REML. Para isso, foram consideradas como efeito aditivo as co-variáveis representando o número de cópias de cada haplótipo e para obter o efeito de desvios de dominância foram calculados os efeitos quadráticos de cada uma das co-variáveis citadas acima.

Como descrito no item 2.3.18 foram calculadas as interações: aditiva X aditiva, aditiva X dominante, dominante X aditiva, dominante X dominante entre cada bloco de haplótipo.

3.4. Resultados e Discussão

Mil SNPs foram selecionados após a primeira mineração em busca dos SNPs mais informativos pela metodologia de “Ganho de informação”. Restringindo o estudo aos SNPs que melhor distinguissem os dois extremos fenotípicos em termos de frequência alélica, foram obtidos 100 SNPs distribuídos pelos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 and X. Esses resultados concordam, parcialmente, com a literatura que indica a presença de QTLs para deposição de gordura nos cromossomos 2, 4, 5, 6, 7, 14, 19, 21 e 23 (TAYLOR et al., 1998; CASAS et al., 2003; MOORE et al., 2003; LI et al., 2004; TAKASUGA et al., 2007; MIZOGUCHI et al., 2006).

Entre esses 100 SNPs, 34 SNPs constituíram sete regiões cromossômicas, contendo três ou mais SNPs, situados à intervalos menores que 9 Mb, sendo duas regiões no BTA1, uma região no BTA3, uma região no BTA4, uma região no BTA6, uma região no BTA7, duas regiões no BTA14 e uma região no

BTA18. Consideramos blocos apenas regiões contendo SNPs localizados a menos de 10 Mb, uma vez que há relatos na literatura que o desequilíbrio de ligação diminui em distâncias acima desse intervalo (SPELMAN e COPPIETERS, 2006). A maioria dessas regiões apresenta relatos de QTL e/ou de genes candidatos relacionados à deposição de gordura em populações de bovinos (Tabela 2).

Tabela 2. SNPs que constituem regiões cromossômicas, contendo três ou mais SNPs, situados à intervalos menores que 9 Mb

Cromossomo	SNP	Posição no cromossomo em Mb	Relato de gene candidato ou QTL relacionado a EGS próximo a região
1	NGS-235	109,13	Alexander et al. (2007)
1	BTB-00049354	109,38	
1	BTA-96415	112,52	
1	NGS-105884	150,41	
1	rs29027916	151,92	
1	NGS-24636	156,58	
3	IFASA-9337	28,51	Yamada et al. (2009)
3	BTA-122551	37,62	
3	BTA-92389	37,69	
3	INRA-110	39,86	
4	BTA-70875	63,31	Corva et al. (2009)
4	NGS-42007	74,57	
4	BTB-02044451	76,19	
6	BTA-76317	50,33	Soria et al. (2009)
6	BTC-066011	53,32	
6	BTB-00843793	55,26	
7	NGS-24225	44,73	Takasuga et al. (2007)
7	BTA-78982	46,71	
7	BTA-98707	51,65	
7	NGS-107103	55,3	
7	BTB-01130079	56,27	
14	NGS-31471	1,30	Wibowo et al. (2007) Barendse et al. (2009)
14	BTC-062393	6,45	Cho et al. (2008) Gan et al. (2008)
14	NGS-76248	7,28	
14	NGS-93878	29,45	
14	BTA-43399	29,57	
14	UA-IFASA-7599	33,56	
14	UA-IFASA-8067	36,93	
14	BTA-129125	37,11	
14	BTA-117493	37,90	
14	BTA-34798	41,13	
18	NGS-80672	26,54	
18	NGS-29803	27,34	
18	NGS-12773	33,77	

O BTA14 foi o cromossomo que apresentou maior número de SNPs e blocos de SNPs que melhor diferenciavam os extremos fenotípicos (Tabela 2). Dez SNPs localizados a 1,3; 6,4; 7,2; 29,4; 29,5; 33,5; 36,9; 37,1; 37,9 e 41,1 Mb no

BTA14 foram escolhidos para serem testados na população de gado de corte em estudo para associação com espessura de gordura subcutânea (Tabela 3). No entanto, o SNP localizado a 41.1 Mb (Hapmap40519-BTA-34798) não foi utilizado nas análises por dificuldades na otimização das reações de TaqMan.

Tabela 3. Marcadores presentes no cromossomo 14 de bovinos, escolhidos validação da estratégia de genotipagem seletiva na raça Cachim

Nome do marcador	SNP	Posição no BTA14 em Mb
ARS-BFGL-NGS-31471	T/C	1,30
Hapmap24518-BTC-062393	C/T	6,45
ARS-BFGL-NGS-76248	G/A	7,28
ARS-BFGL-NGS-93878	C/T	29,45
Hapmap50960-BTA-43399	G/A	29,57
UA-IFASA-7599	C/T	33,56
UA-IFASA-8067	A/G	36,93
Hapmap32993-BTA-129125	A/G	37,11
Hapmap51808-BTA-117493	C/T	37,90
Hapmap40519-BTA-34798	A/G	41,13

Após a genotipagem dos SNPs presentes no BTA14, os marcadores foram divididos em dois blocos para construção de haplótipos. O primeiro bloco, referido nesse estudo como combinação haplotípica 1 (quando se tratar de genótipos) ou haplótipo 1 (quando se tratar de alelos), foi constituído pelos marcadores localizados na região centromérica do BTA14 (1,3; 6,4 e 7,2 Mb) e o segundo bloco, designado nesse estudo por combinação haplotípica 2 (quando se tratar de genótipos) ou haplótipo 2 (quando se tratar de alelos), constituiu-se dos marcadores localizados a 29,4; 29,5; 33,5; 36,9; 37,1 e 37,9 no BTA14. Após a eliminação das combinações haplotípicas e haplótipos com frequência abaixo de 0,8%, a combinação haplotípica 1 apresentou 26 variações e 8 haplótipos e, a combinação haplotípica 2 apresentou 23 combinações diferentes dos SNPs e 13 haplótipos, restando 624 animais para análises com a combinação haplotípica 1 e 552 animais para a combinação haplotípica 2. As frequências haplotípicas utilizadas estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Freqüência dos haplótipos 1 e 2 consideradas nas análises

Haplótipo 1	Frequência (%)	Haplótipo 2	Frequência (%)
CCA	9,54	CGTAAC	7,43
CCG	26,68	CGTAAT	2,29
CTA	10,74	CGTAGC	1,19
CTG	10,10	CGTGAC	3,03
TCA	17,71	CGTGGC	6,24
TCG	12,50	CGCAGC	1,83
TTA	10,58	CGCGAC	1,56
TTG	2,16	CGCGGC	50,92
.	.	TATGGC	5,69
.	.	TACAAC	0,83
.	.	TACAGC	2,20
.	.	TACGAC	1,65
.	.	TACGGC	15,14

As análises REML demonstraram efeito significativo para associações entre as combinações haplotípicas 1 e 2 com EGS (Tabela 5). QTL para EGS tem sido descritos na região centromérica do BTA14 (MOORE et al., 2003).

Genes candidatos que influenciam a variação da deposição de gordura em bovinos foram mapeados próximos das regiões de combinações haplotípicas 1 ou 2. Por exemplo, o gene da *tireoglobulina* mapeado a 7,8 Mb no BTA14 foi relacionado a EGS e/ou marmoreio (RINCKER et al., 2006). Casas e colaboradores (2009) associaram um SNP do gene do *fator de diferenciação celular 1* (DDEF1), localizado a 9,8 Mb desse mesmo cromossomo, com marmoreio em gado de corte. O gene do *hormônio liberador de corticotrofina* está localizado a 30,4 Mb nesse cromossomo e SNPs desse gene foram associados com EGS em uma população F2 de Wagyu x Limousin (WIBOWO et al., 2007). O gene da *proteína ligante de ácido graxo 4* (FABP4) (41,9 Mb no BTA14) foi significativamente associado com escore de marmoreio e deposição de gordura subcutânea em uma população F2 de referência Waygu x Limousin (MICHAL et al., 2006).

Desses genes candidatos, apenas os genes DDEF1 e FABP4 se mostraram associados à variação da característica EGS na população analisada no presente trabalho (Capítulo 2). O SNP estudado no gene DDEF1 apresentou um indicativo de associação ($P=0,07$) e se encontra a 2 Mb do último marcador do

haplótipo 1, o qual apresentou associação significativa ($P=0,05$) com a variação da EGS na população avaliada. Uma hipótese a ser testada é que a verdadeira mutação causal esteja dentro do gene DDEF1 ou muito próxima dele.

O SNP analisado no gene FABP4 (Capítulo 2) apresentou alto nível de significância em relação à variação da EGS ($P=0,01$) e esse SNP se encontra a 0,8 Mb do último SNP do haplótipo 2, que também foi altamente significativo em relação a variação da EGS. Esses resultados não permitem excluir a possibilidade de o gene FABP4 constituir a mutação causal para a variação da característica associada ao haplótipo 2.

Tabela 5. Análise de máxima verossimilhança restrita para associação com espessura de gordura subcutânea, de acordo com o modelo de cada combinação haplotípica

Efeito	Combinações haplotípicas			
	1		2	
	GL	Valor P	GL	Valor P
Média	1	<0,01	1	<0,01
GC	29	<0,01	29	<0,01
Combinação haplotípica 1	25	0,05	-	<0,01
Combinação haplotípica 2	-	-	22	0,004
Idade	1	<0,01	1	<0,01

GC= Grupo de contemporâneos; GL= Grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância.

A substituição do haplótipo mais freqüente (CCG) pelo haplótipo CTA do bloco haplotípico da região centromérica do BTA14 indicou efeito significativo ($P<0,05$), sugerindo que esta substituição contribui para a variação na média da EGS da população. O haplótipo CTA diminuiria a média de EGS do homocigoto CCG em 0,11 mm na população estudada (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados das análises de efeito de substituição haplotípica do bloco da região centromérica do BTA14 sobre a espessura de gordura em animais Canchim e MA e, estimativas do coeficiente de regressão para determinar a contribuição dos haplótipos no fenótipo

Haplótipo 1			Efeito do haplótipo (mm)
Efeito	GL	Valor P	
Média	1	<0,01	-
GC	29	<0,01	-
CCA	1	0,700	-
CTA	1	0,046	-0,11
CTG	1	0,865	-
TCA	1	0,749	-
TCG	1	0,351	-
TTA	1	0,185	-
TTG	1	0,101	-
Idade	1	<,001	-

GC= grupo de contemporâneos; GL= grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância

A construção de haplótipos de animais Nelore e Charoleses com dados provenientes do HapMap bovino nos revelou que o haplótipo CTA, significativo a 5% no teste de associação com EGS, está representado em ambas as raças, não nos permitindo verificar a origem racial do alelo (Tabela 7), fato esse que pode nos indicar ausência de seleção positiva recente nesse loci.

Tabela 7. Freqüência dos haplótipos da região centromérica do BTA14 de animais Charoleses e Nelores

Haplótipos	E (freq)	S.E.	E (freq)	S.E.
	Charolês		Nelore	
TCA	0,1912	0,0283	0,0194	0,0170
TCG	0,2462	0,0293	0,0426	0,0205
TTA	0,2604	0,0288	0,0261	0,0107
TTG	0,1289	0,0257	0,5896	0,0271
CCA	0,0276	0,0193	0,0105	0,0148
CCG #	0,0732	0,0221	0,0137	0,0162
CTA *	0,0397	0,0230	0,0063	0,0125
CTG	0,0323	0,0205	0,2915	0,0265

E (freq): estimativa de freqüência; S.E.: desvio padrão;* haplótipos significativos a 5% na análise de associação com espessura de gordura subcutânea em uma população Canchim; #: haplótipo de maior freqüência retirado da análise de substituição haplotípica

A substituição do haplótipo CGCGGC (haplótipo de maior freqüência) pelos haplótipos CGTAAC, CGTAAT e TACGGC, do bloco de haplotípico da região mediana do BTA14, revelou efeitos significativos a 5%, 1% e 10%, respectivamente

(Tabela 8). Os haplótipos CGTAAC e CGTAAT aumentariam a média de EGS do homozigoto CGCGGC em 0,16 e 0,5 mm, respectivamente. O haplótipo TACGGC diminuiria a média de EGS em 0,1 mm na população em questão (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados das análises de efeito de substituição haplotípica do bloco da região mediana do BTA14 sobre a espessura de gordura em animais Canchim e MA e, estimativas do coeficiente de regressão para determinar a contribuição dos haplótipos no fenótipo

Haplótipo 2			Efeito do haplótipo (mm)
Efeito	GL	Valor P	
Média	1	<0,01	-
GC	29	<0,01	-
CGTAAC	1	0,025	0,1625
CGTAAT	1	<,001	0,5028
CGTAGC	1	0,607	-
CGTGAC	1	0,588	-
CGTGGC	1	0,461	-
CGCAGC	1	0,669	-
CGCGAC	1	0,764	-
TATGGC	1	0,206	-
TACAAC	1	0,817	-
TACAGC	1	0,718	-
TACGAC	1	0,940	-
TACGGC	1	0,063	-0,1023
Idade	1	<,001	-

GC= grupo de contemporâneos; GL= grau de liberdade; P= probabilidade associada com o teste de razão de variância

A comparação dos haplótipos obtidos dos animais Charoleses e Nelores demonstrou que os haplótipos CGTAAC e CGTAAT, que aumentariam a EGS na população Canchim em relação ao haplótipo de maior frequência (CGCGGC), estão representados apenas nos animais Nelore e que o haplótipo TACGGC, que diminuiria a EGS em relação ao alelo de maior frequência (CGCGGC), aparece apenas entre animais Charoleses (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência dos haplótipos da região mediana do BTA14 de animais Charolêses e Nelores

Halótipos	E (freq) Charolês	S.E.	E (freq) Nelore	S.E.
CGTGGC	0.0776	0.0136	0.0125	0.015484
CGTAGC	0.0022	0.0061	0.0055	0.0101
CGCGGC #	0.4581	0.0313	.	.
CGCAGC	0.1350	0.0311	.	.
TATGGC	0.0342	0.0134	.	.
TATAGC	0.0011	0.0046	.	.
TACGGC **	0.1798	0.0316	.	.
TACAGC	0.111549	0.0313	.	.
CGTGAT	.	.	0.1485	0.0297
CGTGAC	.	.	0.0372	0.0167
CGTGGT	.	.	0.2140	0.0297
CGTAAT *	.	.	0.1757	0.0311
CGTAAC *	.	.	0.0498	0.0210
CGTAGT	.	.	0.1186	0.0298
CGCGAT	.	.	0.0217	0.0182
CGCGAC	.	.	0.0047	0.0087
CGCGGT	.	.	0.0674	0.0164
CGCAAT	.	.	0.0570	0.0201
CGCAAC	.	.	0.0185	0.0146
CGCAGT	.	.	0.0400	0.0156
CACGAT	.	.	0.0023	0.0066
CACAAT	.	.	0.0047	0.0087
TGCGAT	.	.	0.0047	0.0087
TGCAAT	.	.	0.0023	0.0066
TACGAT	.	.	0.0073	0.0099
TACAAT	.	.	0.0064	0.0096

E (freq): estimativa de frequência; S.E.: desvio padrão; * alelos que aumentariam a espessura de gordura subcutânea em uma população Canchim e MA em relação ao alelo mais freqüente CGCGGC; **Alelo que diminuiria a espessura de gordura subcutânea em uma população Canchim e MA em relação ao alelo mais freqüente CGCGGC; #: haplótipo de maior freqüência retirado da análise de substituição haplotípica.

Esses resultados condizem com a fisiologia de cada raça, em que animais Nelore tendem a depositar mais precocemente gordura (RESTLE et al.,

2002), enquanto que a raça Charolesa tende a ganhar maior musculosidade em detrimento da deposição de gordura (VAZ et al., 2002).

Observa-se na Tabela 9 que Nelore e Charoleses não compartilham a maioria dos blocos haplotípicos. Nessa mesma tabela pode-se observar maior número de haplótipos para Nelores do que para Charoleses, o que pode indicar menor taxa de desequilíbrio de ligação na raça Nelore ou, mais provavelmente, a presença de alelos fixados em marcadores constituintes do haplótipo 2 nos Charoleses genotipados (marcadores Hapmap32993-BTA-129125 e Hapmap51808-BTA-117493) (Tabela 10), isto é, os Nelores apresentariam maior base de diversidade genética dos SNPs constituintes do haplótipo 2 do que os Charoleses. Na Tabela 10 pode-se observar a frequência alélica mínima (MAF) para cada marcador individual.

O consórcio que colaborou na construção do HapMap bovino (Bovine HapMap Consortium et al., 2009) verificou menor taxa de desequilíbrio de ligação em distâncias curtas para animais zebuínos do que para animais *Bos taurus* o que resulta em maior variabilidade para zebuínos. De acordo com aqueles autores, isso pode ser indício de que os zebuínos possuíram uma população ancestral maior do que animais *Bos taurus*.

Tabela 10. Frequência dos alelos mínimos para cada SNP utilizado na construção dos blocos haplotípicos

Nome do marcador	MAF Charolês	MAF Nelore
ARS-BFGL-NGS-31471	0.17	0.33
Hapmap24518-BTC-062393	0.46	0.09
ARS-BFGL-NGS-76248	0.48	0.06
ARS-BFGL-NGS-93878	0.33	0.02
Hapmap50960-BTA-43399	0.33	0.02
UA-IFASA-7599	0.12	0.25
UA-IFASA-8067	0.25	0.48
Hapmap32993-BTA-129125	0.00	0.45
Hapmap51808-BTA-117493	0.00	0.12

MAF= Frequência alélica mínima

Na Figura 1, podemos observar que os dois primeiros SNPs que constituem o haplótipo 2, representados em vermelho, são conservados entre as duas combinações haplotípicas que aumentam a EGS e a combinação mais

freqüente, sendo que provavelmente esses haplótipos aumentariam a EGS, são oriundos de Nelore (Tabela 9). Essa conservação não é observada para o haplótipo que reduz a média de EGS e que tem origem em Charolês (Tabela 9).

No bloco representado em amarelo, observa-se que o haplótipo mais frequente (valor zero) tem o mesmo padrão do haplótipo que diminui a EGS e diferente do padrão dos haplótipos que aumentam a EGS (Figura 1).

Combinando qualquer marcador do bloco vermelho com um marcador do bloco amarelo, conseguimos separar três classes: a classe zero, a que aumenta e a que diminui. Por exemplo: combinando o primeiro e o terceiro SNP em cada haplótipo temos:

C-C= zero

C-T= aumenta

CT= aumenta

TC= diminui

Se considerarmos as bases representadas em azul nos haplótipos que aumentariam a EGS, a mudança da última base T para C faz com que o efeito de substituição se altere de 0,50 mm para 0,16 mm (Figura 1). A última base C está fixada em Charolês e é esse nucleotídeo que, se presente no alelo que aumentaria a EGS, diminui o efeito aditivo em 0,34 mm.

O haplótipo mais freqüente em Canchim (CGCGGC) também é o haplótipo mais freqüente e exclusivo nos animais Charoleses genotipados pelo Consórcio HapMap (Tabela 9). Esse resultado já era esperado uma vez que a raça Canchim tem maior proporção de Charolês do que de zebu.

É provável que a capacidade de detecção da origem racial dos alelos do haplótipo 2 foi possível pelo maior número de SNPs (6 SNPs) e, no caso do haplótipo 1, constituído apenas por três marcadores, a recombinação e o tempo em que essa região foi selecionada não nos permitiu identificar a origem racial do alelo.

Devemos levar em consideração que o tamanho amostral reduzido dos animais Charoleses e Nelores utilizados nas análises de ancestralidade pode ter viesado os resultados aqui apresentados.

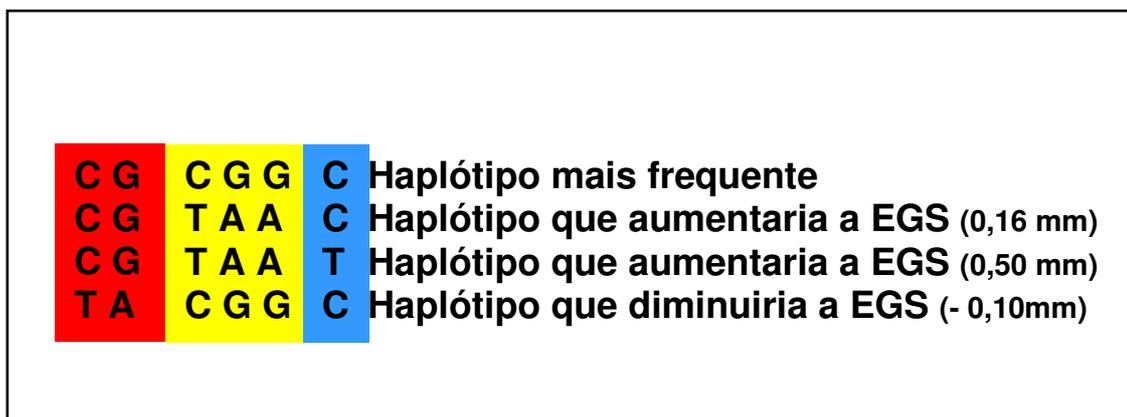


Figura 1. Blocos dentro do haplótipo 2 que supostamente estariam conservados entre haplótipos que aumentariam ou diminuiriam a espessura de gordura subcutânea na população Canchim e MA em estudo

O modelo considerando as combinações haplotípicas como efeito fixo não foi significativamente diferente ($P > 0,05$) do modelo que incluiu como co-variáveis os haplótipos das combinações haplotípicas 1 e 2, de acordo com o teste de razão de máxima verossimilhança do modelo. Assim, o efeito desses haplótipos sobre a espessura de gordura subcutânea pode ser considerado estritamente aditivo.

A análise de substituição haplotípica apresentou efeito significativo para o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e, para os haplótipos CGTAAC, CGTAAT e TACGGC da combinação haplotípica 2. O cálculo da porcentagem da variância fenotípica explicada por esses haplótipos demonstrou que o alelo CTA da combinação haplotípica 1 explicaria 0,61% da variância fenotípica total da EGS nessa população e 3,45% da variância aditiva total. Os haplótipos CGTAAC, CGTAAT e TACGGC da combinação haplotípica 2 representariam 1,25, 3,81 e 0,031 %, respectivamente, da variância fenotípica total e 7,09, 21,57 e 0,00016%, respectivamente, da variância aditiva total da característica. Esses valores podem estar superestimados ou subestimados em função do tamanho amostral insuficiente para o cálculo acurado da herdabilidade da EGS. É provável que um aumento no número de animais avaliados pudesse apontar resultados mais consistentes e representativos da raça Canchim.

Como a análise de substituição haplotípica demonstrou efeito significativo para o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e, para os haplótipos CGTAAC, CGTAAT e TACGGC da combinação haplotípica 2, foram testadas as interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e os haplótipos CGTAAC, CGTAAT e TACGGC da combinação haplotípica 2. As análises de

interações entre os haplótipos dos dois blocos haplotípicos não foram significativas para nenhuma das interações testadas (Tabelas 11, 12 e 13), demonstrando a ausência de epistasia entre esses *loci*.

Tabela 11. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo CGTAAC da combinação haplotípica 2.

Fonte de variação	Interação aditiva x aditiva		Interação aditiva x dominante		Interação dominante x dominante	
	GL	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	
Média	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
GC	29	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Haplótipo CTA	1	0,044	0,044	0,051	0,051	
Haplótipo CGTAAC	1	0,023	0,023	0,019	0,019	
Haplótipo CTA x Haplótipo CGTAAC	1	0,946	0,946	0,763	0,763	
Idade	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tabela 12. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo CGTAAT da combinação haplotípica 2.

Fonte de variação	Interação aditiva x aditiva		Interação aditiva x dominante		Interação dominante x dominante	
	GL	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	
Média	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
GC	29	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Haplótipo CTA	1	0,078	0,078	0,107	0,107	
Haplótipo CGTAAT	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Haplótipo CTA x Haplótipo CGTAAT	1	0,632	0,632	0,697	0,697	
Idade	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tabela 13. Resultados das análises interações entre o haplótipo CTA da combinação haplotípica 1 e o haplótipo TACGGC da combinação haplotípica 2.

Fonte de variação	Interação aditiva x aditiva		Interação aditiva x dominante		Interação dominante x dominante	
	GL	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	
Média	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
GC	29	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
Haplótipo CTA	1	0,050	0,046	0,066	0,066	
Haplótipo TACGGC	1	0,098	0,062	0,096	0,058	
Haplótipo CTA x Haplótipo TACGGC	1	0,452	0,492	0,554	0,512	
Idade	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

3.5. Conclusões

A estratégia de genotipagem seletiva de uma pequena amostra de indivíduos extremos para EGS com SNPs em alta densidade mostrou-se eficiente para identificar regiões associadas à essa característica;

Foi revelada associação de duas regiões do cromossomo 14 com EGS em uma raça de gado sintética derivada de Charolês e zebu. Os efeitos haplotípicos de ambas regiões foram demonstraram ser estritamente aditivos e não foi encontrado indicio de epistasia entre os dois blocos haplotípicos analisados, o que favorece seu uso na seleção assistida por marcadores para essa característica. Genes localizados próximos a essas duas regiões estudadas podem ser apontados para futuros estudos como potenciais candidatos a influenciar a variação para EGS nessa população.

3.6. Referências Bibliográficas

ALEXANDER, L. J. et al. Quantitative trait loci with additive effects on palatability and fatty acid composition of meat in a Wagyu-Limousin F₂ population. **Animal Genetics**, v. 38(5), p. 506 – 513, 2007.

BARENDSE, W. et al. A splice site single nucleotide polymorphism of the *fatty acid binding protein 4* gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 770 – 773, 2009.

Bovine HapMap Consortium et al. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, v. 324, p. 528, 2009.

CASAS, E.; KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D et al. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 2-6, 2003.

CASAS, E. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes residing under quantitative trait loci in beef cattle [abstract]. In: **Plant and Animal Genome**, XVII Conference, **Proceedings...** Poster No. P477. 2009

CHO, S. et al. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB reports** v.41, n.1, p.29-34, 2008.

CORVA, P. M. et al. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. **Genetics and molecular research**, v. 8(1), p. 105-16, 2009.

DAETWYLER, H. D. et al. Genome Scan to Detect Quantitative Trait Loci for Economically Important Traits in Holstein Cattle Using Two Methods and a Dense Single Nucleotide Polymorphism Map. **Journal of dairy science**, v. 9, p. 3225-3236. doi:10.3168/jds.2007-0333 A. 2008.

GAN, Q. F. et al. Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. **Journal of applied genetics**, v. 49(3), p. 251–255, 2008.

FALCONER, D. S. e T. F. C. MACKAY. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman Group Ltd., Essex, U.K. 1996.

GILMOUR, A. R. *et al.* **ASREML Reference Manual**. IACR-Rothamsted Experimental Station, Harpenden, U.K, 2000.

KAMIŃSKI, S. et al. Associations between milk performance traits in Holstein cows and 16 candidate SNPs identified by arrayed primer extension (APEX) microarray. **Animal biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2006.

LI, C. et al. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 967-972, 2004.

MICHAL, J.J. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, p. 400-402, 2006.

MIZOGUCHI, Y. et al. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. **Animal Genetics**, v. 37, p. 51-54, 2006.

MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. C. Tests of hypotheses. In Mood AM, Graybill FA and Boes DC (Eds), **Introduction to the Theory of Statistics**. McGraw-Hill, Tokyo, p. 401-470, 1974.

MOORE, S. S. et al. 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.

MOORE, J. H. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. **Journal of theoretical biology**, v. 241, p. 252-261, 2006.

PIERCE, J.R. *An Introduction to Information Theory: symbols, signal and Noise*, Dover, New York. 1980

RESTLE, J. et al. Efeito do grupo genético e da heterose nas características quantitativas da carcaça de vacas de descarte terminadas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 350-362, 2002.

RINCKER, C. B. et al. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 686-692, 2006.

SAS Institute Inc., *SAS® 9.1.2. Statistical Analysis System, Systems for Windows*. SAS Institute Inc., Cary, NC 2004.

SCHENKEL, F. S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2009–2020, 2005.

SORIA, L. A. et al. Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth, slaughter and meat quality traits in Brangus steers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23(6), p.304-308, 2009.

SPELMAN, R.J. e COPPIETERS, W. LINKAGE DISEQUILIBRIUM IN THE NEW ZEALAND JERSEY POPULATION. In. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2006.

TAKASUGA, A. et al. Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 2, p. 125-36, 2007.

TAYLOR, J. F. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194–201, 1998.

VAZ, F. N. et al. Características da carcaça e da carne de novilhos e de vacas de descarte Hereford, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1501-1510, 2002.

WIBOWO, T. A. et al. Corticotropin releasing hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat depth in beef cattle. **Genome**, v. 50, p. 939-945, 2007.

YAMADA, T. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 gene with marbling in Japanese Black beef cattle. **Animal Genetics**, v. 40(2), p. 209 – 216, 2009.

CAPÍTULO 4 . IMPLICAÇÕES

A raça Canchim é precoce quanto a características de crescimento, possui adequada musculabilidade, é mais resistente a ectoparasitas e ao calor do que animais *Bos taurus* puros, mas deposita gordura tardiamente. Características de deposição de gordura são características quantitativas. As medidas de deposição de gordura no animal *in vivo* são trabalhosas e apresentam custo elevado, razão pela qual não costumam ser incluídas em programas de melhoramento tradicionais. A biologia molecular pode auxiliar o melhoramento dessas características por meio da identificação de marcadores moleculares associados a elas.

Muitos dos genes candidatos (IGFBP3, PPARGC1A, PSMC1 e CRH) apontados pela literatura como influenciadores da deposição de gordura em bovinos não foram significativamente associados com espessura de gordura subcutânea na população de Cachim e de MA estudadas, fato que ressalta a importância de se testar um marcador na população e condições ambientais em que se deseja implementar sua informação.

Nesse estudo marcadores de dois genes candidatos para deposição de gordura em bovinos (DDEF1 e FABP4) foram associados a espessura de gordura subcutânea em bovinos Canchim e MA, apresentando efeito aditivo sobre tal característica. Juntos os SNPs avaliados nos genes DDEF1 e FABP4 explicariam 15,45% da variância aditiva total da característica. Também foram identificadas, por estudo de haplótipos, duas regiões do cromossomo 14 associadas a variação da espessura de gordura subcutânea nessa população, que também apresentaram estritamente efeito aditivo. Considerando o fato de que esses marcadores foram testados em uma parcela significativa da população, os resultados apresentados nesse trabalho podem ser incorporados no programa de melhoramento dessa raça.