

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

ANDREA MARTINS DA SILVA

**Investigação de polimorfismos nos genes *IGF2* e *CYP21*
em bovinos de raças zebuínas e análise das possíveis
associações com características de interesse econômico**

RIBEIRÃO PRETO

2010

ANDREA MARTINS DA SILVA

**Investigação de polimorfismos nos genes *IGF2* e *CYP21*
em bovinos de raças zebuínas e análise das possíveis
associações com características de interesse econômico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Área de concentração: Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Armênia Ramalho de Freitas

Co-orientador(a): Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

RIBEIRÃO PRETO

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martins da Silva, Andrea

Investigação de polimorfismos nos genes *IGF2* e *CYP21* em bovinos de raças zebuínas e análise das possíveis associações com características de interesse econômico, Ribeirão Preto, 2010.
80p; il. 30cm

Tese de doutorado - apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética
Orientador(a): de Freitas, Maria Armênia Ramalho
Co-orientador(a): Ramos, Ester Silveira

1. polimorfismos. 2. *IGF2* 3. *CYP21* 4. bovinos 5. associação genótipo-fenótipo.

Nome: Martins da Silva, Andrea

Título: Investigação de polimorfismos nos genes *IGF2* e *CYP21* em bovinos de raças zebuínas e análise das possíveis associações com características de interesse econômico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
(FAPESP)**

**FUNDAÇÃO DE AMPARO AO ENSINO PESQUISA E ASSISTÊNCIA DO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO (FAEPA)**

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA
(CNPQ)**

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR (CAPES)**

**ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS CRIADORES E PESQUISADORES
(ANCP)**

**Dedico aos meus pais
Alvaro Aparecido da Silva (*in
memorian*) e Antonia Maria Segato da Silva
por todo amor, dedicação e incentivo dados
em todos os momentos de minha vida**

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Armênia Ramalho de Freitas pelos ensinamentos, confiança, incentivo e amizade. Muito Obrigada!!

À Prof^a. Dr^a. Ester Silveira Ramos pelo apoio, amizade, confiança e proposta inicial da tese.

Ao Prof. Dr. Alvaro Fabrício Lopes Rios por todo o envolvimento no trabalho, pela amizade e por grandes idéias no desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo pela amizade e apoio essenciais na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira pela valiosa contribuição nas análises estatísticas.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e sugestões.

À Pós-Graduação em Genética, especialmente ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Soares e Prof^a. Dr^a. Lúcia Martelli pelo incentivo, amizade e agradável convívio e pelo auxílio financeiro recebido nos estágios de doutorado realizados na Universidade de Liège (Liège-Bélgica) e Universidade Autônoma de Barcelona (Barcelona-Espanha).

Aos funcionários do bloco C: Sílvio Avelino dos Santos, Reginaldo Aparecido Vila, Marli Aparecida Vanni Galerani, Luiz Antônio Framartino Bezerra e Sebastião Paulo Framartino Bezerra pela colaboração e agradável convívio durante esses anos.

As secretárias do Departamento de Genética: Susie Adriana Penha Nalon, Maria Aparecida O. S. Elias e Silvia Sant'anna Consiglieri, pela atenção e disponibilidade constantes.

A todos os membros do Bloco C que direta ou indiretamente me apoiaram ao longo de meu doutorado: Adriana Renzi, Adriane Araújo de Oliveira, Ana Carolina Laus, Anderson Mioranza, Ciro Silveira e Pereira, Cristiana Libardi Miranda, Daniel Blassioli Dentillo, Felipe Brum Machado, Fernanda Prado Elias, Flávia Gaona de Oliveira Gennaro, Francielle Marques Araújo, Héliida Magalhães, Jaqueline Carvalho de Oliveira,

Jeferson Nomelini (*in memorian*), Juliana Fabricia Cuzzi, Juliana Meola, Karine Coelho, Lisandra Cristina Caetano da Silva, Luciana Caricati Veiga Castelli, Maria Silvina Juchniuk de Vozzi, Murilo Racy Soares, Paula Lumy Takeushi, Pedro Alejandro Vozzi, Rafaella Lemes e Vivian Taís Fernandes Cipriano.

Aos professores, funcionários e colegas do curso de pós-graduação em genética da FMRP, pelos ensinamentos e convivência.

A todos de minha família que sempre torceram por mim.

A todos meus amigos por fazerem parte de momentos agradáveis e importantes em minha vida.

Ao meu namorado Hudson de Oliveira Quirino pelo amor, incentivo, paciência, amizade e apoio dedicados nesta fase final de meu doutorado e também por fazer parte de momentos agradáveis e muito importantes em minha vida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Idiogramas do número de pares cromossômicos nos genomas humano e bovino (adaptado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov).....	02
Figura 2 - Animal da raça Gir (APTA/Mococa/SP).....	09
Figura 3 - Animal da raça Guzerá (www.guzeranf.com.br).....	11
Figura 4 - Animal da raça Nelore (www.ancp.org.br)	12
Figura 5 - Representação esquemática da sequência do gene <i>IGF2</i> bovino (GenBank: AY971631). As caixas brancas representam os exons não codificantes e as caixas pretas os exons codificantes. Os iniciadores utilizados e o sítio polimórfico estão representados em vermelho, com destaque sublinhado para a troca nucleotídica C por T.....	26
Figura 6 - Perfil do polimorfismo RFLP/ <i>Mbo</i> II encontrado no exon 6 do gene <i>IGF2</i> bovino observado na digestão com a enzima <i>Mbo</i> II. M: marcador molecular de 100 pares de base.....	27
Figura 7 - Histograma com a percentagem da frequência dos alelos C e T nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II.....	29
Figura 8 - Histograma com a percentagem da frequência genotípica (CC, TT e TC) nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II.....	30

Figura 9 - Sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II (193 pares de base) contra o banco de dados de sequências do genoma bovino.....	31
Figura 10 - Representação gráfica da análise gerada pelo site (http://regrna.mbc.nctu.edu.tw) com seis nucleotídeos em comum para o <i>motif</i> exônico R0950.....	33
Figura 11 - Identidade das sequências com os sítios polimórficos no exon 6 do gene <i>IGF2</i> bovino (RFLP/ <i>Mbo</i> II) contra o banco de dados de microRNAs (http://www.mirbase.org/).....	34
Figura 12 - Representação esquemática do SNP sobrepondo uma região de fator de transcrição Sp1 (caixa aberta) apenas na sequência com o nucleotídeo Citosina no sítio polimórfico. (www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2).....	35
Figura 13 - Representação esquemática da localização do gene <i>CYP21</i> bovino (número de acesso no GenBank: M11267) [Chung et al., (1986) modificado]. A caixa com círculo mostra o fragmento de 352 pares de base localizado na região promotora e as caixas numeradas representam os exons de 1 a 10. Os iniciadores utilizados e o sítio polimórfico estão representados em vermelho, com destaque sublinhado para a troca nucleotídica T por C.....	37
Figura 14 - Perfil do polimorfismo RFLP/ <i>Hpa</i> II encontrado no gene <i>CYP21</i> bovino observado após digestão com a enzima <i>Hpa</i> II. M: marcador molecular de 100 pares de base.....	38

Figura 15 - Histograma com a percentagem da frequência dos alelos T e C nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>HpaII</i>	40
Figura 16 - Histograma com a percentagem da frequência genotípica (TT,CC e CT) nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>HpaII</i>	40
Figura 17 - Ensaio de Metilação Alelo Específica com a detecção da metilação (*). M: marcador molecular de 100 pares de base.....	41
Figura 18 - Ensaio de Metilação Alelo Específica em animais heterozigotos nas três raças zebuínas Gir, Nelore e Guzerá. M: marcador molecular de 100 pares de base.....	42
Figura 19 - Localização das repetições (em vermelho) a partir da sequência de 352 pares de base do elemento encontrado na região promotora do gene <i>CYP21</i> no cromossomo 23 (em círculo) no genoma bovino.....	43
Figura 20 - Representação gráfica da análise gerada pelo site (http://regrna.mbc.nctu.edu.tw).....	45
Figura 21 - Representação esquemática do SNP sobrepondo nove nucleotídeos com um fator de transcrição Sp1 (caixa aberta) nas sequências dos sítios polimórficos para os alelos com as bases Timina e Citosina.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos de bovinos zebuínos separados de acordo com a raça, origem de material e polimorfismo analisado (N= número de amostras).....	16
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse	19
Tabela 3 -	Frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II em bovinos das raça Gir, Guzerá e Nelore (N = número de animais genotipados).....	28
Tabela 4 -	Identidade da sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II (193 pares de base) encontradas em diferentes organismos.....	32
Tabela 5 -	Coordenadas nas sequências amplificadas do polimorfismo <i>IGF2</i> -RFLP/ <i>Mbo</i> II (cromossomo 29) e nos miRNAs correspondentes.....	34
Tabela 6 -	Frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>Hpa</i> II em bovinos da raça Gir, Guzerá e Nelore (N = número de animais genotipados).....	39
Tabela 7 -	Identidade da sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>Hpa</i> II (352 pares de base) encontradas em diferentes organismos.....	44

Tabela 8 -	Efeito médio do alelo C (menos frequente na população), erro padrão, teste t de <i>Student</i> , probabilidade e teste de Bonferroni estimados para as características analisadas para o (polimorfismo <i>IGF2</i> RFLP/ <i>MboII</i>).....	48
Tabela 9 -	Efeito médio do alelo C (menos frequente na população), erro padrão, teste t de <i>Student</i> , probabilidade e teste de Bonferroni estimados para as características analisadas para o (polimorfismo <i>CYP21</i> RFLP/ <i>HpaII</i>).....	49
Tabela 10 -	Médias das características analisadas de acordo com número de animais (entre parênteses) representadas por cada genótipo correspondente aos polimorfismos <i>IGF2</i> - RFLP/ <i>MboII</i> e <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>HpaII</i>	50

LISTA DE SIGLAS

ABCZ	Associação Brasileira dos Criadores de Zebu
ANCP	Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores
ANUALPEC	Anuário da Pecuária Brasileira
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios do Nordeste Paulista
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BCM	Baylor College of Medicine
Bta	<i>Bos taurus</i>
C	Citosina
CTAG	Centro Técnico de Avaliação Genética
CpG	Regiões ricas em sítios CG
<i>CYP21</i>	gene <i>steroid 21-hidroxilase</i>
DEP	Diferença Esperada na Progênie
DIPP	Diferença Esperada na Progênie para Idade ao Primeiro Parto
DPE365	Diferença Esperada na Progênie para Perímetro Escrotal aos 365 dias de idade
DMR	<i>Differentially Methylated CpG-Rich Region</i> (região diferencialmente metilada)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMBRAPA	Empresa Brasileira em Pesquisa Agropecuária
ENSEMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
G	Guanina
GEMAC	Grupo de Genética, Melhoramento Animal e Computação
GenBank	Banco de dados de sequências nucleotídicas
GL	Grau de Liberdade

HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ICRs	<i>Imprinting Control Regions</i> (regiões controladoras de <i>imprinting</i>)
IGF2	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i> (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2)
IZ-SP	Instituto de Zootecnia - São Paulo
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
M	marcador molecular
MA	Massachussets
MAS	<i>Marker Assisted Selection</i> (Seleção Assistida por Marcadores)
MgCl	Cloreto de Magnésio
<i>mir</i>	miRNA transcrito
<i>MIR</i>	miRNA maduro
miR	microRNA
miRNA	microRNA
miRNABase	Banco de dados de micro RNAs
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	<i>RNA non-coding</i> (RNA não codificante)
NEBuffer	<i>New England Buffer</i> (tampão <i>New England</i>)
P	Probabilidade
PMGRG	Programa de Melhoramento Genético da Raça Guzerá
PAGRN	Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão salino-fosfato)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> (Loci de Características Quantitativas)
RAPD	<i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i>

RegRNA	Site de busca de regiões regulatórias contra um banco de dados de mRNAs
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição)
RNA	<i>Oxyribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
RP	Reprodução Programada
SINE	<i>Short Interspersed Nucleotide Element</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphim</i> (Polimorfismo de Base Única)
Sp1	<i>Specific protein 1</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
T	Timina
Taq	Bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
<i>TF Search</i>	<i>Searching Transcription Factor Binding Sites</i> (site para busca de sítios de ligação a fatores de transcrição)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
USDA - ARS	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
USP	Universidade de São Paulo
UTR	<i>Untranslated Region</i> (região não traduzida)
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

%	porcentagem
°C	graus Celsius
U	unidade
ng	nanograma
µg	micrograma
µl	microlitro
ml	mililitro
M	Molar
mM	milimolar
N	número de amostras
nm	nanômetros
χ^2	qui-quadrado

RESUMO

Martins da Silva, A. *Investigação de polimorfismos nos genes IGF2 e CYP21 em bovinos de raças zebuínas e análise das possíveis associações com características de interesse econômico*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Existe um relevante interesse em pesquisar a ocorrência de polimorfismos no genoma bovino por diferentes motivos, e mais recentemente, com a finalidade de agregar mais informações ao estudo de características quantitativas visando selecionar animais geneticamente superiores com considerável valor comercial. Os polimorfismos de base única (SNPs) neste estudo foram identificados como RFLP/*Mbo*II e RFLP/*Hpa*II sendo que o polimorfismo RFLP/*Mbo*II está situado no exon 6 do gene *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*), localizado no cromossomo 29 em bovinos, e desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação celular para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos. O polimorfismo RFLP/*Hpa*II encontra-se no elemento Bov-A2 (considerado um elemento SINE - *Short Interspersed Nucleotide Element*) presente na região promotora do gene *CYP21* (*Steroid 21-hydroxylase gene*) no cromossomo 23 em bovinos. Para avaliar a ocorrência dos SNPs utilizou-se a técnica de PCR-RFLP em amostras de DNA a partir de sangue/sêmen de cerca de 300 animais bovinos das raças zebuínas Gir, Guzerá e Nelore. As frequências alélicas mostraram maior incidência do alelo T quando comparado ao C enquanto que as frequências genotípicas apresentaram alta ocorrência do heterozigoto TC em comparação aos homozigotos CC e TT para o polimorfismo *IGF2* - RFLP/*Mbo*II. Com relação ao polimorfismo *CYP21* - RFLP/*Hpa*II, a frequência alélica revelou alto valor do alelo T. A população encontrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs estudados. Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para investigações *in silico* revelando que os sítios polimórficos estão em regiões com potencial regulatório. A associação desses polimorfismos com DEPs das

características reprodutivas e produtivas foram investigadas, entretanto mostrou-se significativas apenas para DP550 (*IGF2* - RFLP/*MboII*) e DP450 (*CYP21* - RFLP/*HpaII*). Os resultados obtidos sugerem que protocolos de Biologia Molecular *in vitro* podem ser usados para identificar novos marcadores moleculares, como SNPs funcionais adicionando informações que certamente contribuirão para estratégias de melhoramento dessas raças bovinas de grande importância para a produção de carne e leite em nosso país. Este foi o primeiro estudo sobre a ocorrência desses polimorfismos em raças zebuínas criadas no Brasil.

Palavras-chave: SNPs, *IGF2*, *CYP21*, bovinos, associação genótipo-fenótipo.

ABSTRACT

Martins da Silva, A. *Investigation of polymorphisms in IGF2 and CYP21 genes in zebu breeds and possible associations with economic interest traits.* Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

There is a considerable interest in researching the occurrence of polymorphisms in the bovine genome for different reasons, and more recently, in order to add more information to the study of quantitative traits to select genetically superior animals with considerable commercial value. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this study were identified as RFLP/*Mbo*II and RFLP/*Hpa*II polymorphisms being the RFLP/*Mbo*II is situated in exon 6 of the *IGF2* gene (insulin-like growth factor 2), located on chromosome 29 in cattle, perform an important role in cell proliferation, differentiation for growth and in the development of mammals. Polymorphism RFLP/*Hpa*II is the element Bov-A2 (considered an element SINE - Short Interspersed Nucleotide Element) present in the promoter region of *CYP21* gene (Steroid 21-hydroxylase gene) on chromosome 23 in cattle. To evaluate the occurrence of SNPs, we used the PCR-RFLP method on DNA samples from blood/semen of about 300 cattle breeds from Zebu Gyr, Guzerat and Nellore. The allele frequencies showed a higher incidence of T allele compared to C while the genotype frequencies showed high incidence of heterozygous CT compared to CC and TT homozygous for the *IGF2* polymorphism - RFLP/*Mbo*II. On the subject of the *CYP21* polymorphism - RFLP/*Hpa*II, the allele frequency showed high value T. The population was found in Hardy-Weinberg equilibrium for the SNPs studied. Bioinformatics tools, used for *in silico* investigations, revealed that the polymorphic sites are in regions with regulatory potential. The association of these polymorphisms with EPDs of reproductive and productive traits were investigated, but proved to be significant only for DP550 (*IGF2* - RFLP/*Mbo*II) and DP450 (*CYP21* -

RFLP/*HpaII*). The results suggest that protocols of molecular biology *in vitro* can be used to identify new molecular markers, such as functional SNPs adding information that certainly will contribute to the improvement strategies of these breeds of great importance for the production of meat and milk in our country. It has been the first study on the occurrence of these polymorphisms in Zebu breeds raised in Brazil.

Keywords: SNPs, *IGF2*, *CYP21*, cattle, genotype-phenotype association

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Marcadores Moleculares em bovinos.....	2
1.2. Gene <i>IGF2</i>	4
1.3. Gene <i>CYP21</i>	5
1.4. Genética Molecular e Melhoramento Genético Animal.....	6
1.5. Considerações sobre as raças zebus analisadas.....	8
1.5.1. Raça Gir.....	9
1.5.2. Raça Guzerá.....	10
1.5.3. Raça Nelore.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivos Gerais.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Coleta e grupo amostral.....	16
3.2. Extração de DNA.....	17
3.3. Amplificação por Polimerase Chain Reaction (PCR).....	18
3.4. RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	19
3.5. Ensaio de Metilação Alelo Específica.	20
3.6. Análises <i>in silico</i>	21
3.6.1. BLAST.....	21
3.6.2.mRNA.....	21
3.6.3. miRNA.....	22

3.6.4. TF Search.....	22
3.7. Procedimento estatístico.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Identificação do polimorfismo RFLP/ <i>Mbo</i> II no exon 6 do gene <i>IGF2</i>	25
4.1.1. Genotipagem.....	25
4.1.2. Frequências alélica e genotípica.....	27
4.1.3. Análises <i>in silico</i>	30
4.1.3.1. BLAST.....	30
4.1.3.2. mRNA.....	32
4.1.3.3. miRNA.....	33
4.1.3.4. TFsearch.....	35
4.2. Identificação do polimorfismo no elemento Bov-A2 da região promotora do gene <i>CYP21</i> (RFLP/ <i>Hpa</i> II).....	36
4.2.1. Genotipagem	36
4.2.2. Frequências alélica e genotípica	38
4.2.3. Ensaio de Metilação Alelo Específica.....	41
4.2.4. Análises <i>in silico</i>	42
4.2.4.1. BLAST.....	42
4.1.3.2. mRNA.....	44
4.1.3.3. miRNA.....	45
4.1.3.4. TF Search.....	46

4.3. Análise da associação genótipo-fenótipo dos polimorfismos(<i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II e <i>CYP21</i> - RFLP/ <i>Hpa</i> II) nos animais da raça Nelore.....	47
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1. Polimorfismo RFLP/ <i>Mbo</i> II no gene <i>IGF2</i> bovino.....	54
5.2. Polimorfismo RFLP/ <i>Hpa</i> II no gene <i>CYP21</i> bovino.....	59
5.3. Associação genótipo-fenótipo.....	61
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS.....	66
8. ANEXOS.....	81
8.1. Artigo publicado na revista <i>Developments in Biologicals</i>	82
8.2. Artigo submetido à revista <i>Research in Veterinary Science</i>	88
8.3. Artigo a ser submetido	130

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é uma das atividades econômicas mais relevantes do agronegócio brasileiro e os selecionadores estão sempre atentos, na busca de conhecimentos e investindo na aplicação de novas tecnologias, visando o incremento da rentabilidade de seus sistemas de produção e sua competitividade para se manterem no mercado. Entre as tecnologias utilizadas nos diversos segmentos do processo produtivo, os Programas de Melhoramento Genético assumem papel relevante e consideram a genética como principal pilar ou instrumento condutor quando o principal objetivo é a identificação e seleção de animais superiores para características de interesse econômico, para uso como reprodutores nos rebanhos. Devido ao seu grande potencial de produção, rusticidade e adaptação às diversas condições e regiões do país, as raças zebuínas juntamente com seus cruzamentos, representam um grande percentual do total da população bovina no Brasil estimada no ano de 2008 em aproximadamente 191,2 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2009).

Atualmente, pesquisas na área de Biologia Molecular têm proporcionado a geração de técnicas que auxiliam e complementam o Melhoramento Genético Animal tradicional, intensificando pesquisas sobre ocorrência de diferentes tipos de marcadores no genoma bovino com a finalidade de agregar mais informações aos estudos de características quantitativas de interesse zootécnico (Regitano, 2005; Garcia, 2006). A aplicação direta de técnicas moleculares tem permitido detectar polimorfismos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) caracteristicamente abundantes no genoma e mais recentemente evidenciados em pesquisas sobre a existência da associação genótipo-fenótipo, progressivamente estudadas com o intuito de observar possíveis variações genóticas relacionadas com características quantitativas de interesse no Melhoramento Animal (Curi et al., 2005; Andréa et al., 2007; de Souza et al., 2007; Carrijo et al., 2008; Caetano, 2009; Curi et al., 2009; Ferraz et al., 2009).

1.1. Marcadores Moleculares em bovinos

A organização do genoma bovino é considerada mais semelhante ao genoma humano quando comparado ao dos roedores. O genoma humano possui 23 pares de cromossomos enquanto que o genoma bovino possui 30 pares de cromossomos (Figura 1) contendo um mínimo de 22.000 genes com alta quantidade de elementos repetitivos e polimorfismos de base única (conhecidos como SNPs) (Mac Eachern et al., 2006; The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009).

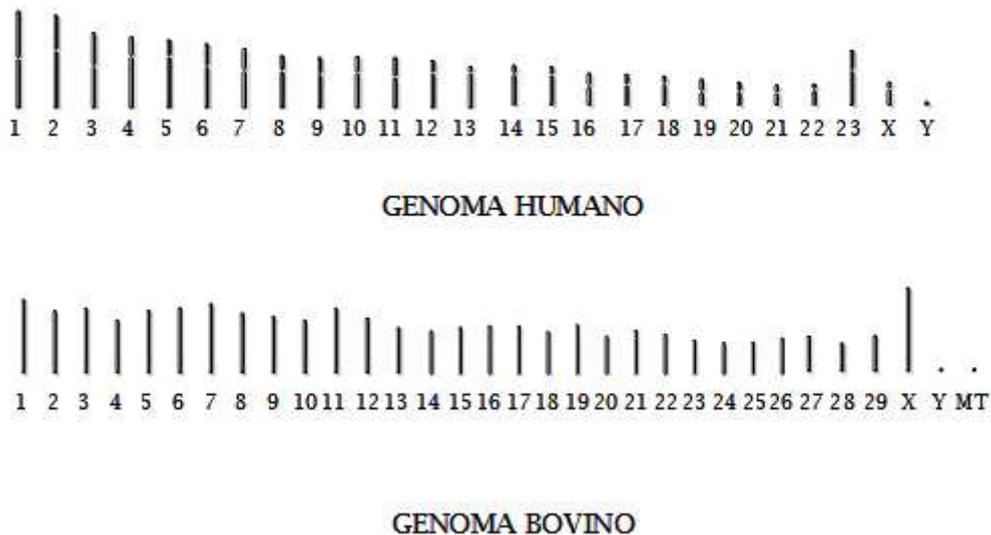


Figura 1. Idiogramas do número de pares cromossômicos nos genomas humano e bovino (adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As alterações de base única, com inserção/deleção ou transversão de apenas um nucleotídeo nas sequências de DNA são denominadas SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e geram variabilidade genômica na representação alélica (Ellis, 2000; Meuwissen e Goddard, 2010; Rosenberg et al., 2010). Os SNPs são extremamente abundantes e com distribuição homogênea no genoma (Chen e Sullivan, 2003; Caetano, 2009). A análise de SNPs apresenta vantagens consideráveis que incluem baixa taxa de mutação, genotipagem precisa, e propicia melhor interpretação de dados (Krawczak, 1999). A metodologia básica aplicada para a detecção de polimorfismos e identificação de marcadores moleculares é a técnica de RFLP (*Restriction*

Fragment Length Polymorphisms - polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição) que consiste na clivagem da região de interesse no DNA com enzimas de restrição específicas (Kelly e Smith, 1970; Maeda et al., 1989). Nos estudos com bovinos, atualmente nos países desenvolvidos, o perfil de genotipagem é adquirido por meio de equipamentos de última geração com *chips* que identificam mais de 500.000 SNPs no genoma (Seidel, 2010). Até pouco tempo, a principal preocupação dos cientistas era a redução de custos nas análises nos estudos sobre Seleção Assistida por Marcadores (MAS - *Marker Assisted Selection*).

Mais recentemente, com a disponibilidade de novas técnicas de genotipagem centenas e milhares de SNPs são genotipados como rotina (por exemplo no genoma humano) e segundo Bojesen e Nordestgaard (2008) mais de 10 milhões de SNPs já foram identificados. O desenvolvimento de novas metodologias nos vai permitir visualizar uma mudança no cenário atual da biotecnologia de forma a acelerar a velocidade de descobertas e reduzir o custo dessas pesquisas. Nos países desenvolvidos as chamadas tecnologias de sequenciamento de segunda geração (Roche 454 - Margulies et al., 2005, Solexa-Illumina - Bennett, 2004 e ABI Solid - Valouev et al., 2008) são capazes de produzir vastos conjuntos de dados (da ordem de milhões de bases sequenciadas) em um único experimento altamente automatizado, com duração de 48 horas, mas infelizmente, ainda não há disponibilidade desses equipamentos para muitos pesquisadores brasileiros (Caetano, 2009).

O estudo de polimorfismos do tipo SNP, em larga escala no genoma, relacionados a aspectos fenotípicos, define-se como seleção genômica (Goddard e Hayes, 2007). A utilização de marcadores moleculares no Melhoramento Animal diminui os inconvenientes da seleção baseada em análises exclusivas de informações do fenótipo, pois permite a identificação e caracterização genética de populações, raças e espécies, o que facilita o estudo de genealogias (Machugh et al., 1997).

Em bovinos, a detecção de sítios polimórficos nos locus de genes considerados candidatos está diretamente relacionada com características de interesse econômico (de Souza et al., 2007). Os SNPs são mais estáveis que outros marcadores genéticos, como sequências simples, embora não sejam

tão informativas devido à sua natureza predominantemente bialélica (Machugh et al., 1997).

1.2. Gene *IGF2*

O gene *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) codifica para o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2, sendo expresso em vários tecidos durante o desenvolvimento dos mamíferos (Hitchins e Moore, 2002). A proteína IGF2, também conhecida como somatomedina A, é um polipeptídeo que apresenta alto grau de homologia com a sequência da insulina e desempenha um papel primordial no crescimento dos mamíferos, influenciando a divisão celular fetal, diferenciação, desenvolvimento da placenta e possível regulação metabólica (O'Dell e Day, 1998; Gicquel e Le Bouc, 2006). Em humanos, o gene *IGF2* está localizado no cromossomo 11 enquanto que nos bovinos, Schmutz e colaboradores (1996) mostraram dados de um mapeamento comparativo de hibridização *in situ* em que o gene *IGF2* está situado na porção distal do cromossomo 29; esse gene contém 10 exons onde a região codificadora se encontra nos exons 8, 9, e parcialmente no exon 10 (Ohlsen et al., 1994; Flisikowski et al., 2005).

O gene *Igf2* de camundongos foi um dos primeiros genes descritos que possui expressão de origem paterna (DeChiara et al., 1990). Somente o alelo paterno do gene *igf2* é expresso na maioria dos tecidos, constituindo um exemplo clássico de *imprinting* (marcação) genômico (DeChiara et al., 1991). *Imprinting* genômico é um mecanismo de regulação gênica no qual somente um membro do par alélico é expresso de acordo com sua origem parental. Este fenômeno está associado com marcadores genéticos diferenciais em Regiões Controladoras de *Imprinting* (ICRs) (Reik e Walter, 2001). Em bovinos, a maioria dos tecidos fetais expressa somente o alelo paterno deste gene, enquanto que o alelo materno é transcricionalmente silenciado (Dindot et al., 2004). Este fenômeno também está implícito no crescimento pós-natal alterando, especificamente a massa corporal magra em suínos (Rogler et al., 1994; Jeon et al., 1999; Nezer et al., 1999; Amarger et al., 2002; Van Laere et

al., 2003) e camundongos (Rogler et al., 1994).

1.3. Gene *CYP21*

O locus do gene *CYP21* (*steroid 21-hidroxilase*) bovino está localizado no cromossomo 23, onde Damiani e colaboradores (2000a) identificaram vários polimorfismos do tipo SNP revelados por sequenciamento direto da amplificação de produtos da região promotora em seis raças bovinas italianas.

Em humanos, o gene *CYP21* encontra-se no cromossomo 6 e codifica para a enzima 21-hidroxilase. A deficiência desta enzima causa o mais comum defeito na síntese de hormônios esteróides na glândula adrenal para a fabricação de cortisol causando a Hiperplasia Congênita da Adrenal (New, 2006) associada com virilidade precoce (Speiser, 2009).

A região promotora do gene *CYP21* bovino apresenta uma sequência nomeada Bov-A2 (Damiani et al., 2000a). Os elementos Bov-A2 são compostos por dois monômeros, chamados Bov-A (115 pb), unidos por uma sequência de ligação com repetições curtas (CACTTT n) (Onami et al., 2007), com cerca de 220.000 cópias em todo o genoma. Sequências Bov-A2 são consideradas membros da família SINE (*Short Interspersed Nucleotide Element*) e se encontram largamente distribuídas no genoma de ruminantes (Nijman et al., 2002). Existem três famílias SINE em *Ruminantia*: Bov-A2, Bov-tA, e Bov-B, que são estimados em 1,8%, 1,6% e 0,5% do genoma bovino total, respectivamente, com cerca de 285.000 cópias (Lenstra et al., 1993).

A variabilidade dentro de sequências SINE sugere que estes elementos são antigos fragmentos evolucionários além de possuírem sequências regulatórias que se presume influenciar a transcrição de genes vizinhos (Schütz et al., 2005; Zwolinska, 2006).

As frequências de mutações ou polimorfismos são geralmente altas em sequências Bov-A2 em comparação com outras sequências genômicas não codificantes: esta elevada variação genética em elementos Bov-A2 pode ser responsável por vários processos de recombinação gênica (Damiani et al.,

2000b). Os mesmos autores sugeriram que um número considerável de mutações pontuais, inserções e deleções estão presentes em toda a sequência Bov-A2 e, portanto, este retroelemento pode ser uma importante fonte de polimorfismo de base única (SNP) para a análise dos genomas da família *Bovidae*.

1.4. Genética Molecular e Melhoramento Genético Animal

O desenvolvimento do projeto de sequenciamento do genoma bovino liderado por pesquisadores do Baylor College of Medicine (BCM), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - ARS) e Universidade de Georgetown, representou um grande avanço na área da genética molecular (The Bovine HapMap Consortium, et al., 2009). O genoma funcional bovino abrange o sequenciamento e a análise de genes possibilitando aplicação no desenvolvimento de produtos e tecnologias de forma a aumentar a produção animal, a eficiência reprodutiva dos animais, a resistência a doenças dos rebanhos e melhorar a qualidade de carne e leite. O avanço dos estudos genético-moleculares tem permitido aos cientistas caracterizarem genes com polimorfismos em regiões codificantes e/ou não codificantes permitindo que se detecte uma variabilidade fenotípica/genotípica para características de importância econômica. As variações no desempenho de cada animal são obtidas através de informações fenotípicas que, relacionadas com o genótipo, são controladas por vários genes. A associação de características fenotípicas e a aplicação de seleção assistida por marcadores (MAS) permitem favorecer um padrão apropriado de seleção para os produtores, pois a aferição das informações é conduzida em animais ainda jovens, o que possibilita um manejo adequado à expressão de seu potencial genético (Goodard e Hayes, 2007). A genotipagem do DNA de sêmen de 331 animais de raças leiteiras e de corte mostraram uma alta incidência do alelo A a partir do polimorfismo detectado no gene *DGAT1* apenas para as primeiras, indicando uma possibilidade de associação com dados observados de produção de leite

(Lacorte et al., 2006) confirmando estudos anteriores e ressaltando a importância do achado para estudos usando Seleção Assistida por Marcadores. Os genes de interesse e marcadores moleculares revelam características em comum com relação a vários aspectos de importância genética e conseqüentemente econômica nos bovinos. De acordo com Meuwissen et al. (2001), os estudos abordando os aspectos de produção e fertilidade tem grande contribuição para relacionar raças que são melhoradas especificamente, como é o caso da raça holandesa para a produção de leite (*Bos taurus taurus*) e das raças zebuínas pela sua adaptação aos trópicos e tolerância às mais variadas condições climáticas e de ambiente (*Bos taurus indicus*).

Uma vantagem desses estudos é que a análise do DNA pode ser realizada em estágio precoce do desenvolvimento e independentemente do sexo do animal contribuindo para aumentar a intensidade de seleção para a redução do intervalo de gerações (Georges, 2001). As características de interesse econômico são expressas por muitos loci gênicos, denominados Loci de Características Quantitativas (QTL - *Quantitative Trait Loci*) originadas a partir de regiões cromossômicas que contribuem para a variabilidade das características complexas que são influenciadas por vários genes e também pelo ambiente (de Koning, 2006). A identificação de QTLs juntamente com outras informações moleculares contribui para a seleção de animais com desempenhos superiores para características de interesse econômico como taxa de crescimento, composição de produtos (leite e carne), fertilidade, precocidade, sobrevivência em diferentes ambientes e resistência a doenças entre outros (Goodard e Hayes, 2007).

Como reflexo da demanda crescente por reprodutores, principais responsáveis pela maior parte do progresso genético alcançado pelas populações bovinas, o Brasil tem procurado investir na identificação de animais geneticamente superiores, resultado dos diversos Programas de Melhoramento Genético das raças zebuínas em andamento, disponibilizando no mercado animais que transmitam precocidade, maior eficiência reprodutiva, velocidade de ganho de peso, entre outras características de interesse. As avaliações genéticas realizadas periodicamente por esses

Programas permitem agrupar animais que possuam um perfil genético mais adequado para cada sistema de produção visando uma exploração sustentável (Lôbo, 2000; Lôbo, 2001; Lôbo, 2002; Freitas, 2004; Freitas e Cardoso, 2005; Regitano, 2005; www.abcz.org.br, Lôbo, 2010). Os programas de seleção de bovinos de corte são desenvolvidos de forma a priorizar os anseios dos produtores com estimativas dos parâmetros genéticos de características economicamente expressivas para que contribuam com o ganho genético dos rebanhos (Barbosa, 2005). A importância de avaliar as características reprodutivas está relacionada diretamente com a taxa de ganho genético anual, pois a redução na idade ao primeiro parto pode propiciar um número maior de crias por matriz dentro do sistema de produção, conseqüentemente, contribuir na redução do intervalo de gerações (Freitas, 2004).

Com a disponibilidade das novas tecnologias aliadas ao comportamento evolutivo das espécies torna-se relevante o estudo de características genéticas nas diferentes formas de vida. No caso da bovinocultura, com a exigência do mercado para uma qualidade genética dos animais cada vez maior sem prejuízo do meio ambiente, sempre haverá uma tendência para a busca da eficiência dos sistemas de produção bovino visando à preservação ambiental e os Programas de Melhoramento Genético assumem papel relevante neste processo.

1.5. Considerações sobre as raças zebus analisadas

Diante do grande interesse nacional pelas raças zebus, vários Programas de Avaliação Genética vêm sendo desenvolvidos no país, principalmente devido aos seus aspectos de adaptação, rusticidade, resistência a doenças e sustentabilidade para produção nos trópicos. Existe uma demanda crescente por animais dessas raças tanto no Brasil como e em outros países. Os principais objetivos desses Programas de Melhoramento Genético são: estabelecer ações que possibilitem obter animais geneticamente superiores que apresentem melhor desempenho, maior

precocidade, fertilidade, crescimento e conseqüentemente contribuir para o aumento da produtividade e competitividade do rebanho nacional de corte e leite no mercado de carnes preservando o meio ambiente. A confiabilidade nos resultados obtidos por essas avaliações genéticas vem sendo refletida nos preços de venda dos reprodutores, sêmen e embriões dos animais avaliados constituindo uma importante ferramenta na determinação de sua qualidade (MAPA; ABCZ; IZ-SP; EMBRAPA; ANCP; GEMAC-USP; UFMG entre outros; www.asbia.org.br).

1.5.1. Raça Gir

A raça Gir (Figura 2) teve origem na região de Gir, localizada na Península de Kathawar, na Índia. No Brasil, a vinda de animais dessa raça ocorreu desde meados do século XVII até a década de 60, a princípio foram importados animais da região do Rio Nilo, ao norte da África, em seguida da África Ocidental (Senegal, Guiné e Congo) e, finalmente da Índia.



Figura 2. Animal da raça Gir (cedido gentilmente pelo médico veterinário Anibal Eugênio Vercesi Filho - APTA/Mococa/SP).

Os trabalhos de seleção da raça Gir no Brasil foram principalmente direcionados para produção de leite constituindo dois grupos de animais:

um formado pelo Gir de seleção leiteira cujos animais apresentam maior potencial de produção de leite com razoável persistência da lactação, e outro grupo de menor proporção selecionado para corte. A raça Gir foi a primeira raça zebuína com touros avaliados e provados em teste de progênie para leite e são genotipados para os alelos referentes aos genes κ -caseína e β -lactoglobulina (Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro - teste de progênie, CNPGL/EMBRAPA/ABCGIL/ABCZ e Projeto Genoma do Zebu Leiteiro) (Vercesi Filho et al., 2010).

Os animais desta raça apresentam como características importantes a docilidade, rusticidade, com aptidões para o leite e carne. A raça Gir foi e continua sendo intensamente utilizada em cruzamentos em especial com a raça Holandesa e em menor escala com outras raças européias especializadas para produção de leite, tais como a Jersey e Pardo-Suíço quando a principal finalidade é a produção de leite. Estes animais estão presentes em diversas regiões do país, quando se busca por rusticidade adaptação e produção de leite. A raça Gir foi bastante utilizada também na formação da raça Girolando (raça mestiça leiteira formada a partir do cruzamento da raça Gir com a raça Holandesa) atualmente predominante no Brasil, como animal preferido pelos produtores por aliar o potencial de produção das raças européias (raça Holandesa) e a rusticidade e adaptação aos trópicos da raça zebu (Gir) (Freitas e Cardoso, 2005).

1.5.2. Raça Guzerá

A raça Guzerá de origem Indiana (Figura 3) chegou ao Brasil com as primeiras importações de zebuínos, em torno de 1870, e revelou grande capacidade de adaptação e produção de carne e leite. Devido à sua grande versatilidade de produção e capacidade de imprimir vigor e rusticidade, tem sido também intensamente utilizada em cruzamentos fazendo parte da formação de diversos grupamentos de corte ou de dupla aptidão. Nesse contexto, a raça Guzerá destaca-se em várias regiões do país, em especial no nordeste brasileiro, onde criatórios tradicionais persistem até os dias atuais.

A raça Guzerá corresponde ao gado Kankrej da Índia, cujos animais receberam pequenas contribuições das raças Malvi, Hissar e Tarparkar (Santiago, 1985). No Brasil é considerada de duplo propósito (corte e leite), embora exista um segmento de criadores explorando a raça apenas para corte. No início do século XX o Guzerá foi predominante no Brasil, contudo nas décadas de 30 e 40, sofreu um forte efeito gargalo quando as fêmeas da raça foram intensamente utilizadas para formação do Indubrasil. As primeiras pesquisas com a raça Guzerá datam de mais de quatro décadas com estudos de Carneiro e Memória (1959), posteriormente seguidos por Andrade (1973) e Freitas (1975), o que justifica o interesse destes animais em várias regiões do país (Vieira, 2004).



Figura 3. Animal da raça Guzerá (cedido gentilmente por Carlos Fernando Fontenelle/www.guzeranf.com.br)

Nos últimos anos houve um aumento considerável na comercialização de sêmen dessa raça zebuína no Brasil, oportunidade em que entre as raças nacionais de corte, o Guzerá destacou-se em segundo lugar depois da raça Nelore em número de doses comercializadas (www.asbia.org.br).

O Programa de Avaliação Genética da Raça Guzerá (PAGRG) conduzido pelo Grupo de Genética, Melhoramento Animal e Computação (GEMAC-USP/Ribeirão Preto-SP), sob gestão da Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP) teve início em 1999, como resultado da cooperação

técnica entre várias instituições de ensino e pesquisa e participação de fazendas localizadas geograficamente em vários estados. Desde a sua criação, este programa vem contribuindo para o melhoramento da raça, visto que entre seus objetivos principais, está a identificação de animais geneticamente superiores (jovens, touros e matrizes), expressos por meio da diferença esperada na progênie (DEP), para características de interesse econômico, visando a propagação desses reprodutores na população.

1.5.3. Raça Nelore

O primeiro registro de entrada do Nelore (*Bos taurus indicus*) no Brasil aconteceu em 1868, com a chegada de um casal de animais em Salvador na Bahia. No entanto, segundo a ABCZ (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu), os primeiros registros de importação de animais zebuínos datam de 1898. A raça Nelore (Figura 4) na sua origem, foi utilizada para exploração leiteira e atualmente vem sendo melhorada geneticamente no Brasil, voltada quase que exclusivamente para a produção de carne, representando a principal raça zebuína utilizada no Brasil (www.ancp.org; ww.abcz.org).



Figura 4. Animal da raça Nelore (www.ancp.org.br)

Desde a década de 60 o Nelore vem sendo selecionado para a produção de carne, sendo atualmente a primeira raça em comercialização de sêmen com 52% do total comercializado em 2008, segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (www.asbia.org.br).

O Programa de Avaliação Genética da Raça Nelore (PAGRN) também conduzido pelo Grupo de Genética, Melhoramento Animal e Computação (GEMAC-USP/Ribeirão Preto-SP), sob gestão da Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP) teve início em 1988. No decorrer desses vinte anos de experiência, vem identificando um número crescente de animais geneticamente superiores incentivando sua utilização nos rebanhos para que transmitam características desejáveis aos seus descendentes proporcionando uma rápida propagação de genes na população (Lôbo, 2010; www.ancp.org.br).

O projeto da Reprodução Programada (RP) de touros jovens é uma das tecnologias geradas pelo PMGRN-Nelore Brasil e destaca-se por ser um teste de progênie desenvolvido desde 1995 em parceria com 123 fazendas e nos últimos anos, com as Centrais de Inseminação Artificial. O Teste de Progênie usual caracteriza-se por comparar reprodutores a partir da avaliação do valor genético do animal, com base no desempenho médio de suas progênies. A RP diferencia-se do Teste de Progênie convencional por usar além das informações do animal, toda a ascendência disponível para o cálculo do valor genético utilizando, de forma planejada, touros jovens previamente avaliados pelo PMGRN que apresentem valores de DEPs diferenciados para diversas características (Val, 2006).

Os touros testados pela RP são periodicamente avaliados para que o fornecimento de reprodutores para uso nos rebanhos da raça Nelore (tanto para o mercado como para centrais de Inseminação Artificial) atinja alto potencial genético o mais precocemente possível, contribuindo para o atendimento da demanda por reprodutores em nível nacional (Freitas, 2004).

Além das aplicações no melhoramento genético na área da genética quantitativa, a Reprodução Programada também tem contribuído para pesquisas na área reprodutiva de produção de embriões *in vitro*, transferência de embriões, criopreservação e estudos na área de genética

molecular, o que vem contribuindo substancialmente para o aumento da produtividade e competitividade dos rebanhos brasileiros (Lôbo, 2010; www.ancp.org.br).

2. OBJETIVOS

O presente estudo foi dividido em duas etapas: a primeira abordagem teve como enfoque os aspectos biológicos envolvidos na investigação dos polimorfismos nos genes *IGF2* (RFLP/*Mbo*II) e *CYP21* (RFLP/*Hpa*II), com os três grupos das raças Gir, Guzerá e Nelore sem considerar os aspectos fenotípicos. Na segunda etapa, uma amostra de touros jovens da raça Nelore, participantes de teste de progênie, após a análise molecular, foi submetida a uma avaliação em relação aos aspectos quantitativos representados pelas DEPs (Diferença Esperada na Progênie) de algumas características reprodutivas e de crescimento para verificar sua possível associação com o genótipo.

2.1. Objetivos Gerais

- Caracterizar biologicamente os polimorfismos nos genes *IGF2* e *CYP21* (RFLP/*Mbo*II e RFLP/*Hpa*II, respectivamente) em bovinos das raças Gir, Guzerá e Nelore.
- Contribuir com informações moleculares para as avaliações genéticas de bovinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Compreender a relação biológica existente nos polimorfismos.
- Realizar análises *in silico* das regiões sítios polimórficos.
- Identificar a variabilidade genotípica entre indivíduos.
- Analisar a possível relação entre esses polimorfismos e DEPs para algumas características reprodutivas e de crescimento - Associação genótipo-fenótipo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e grupo amostral

Alíquotas de aproximadamente 10 ml de sangue periférico da jugular de 135 animais foram coletadas por profissional veterinário autorizado e acondicionadas em frascos estéreis do tipo *Vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) a 4°C. Adicionalmente, outras 150 amostras de sêmen de um grupo de animais da raça Nelore e um animal da raça Guzerá, acondicionadas em palhetas e mantidas em nitrogênio líquido a -80°C foram selecionadas para a extração de DNA.

Foram constituídos dois grupos de animais de acordo com a raça, origem do material e polimorfismo estudado (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos de bovinos zebuínos separados de acordo com a raça, origem de material e polimorfismo analisado (N= número de amostras).

Raças	<i>IGF2</i> - RFLP/ <i>MboII</i>			<i>CYP21</i> - RFLP/ <i>HpaII</i>		
	Material		Total (N)	Material		Total (N)
	Sangue	Sêmen		Sangue	Sêmen	
Gir	66	-	66	66	-	66
Guzerá	28	01	29	43	01	44
Nelore	28	147	175	26	149	175
Total (N)	122	148	270	135	150	285

Os animais da raça Gir pertencem ao rebanho APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios do Nordeste Paulista (N=39) e a uma fazenda particular (N=27). Os animais da raça Guzerá assim como os animais da raça Nelore são provenientes de fazendas cujos criadores são participantes dos Programas de Melhoramento Genético das Raças Guzerá e

Nelore (PMGRG e PMGRN). Parte dos animais da raça Nelore (N=120) são integrantes do teste de progênie de touros jovens conhecido como Reprodução Programada, que faz parte do PMGRN sob gestão da ANCP (Associação Nacional dos Criadores e Pesquisadores). As informações sobre as DEPs dos animais pertencem ao arquivo de dados provenientes da ANCP (PMGRN e PMGRG). Maiores informações sobre o projeto da Reprodução Programada de touros jovens foram apresentadas por Freitas (2004) e Val et al. (2008).

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório do Grupo de Epigenética e Reprodução do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA obedeceu ao protocolo por método salino conforme descrito por Olerup e Zetterquist (1992) com modificações. O volume de sangue/sêmen foi transferido para microtubos de 1,5ml contendo 1,0ml de solução tampão (PBS - *Phosphate Buffered Saline*). As amostras foram centrifugadas a 13.000rpm por 30 segundos em temperatura ambiente (Hettich Universal 32R - Zentrifugen, GMI, Inc.) sendo que o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido até a obtenção de *pellet* branco. O sedimento obtido foi ressuspenso em 80µl de Tampão de Proteinase K [NaCl 0,375M; EDTA (pH 8.0) 0,12 M], 8,0µL de proteinase K (25ng/ml), 10µl de SDS 20% e 283,3µl de água ultrapura (mili-Q plus - Milipore) esterilizada à base de cobalto e incubado à 55°C por 16 horas sem agitação. A seguir, as amostras foram mantidas em 4°C por aproximadamente 15 minutos e adicionou-se 120µl de NaCl (Cloreto de Sódio) 5M agitando vigorosamente cada tubo por 8 segundos. Procedeu-se centrifugação das amostras a 13.000 rpm por 8 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5ml contendo 1,0ml de etanol absoluto. Após a homogeneização com inversões suaves, as amostras de DNA foram estocadas em -20°C por 24 horas.

O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com etanol 70%. As amostras foram desidratadas e ressuspensas em 50µl de água ultrapura (mili-Q plus - Milipore) esterilizada à base de cobalto. Com a dissolução completa do precipitado de DNA este foi quantificado (em *Eppendorf BioPhotometer*) e acondicionado em -20°C.

3.3. Amplificação por Polimerase Chain Reaction (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é usada para amplificar fragmentos específicos de interesse (Saiki et al., 1988). A reação foi conduzida em um volume final de 25µl e consistiu de 50 a 100 ng de DNA genômico (DNA molde) 50 mM de MgCl₂, 1,5µl de solução tampão 1X (200mM Tris pH 8,4, 500mM KCl), 5 pmol (10pmol/µl) de cada iniciador, 0,25mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,2U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK)].

Os iniciadores sintetizados para a amplificação dos fragmentos (Tabela 2) foram construídos através do programa GeneRunner (versão 3.5, disponível para download no site <http://www.generunner.net>) a partir das sequências dos genes *IGF2* e *CYP21* já disponíveis em banco de dados do genoma bovino com números de acesso GenBank AY971631 e M11267, respectivamente. O GenBank é uma base de dados de sequências nucleotídicas produzida pelo Centro Nacional para a Informação da Biotecnologia (NCBI - National Center for Biotechnology Information) disponível para busca no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse.

Polimorfismo/ sequência amplificada	Iniciadores	Sequência
<i>IGF2</i> - RFLP/ <i>Mbo</i> II (193 pb)	forward	5'GCCTCTCGCTGTCCTCTC 3'
	reverse	5'CAGCCCGTCCTCCCTAAAG 3'
<i>CYP21</i> - RFLP/ <i>Hpa</i> II (352 pb)	forward	5' CCCACCGAGTCCTGCCAC 3'
	reverse	5' GAGGGGGCAGTTGAAGGAC 3'

As condições básicas de ciclagem foram: 5 minutos a 94°C, seguidos por quarenta ciclos (polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II) e trinta ciclos (polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*Hpa*II) compreendendo denaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 60°C) e extensão (30 segundos a 72°C), finalizando com um ciclo de 10 minutos a 72°C.

O seguimento do perfil termal foi desenvolvido em uma máquina T Gradient Thermocycler (Whatman Biometra - Gottingen, Germany). Os produtos de amplificação foram separados em 2% de gel de agarose (Seaken, FMC Inc.), corados com brometo de etídeo (0,5mg/ml) e observados através de transiluminador ultravioleta UV_{260nm} (com comprimento de onda de 260 nanômetros). A preparação do gel e condições de corrida seguiram a metodologia descrita por Sambrook et al. (1989).

3.4. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica RFLP - Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição - consiste na detecção de polimorfismos em fragmentos de restrição obtidos a partir da clivagem alelo específica da fita de DNA (Kelly e Smith, 1970; Maeda et al., 1989) por enzimas de restrição indicadas para cada região.

Os fragmentos de PCR obtidos a partir da amplificação com iniciadores específicos foram submetidos à digestão enzimática em um volume final de 10µl, contendo aproximadamente 3µl do produto

amplificado (100ng), 0,4U da endonuclease de restrição *HpaII* (New England Biolabs - Beverly, MA - USA) suplementada com tampão de digestão 1X recomendado pelo fabricante (NEBuffer 1: 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol pH 7,0) - nas reações com o polimorfismo RFLP/*HpaII*. Para o polimorfismo RFLP/*MboII* foram utilizados 0,4U da enzima *MboII* (New England Biolabs - Beverly, MA - USA) e seu tampão correspondente (NEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9). A reação foi mantida a uma temperatura de 37°C por 16 horas para uma digestão completa e inativada a 65°C por 20 minutos com posterior visualização em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata 0,2% (conforme protocolo estabelecido pelo laboratório do Grupo de Epigenética e Reprodução do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).

3.5. Ensaio de Metilação Alelo Específica

Para verificar a presença de metilação em resíduos de citosina de motivos CpG para o polimorfismo *CYP21* - RFLP/*HpaII*, amostras de DNA genômico (100ng por reação) de animais heterozigotos foram digeridos com a enzima de restrição *HpaII* (uma endonuclease sensível à metilação) e um outro *set* de amostras de animais heterozigotos foi digerida com a enzima *MspI* (não sensível a metilação) considerada isosquizômero da enzima *HpaII*. As amostras foram digeridas a partir do DNA genômico (sem amplificação). O controle não digerido e as digestões das amostras com *HpaII* e *MspI* foram amplificadas com os iniciadores específicos para a região do polimorfismo do elemento Bov-A2 presente na região promotora do gene *CYP21* bovino. Os produtos de PCR foram submetidos a uma segunda etapa de digestão com a enzima *HpaII* para verificar o *status* de metilação do alelo "C" no sítio polimórfico específico do gene *CYP21* bovino.

3.6. Análises *in silico*

Para a investigação dos SNPs presentes em regiões não codificadoras realizou-se análises utilizando-se ferramentas de bioinformática no intuito de obter informações complementares a respeito do efeito das substituições alélicas.

3.6.1. BLAST

O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) encontra regiões de similaridade local entre sequências além de comparar sequências de nucleotídeos ou proteínas para sequências de um banco de dados calculando sua significância estatística dos alinhamentos. O BLAST pode ser usado para inferir relações funcionais e evolucionárias entre sequências bem como identificar membros de famílias gênicas intra e entre organismos (programa e banco de dados disponíveis em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para as análises *in silico* dos polimorfismos foi utilizada a quarta versão do genoma bovino (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/cow/>), que é considerada a mais recente.

3.6.2. mRNA

Numerosas sequências de mRNA com características regulatórias têm sido identificadas com um importante papel na regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. A ferramenta RegRNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw>) foi utilizada para identificar elementos regulatórios presentes dentro das sequências dos mRNAs onde se encontram os polimorfismos. Esse banco de dados possui sequências de mRNAs presentes em regiões 5' e 3' não traduzidas (5'UTR e 3'UTR). O objetivo do RegRNA é a anotação de *motifs* de RNAs regulatórios e

elementos potencialmente estruturais envolvidos na regulação pós-transcricional de genes (Huang et al., 2006).

3.6.3. miRNA

Uma ferramenta utilizada para identificar miRNAs é o MiRBase (<http://www.mirbase.org/>). O banco de dados do miRBase possui publicações de sequências e anotações de miRNAs recentes. Cada sequência de miRBase que entra no sistema de busca representa um *hairpin* previsto de uma transcrição miRNA (*mir*), com informações sobre a localização da sequência de miRNA maduro (*MIR*). Ambos *hairpin* e sequências maduras estão disponíveis para pesquisas e consultas, e as sequências também podem ser recuperadas por nome, palavra-chave, referências e anotações. Todas as sequências e anotações de dados também estão disponíveis. O banco de dados miRBase fornece uma série de informações para facilitar os estudos da genômica de miRNAs onde todos são mapeados para suas coordenadas genômicas onde são descritas sobreposições de sequências de miRNAs com transcrições anotadas, proteínas e miRNAs não-codificantes.

3.6.4. TF Search

As sequências com os perfis polimórficos foram submetidas ao banco de dados *TF Search* (*Searching Transcription Factor Binding Sites*) para analisar uma possível presença de sítios de ligação a fatores de transcrição. O programa para procura e informações está disponível no site <http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>. AliBaba2 é um programa para predição de sítios de ligação para fatores de transcrição em uma sequência de DNA desconhecida.

3.7. Procedimento estatístico

As frequências alélicas e genóticas foram estimadas para cada loco analisado (*IGF2*-RFLP/*Mbo*II e *CYP21*-RFLP/*Hpa*II) a partir dos resultados obtidos por PCR-RFLP por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos. Paralelamente o teste do χ^2 (qui-quadrado) foi associado às frequências genóticas para a obtenção do desvio e detecção do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) na população (Falconer e Mackay, 2001). Para comparar os valores observados com os esperados foi utilizado o teste do qui-quadrado, utilizando-se o software Microsoft Excel (Excel, 2007).

A associação dos haplótipos dos genes *IGF2* e *CYP21* com as características de crescimento e reprodução consideradas foram estimadas em 105 animais do total de 147 genotipados. A metodologia utilizada para a estimação dos efeitos médios dos genes foi a dos modelos mistos (BLUP - *Best Linear Unbiased Prediction*), a mesma normalmente utilizada nas avaliações genéticas dos rebanhos participantes do PMGRN (Boldman et al., 1993). A correção dos testes de hipóteses para múltiplas comparações foi conduzida através do método de Bonferroni, teste múltiplo de significância geralmente utilizado para o controle da taxa de erro no experimento (Bland e Altman, 1995). Em geral, o modelo de análise do PMGRN incluiu: efeito genético do animal; efeito genético materno e de ambiente permanente (P120 e P240); efeito permanente de ambiente (P120, P240, P365 e PE365); erro aleatório; efeito fixo de idade da vaca ao parto, em classes; grupo de contemporâneos. O efeito genético materno foi incluído apenas para os pesos aos 120 e 240 dias e o efeito materno de ambiente para os pesos aos 120, 240 e 365 dias e para o perímetro escrotal aos 365 dias. Os parâmetros genéticos necessários para realização das análises neste estudo foram também os mesmos utilizados nas avaliações genéticas do PMGRN/ANCP.

As DEPs consideradas nas análises do presente estudo foram relacionadas às características de peso aos 120 (P120), 240 (P240), 365 (P365), 455 (P455) e 550 (P550) dias de idade, perímetro escrotal aos 365 (PE365), 455 (PE455) e 550 (PE550) dias de idade e o efeito direto na idade ao primeiro parto (DIPP). As DEPs P120 e P240 representam a diferença

esperada na progênie para efeito direto no peso aos 120 e 240 dias de idade indicando a diferença em quilogramas esperados com relação à média da progênie, ou base genética de referência, devido aos genes para crescimento passados pelos seus pais. As DEPs P365, P455 e P550 indicam a diferença esperada na progênie para efeito direto no peso aos 365, 455 e 550 dias de idade e prediz a habilidade de um animal em transmitir genes para crescimento pós-desmame para estas características, onde o componente mais importante é o efeito genético direto. As DEPs relacionadas ao perímetro escrotal PE365, PE455 e PE550 fornecem a diferença esperada na progênie para efeito direto para o perímetro escrotal aos 365, 450 e 550 dias de idade e consideradas como preditores da habilidade do animal em transmitir genes para crescimento testicular à sua progênie; são características extremamente importantes na seleção de bovinos de corte, devido à correlação favorável que apresentam com a fertilidade e a precocidade sexual. A DEP para IPP é a diferença esperada na progênie para efeito direto na idade ao primeiro parto que prediz a habilidade de um animal em transmitir genes para idade ao primeiro parto à sua progênie influenciando diretamente a precocidade sexual e com consequências sobre a produtividade (Lôbo et al., 2010).

A metodologia dos modelos mistos possibilita a obtenção dos melhores preditores lineares não viciados (BLUP) das DEPs de cada animal para as características consideradas, onde todas as informações disponíveis (desempenho do animal, sua progênie e seus parentes) são consideradas.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação do polimorfismo RFLP/*Mbo*II no exon 6 do gene *IGF2*

4.1.1. Genotipagem

A partir dos iniciadores confeccionados e mostrados na tabela 2, foram obtidos fragmentos de 193 pares de base posteriormente digeridos com a enzima de restrição *Mbo*II para clivagem do sítio polimórfico C/T. O método de PCR-RFLP foi utilizado para identificação da variação alélica entre os animais estudados através de digestão enzimática. O polimorfismo identificado está mapeado na região 5' não traduzida no exon 6 do gene *IGF2* bovino, o qual apresenta 10 exons, sendo que os exons 8, 9 e parte do 10 são codificantes para a proteína *IGF2* bovina (Figura 5). Foram identificados três perfis distintos que mostra uma clara separação dos três diferentes genótipos representados pelos alelos CC, TT e CT (Figura 6) no total de animais genotipados.

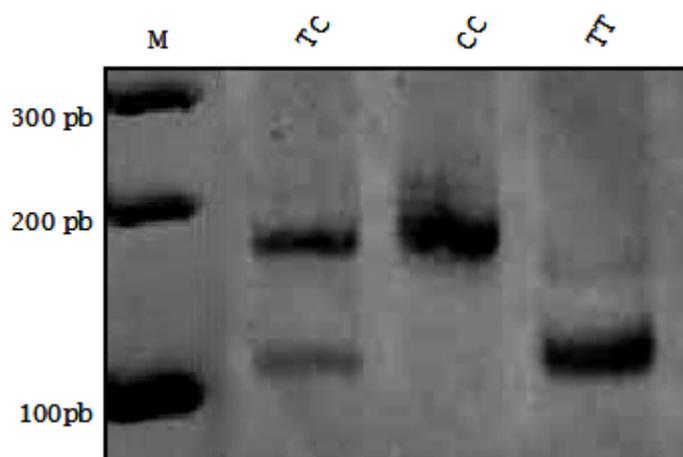


Figura 6. Perfil do polimorfismo RFLP/*Mbo*II encontrado no exon 6 do gene *IGF2* bovino observado na digestão com a enzima *Mbo*II. M: marcador molecular de 100 pares de base.

4.1.2. Frequências alélica e genotípica

A partir da genotipagem em 270 animais foram feitas análises das frequências alélica e genotípica nas amostras (Tabela 3). Os heterozigotos TC possuem a alteração C para T em apenas um alelo. Os animais com o alelo T possuem alteração na sequência original do gene *IGF2* bovino (depositada no banco de dados sob número de acesso GenBank AY971631).

Ainda na tabela 3 verifica-se que os animais da raça Gir apresentaram uma predominância do alelo T no genótipo da maioria das amostras analisadas. Os homozigotos CC com alteração nucleotídica para os dois alelos foram menos frequentes (CC=0,0758) em comparação com os homozigotos TT (TT=0,4545).

Tabela 3 - Frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*MboII* em bovinos das raça Gir, Guzerá e Nelore (N = número de animais genotipados).

Raças	N	Frequência alélica		Frequência genotípica			Qui quadrado (χ^2)*
		C	T	CC	TT	TC	
Gir	66	0,3106	0,6894	0,0758	0,4545	0,4697	0,6179 ^{NS}
Guzerá	29	0,4655	0,5345	0,1724	0,2414	0,5862	0,9190 ^{NS}
Nelore	175	0,4914	0,5086	0,2400	0,2571	0,5029	0,0063 ^{NS}
Total	270	0,4444	0,5555	0,1926	0,3037	0,5037	0,1080 ^{NS}

* teste $\chi^2 = 1$ G.L.
^{NS}P>0,05

O teste do qui-quadrado demonstrou que não houve diferença significativa ($\chi^2=0,6179$; P<0,05) entre as frequências analisadas do polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*MboII* e número de animais da raça Gir da amostra estudada, indicando que os mesmos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo estudado.

A tabela 3 também mostra que o genótipo TC apresentou uma representatividade de mais de 50% de frequência (TC= 0,5862) nos animais da raça Guzerá, enquanto que os homozigotos CC e TT apresentaram valores de 0,1724 e 0,2414, respectivamente. O alelo T foi predominante em comparação com o alelo C em todos os animais da raça Guzerá genotipados. Os genótipos para este polimorfismo também encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg com $\chi^2=0,9190$ com 1 grau de liberdade e probabilidade 5%.

Com relação aos animais da raça Nelore, mostradas ainda na tabela 3, o número de amostras genotipadas foi mais elevado que as raças Gir e Guzerá (N=175 animais) visto que incluiu animais jovens pertencentes a um Projeto de Teste de Progênie. As frequências genotípicas obtidas destaca a heterozigozidade em 50% dos animais genotipados. Os animais homozigotos apresentaram equilíbrio alélico (praticamente o mesmo valor para porcentagem do alelo C e do alelo T). A distribuição dos alelos encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg sem diferença significativa para o teste de qui-quadrado $\chi^2=0,0063$ com P<0,05.

A população total dos animais genotipados com o polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II apresenta-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg segundo o teste de qui-quadrado ($\chi^2=0,1080$; $P<0,05$) evidenciando que não houve diferença estatisticamente significativa na população. Foi observado que a frequência genotípica de heterozigotos TC (0,5037) foi superior em comparação aos homozigotos CC (0,1926) e TT (0,3037) para o total de animais analisados. O alelo T foi detectado com maior frequência (0,5555) nas mesmas amostras em relação ao alelo C (0,4444) (Tabela 3).

A figura 7 mostra os valores das frequências dos alelos C e T destacando o alelo T (com a alteração nucleotídica C por T na sequência original) como mais frequente na população estudada.

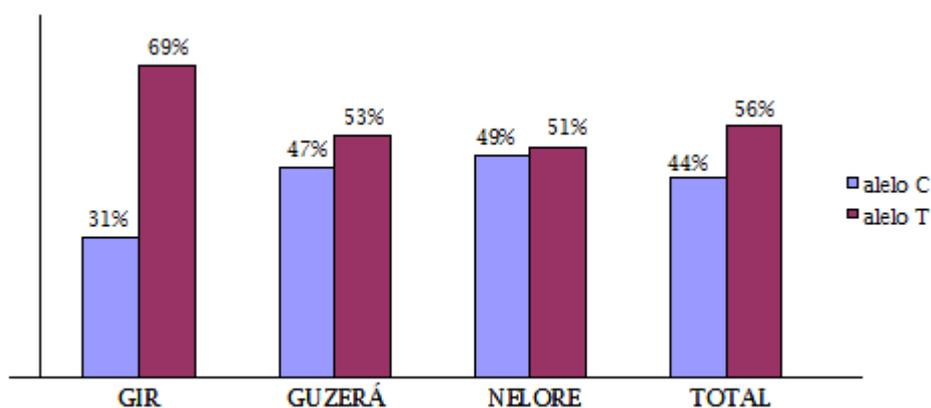


Figura 7. Histograma com a porcentagem da frequência dos alelos C e T nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II.

Na figura 8 observa-se que o grupo de animais da raça Gir apresentou menor índice de animais homozigotos CC sem a alteração C/T (frequência de 0,0758) em comparação com as outras raças (Guzerá - 0,1724 e Nelore - 0,2400) apresentando uma predominância de animais que possuem alteração C/T do polimorfismo RFLP/*Mbo*II em pelo menos um dos alelos.

A raça Nelore, em maior número, também apresentou elevada frequência de heterozigotos TC (0,5029) ressaltando o alelo T com frequência de 0,5086 (Tabela 3). É evidente a grande incidência de animais heterozigotos (TC) nas análises, porém com predominância do alelo T (com a alteração nucleotídica C/T) entre os animais genotipados.

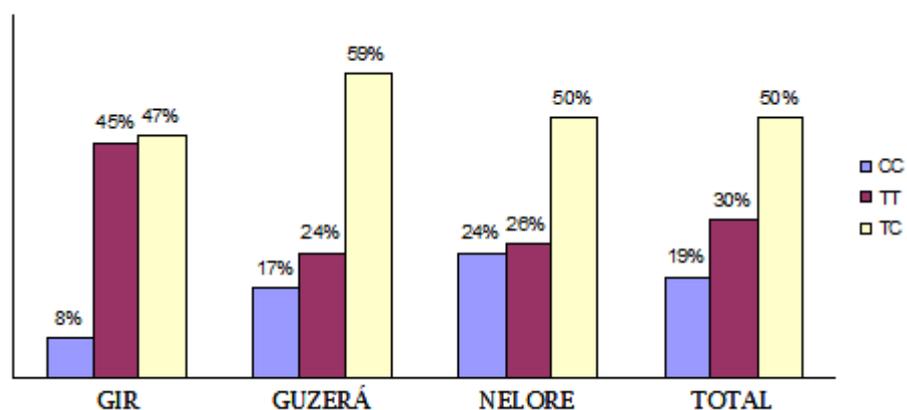


Figura 8. Histograma com a percentagem da frequência genotípica (CC, TT e TC) nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II.

4.1.3. Análises *in silico*

4.1.3.1. BLAST

A sequência do fragmento contendo o sítio polimórfico (com a base Citosina) presente no exon 6 do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II foi submetida ao banco de dados do genoma bovino para a procura de identidade de sequência.

A região que compreende o sítio polimórfico localiza-se na coordenada 85 do fragmento de 193 pares de base abrangendo as sequências reconhecidas pelo BLAST mostrados na figura 9. O cromossomo 29 bovino (com tamanho de 52.000.000 pares de base) apresenta a sequência polimórfica com 100% de identidade localizada nas coordenadas 51.268.103 a 51.268.295.

 cromossomo 29	Identidade 100% (e-value: 5 e-79) Coordenada: 3.628.167-3.628.359
 cromossomo 13	Identidade 87% (e-value: 0,001) Coordenada: 360.564-360.602
 cromossomo 20	Identidade 88% (e-value: 0,001) Coordenada: 1.017.044-1.017.010 Identidade 86% (e-value: 0,001) Coordenada: 1.017.010-1.017.424

Figura 9. Sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II (193 pares de base) contra o banco de dados de sequências do genoma bovino.

Além da sequência original, presente no exon 6 do locus do gene *IGF2* bovino, parte do fragmento contendo o sítio polimórfico (com a base Citosina) apresentou identidade com outras três regiões do genoma bovino (Figura 9), porém em regiões codificantes. O e-value da análise foi de 0,001 para o resultado do BLAST devido à ausência de *gaps* no alinhamento das sequências. A sequência que apresentou 86% de identidade com a sequência original, presente no exon 6 do locus do gene *IGF2* bovino apresentou 4 *gaps* enquanto que a sequência que apresentou 88% de identidade não apresentou nenhum *gap*. A sequência que representa o fragmento amplificado com a base Timina no sítio polimórfico foi submetido ao banco de dados do genoma bovino, mas não apresentou similaridade com nenhuma outra sequência além da original presente no exon 6 do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II. O fragmento contendo o polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II está nas coordenadas 3.628.167-3.628.359 do cromossomo 29 bovino. Em humanos a sequência com identidade aproximadamente 90% foi localizada no cromossomo 11 (Tabela 4).

Tabela 4 - Identidade da sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II (193 pares de base) encontradas em diferentes organismos.

Organismo	Coordenadas no cromossomo (pb)	Cromossomo/ Tamanho (pb)	Identidade (%)	e-value
Bovinos	3.628.167-3.628.359	29/52.000.000	100%	5e-79
Suínos	111.493-111.531	4/112.000	87%	4e-04
Humanos	2.099.838-2.099.650	11/135.000.000	94%	2e-76

A sequência do polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II bovino encontrou 87% de identidade com 38 nucleotídeos para o cromossomo 4 em suínos (*Sus Scrofa*) com nucleotídeos em comum para uma proteína relacionada a supressão de tumorigênese. O genoma suíno possui 18 cromossomos e o gene *IGF2* está localizado no cromossomo 7 onde não foi verificada identidade com a sequência do polimorfismo do gene *IGF2* - RFLP/*Mbo*II bovino.

4.1.3.2. mRNA

A sequência com o fragmento polimórfico foi submetida à análise pela ferramenta RegRNA para identificação de possíveis elementos associados a regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. As sequências foram analisadas através do servidor da web (RegRNA) disponível no sítio <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw>. Esse banco de dados possui sequências de mRNAs presentes em regiões 5' e 3' não traduzidas (5'UTR e 3'UTR). O objetivo do RegRNA é a anotação de *motifs* de RNAs regulatórios e elementos potencialmente estruturais envolvidos na regulação pós-transcricional (Huang et al., 2006). O sítio polimórfico com alteração nucleotídica Citosina por Timina na posição 85 interior ao fragmento de 193 pares de base apresentou parte de sua sequência em comum com um motivo exônico (R0950) em uma sequência alvo de mRNA maduro (Figura 10).



Figura 10. Representação gráfica da análise gerada pelo site (<http://regna.mbc.nctu.edu.tw>) com seis nucleotídeos em comum para o motivo exônico R0950.

4.1.3.3. miRNA

A figura 11 mostra as sequências amplificadas com o sítio polimórfico no exon 6 do gene *IGF2* bovino, *IGF2* - RFLP/*Mbo*II (com 193 pares de base) submetidas ao banco de dados de miRNAs (<http://www.mirbase.org/>). A sequência original (GenBank AY971631) com o sítio polimórfico para a enzima *Mbo*II, porém, sem a alteração Citosina por Timina revelou identidade com sete nucleotídeos pertencentes a um miRNA bovino nomeado bta-miR 423-5p (Figura 11). A figura 11 também mostra doze nucleotídeos da sequência com a alteração nucleotídica C por T, na mesma posição (Tabela 5) em comum com miRNA bta-miR-328 em bovinos. As coordenadas de cada sequência com o miRNA bovino estão mostrados na tabela 6. Os resultados sugerem uma possível alteração na interação miRNA e *IGF2*.

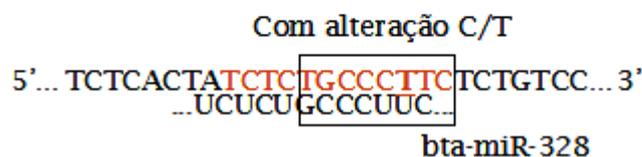
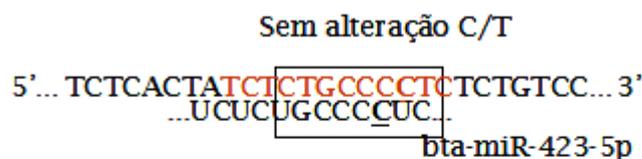


Figura 11. Identidade das seqüências com os sítios polimórficos no exon 6 do gene *IGF2* bovino (RFLP/*Mbo*II) contra o banco de dados de microRNAs (<http://www.mirbase.org/>).

Tabela 5 - Coordenadas nas seqüências amplificadas do polimorfismo *IGF2*-RFLP/*Mbo*II (cromossomo 29) e nos miRNAs correspondentes.

miRNA	Posição RFLP/ <i>Mbo</i> II	Pares de base RFLP/ <i>Mbo</i> II	Posição miRNA	Pares de base miRNA/cromossomo
bta-miR-423-5p	128-139			
	sem C/T	193	2-13	94/19
bta-miR-328	128-139			
	com C/T	193	8-19	92/18

A tabela 5 mostra que o microRNA bta-miR 423-5p (acesso GenBank: NR_030961) com 94 pares de base está localizado no cromossomo 19 bovino em um total de 30 miRNAs presentes no cromossomo, enquanto que o sítio polimórfico RFLP/*Mbo*II está no exon 6 do gene *IGF2* no cromossomo 29 bovino. O cromossomo 29 possui 11 miRNAs identificados no banco de dados de miRNAs mas nenhum deles tem nucleotídeos em comum com o sítio polimórfico no gene *IGF2*-RFLP/*Mbo*II. Do total de 20 miRNAs encontrados no cromossomo 18 bovino, o microRNA bta-miR-328 (número de acesso no GenBank: NR_031133) com 92 pares de base identificou-se com doze nucleotídeos do polimorfismo *IGF2* - RFLP/*Mbo*II com a alteração

nucleotídica C por T, na mesma posição (Tabela 5). Além dos dois miRNAs identificados no genoma bovino, outros dez miRNAs tiveram 12 nucleotídeos em comum com as sequências porém em outros organismos.

4.1.3.4. TFsearch

As sequências contendo o sítio polimórfico foram submetidas a um banco de dados na procura por similaridade com fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica (*TF Search*) e disponível no site www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2.1.

O fragmento amplificado de 193 pares de base com a base C no sítio polimórfico apresentou 28 segmentos identificados como potenciais sítios de ligação. Uma sequência de seis nucleotídeos em comum, incluindo o sítio polimórfico, foi encontrada para um sítio de ligação Sp1 de fator de transcrição (Figura 12). A sequência com a base T no sítio polimórfico apresentou 26 segmentos identificados como potenciais sítios de ligação, porém nenhum em comum com o nucleotídeo do sítio polimórfico (Figura 12).

Alelo“C”
...CTCTGTCTCTCTCACTATCTCTGCCCCCTCTCTGTCCTTGATAACAACAGCTGACCTCATT...

Alelo“T”
...CTCTGTCTCTCTCACTATCTCTGCCCTCTCTGTCCTTGATAACAACAGCTGACCTCATT...

Figura 12. Representação esquemática do SNP sobrepondo uma região de fator de transcrição Sp1 (caixa aberta) apenas na sequência com o nucleotídeo Citosina no sítio polimórfico. (www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2)

4.2. Identificação do polimorfismo RFLP/*Hpa*II no elemento Bov-A2 da região promotora do gene *CYP21*

4.2.1. Genotipagem

O fragmento de 352 pares de base que compreende uma porção da região promotora do gene *CYP21* bovino (Figura 11), foi amplificado com iniciadores específicos (Tabela 2) e digeridos com a enzima de restrição *Hpa*II através da técnica de RFLP (Figura 13).

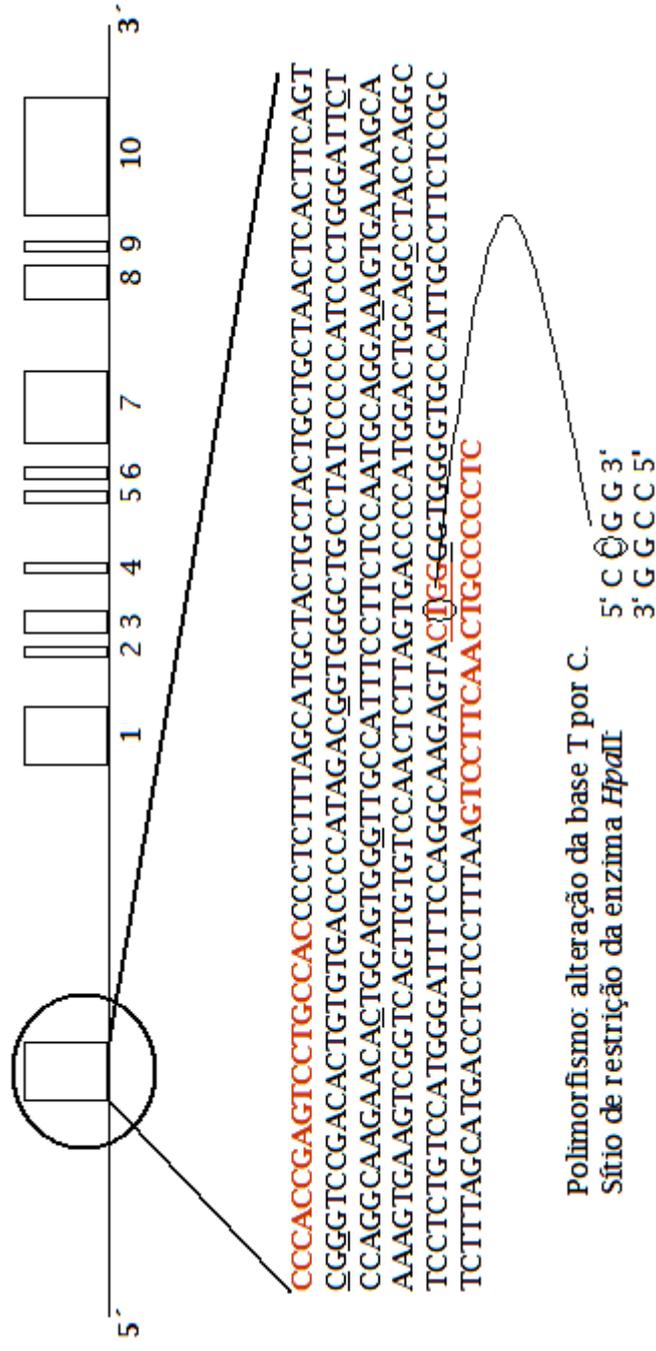


Figura 13. Representação esquemática da localização da localização do gene *CYP21* bovino (número de acesso no GenBank: M11267) [Chung et al., (1986) modificado]. A caixa com círculo mostra o fragmento de 352 pares de base localizado na região promotora e as caixas numeradas representam os exons de 1 a 10. Os iniciadores utilizados e o sítio polimórfico estão representados em vermelho, com destaque sublinhado para a troca nucleotídica T por C.

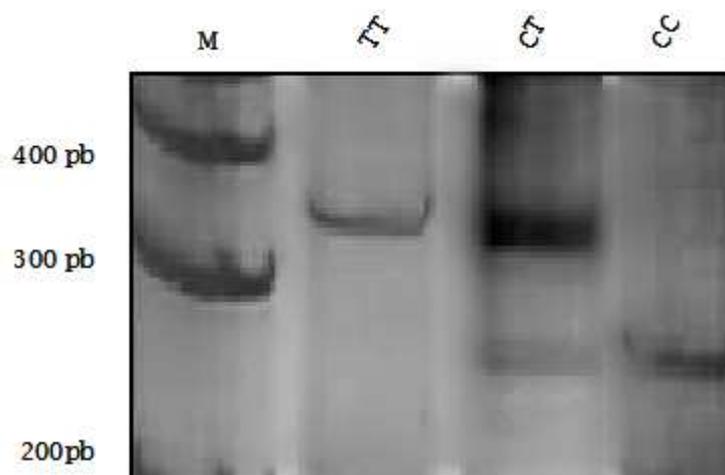


Figura 14. Perfil do polimorfismo RFLP/*HpaII* encontrado no gene *CYP21* bovino observado após digestão com a enzima *HpaII*. M: marcador molecular de 100 pares de base.

4.2.2. Frequências alélica e genotípica

As frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII* foram calculadas a partir da genotipagem de 280 animais das raças Gir, Guzerá e Nelore. Os homozigotos CC possuem alteração nucleotídica de T por C nos dois alelos apresentados (a sequência original depositada no GenBank sob número de acesso M11267 apresenta a base T no sítio polimórfico).

A tabela 6 mostra a alta incidência do alelo T no genótipo dos animais da raça Gir genotipados destacando os homozigotos TT com uma frequência de 0,6818. A frequência genotípica do polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII* associado com o número de animais da raça Gir da amostra estudada não apresentou diferença significativa através do teste do qui-quadrado ($\chi^2=1,7134$; $P<0,05$ com um grau de liberdade) indicando que os animais genotipados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII* em bovinos da raça Gir, Guzerá e Nelore (N = número de animais genotipados).

Raças	N	Frequência alélica		Frequência genotípica			Qui quadrado (χ^2)*
		T	C	TT	CC	CT	
Gir	66	0,8106	0,1894	0,6818	0,0606	0,2576	1,7134 ^{NS}
Guzerá	44	0,7045	0,2955	0,5000	0,0909	0,4090	0,0132 ^{NS}
Nelore	175	0,8914	0,1086	0,7886	0,0057	0,2057	0,6891 ^{NS}
Total	285	0,8439	0,1561	0,7193	0,0316	0,2491	0,8508 ^{NS}

* teste χ^2 = 1 G.L.

**P>0,05

A alta incidência do alelo T também foi mantido nas amostras de animais da raça Guzerá analisadas (Tabela 6) onde houve o equilíbrio de Hardy-Weiberg com o teste de qui-quadrado (χ^2) igual a 0,0132 a P<0,05 com um grau de liberdade.

A tabela 6 também mostra que o genótipo TT foi predominante em mais de 70% dos animais da raça Nelore genotipados. A população se encontrou em equilíbrio e não apresentou significância ao nível de 5% no teste de qui-quadrado ($\chi^2=0,6891$; P<0,05).

Os resultados para as frequências alélicas de C e T em todos os animais genotipados estão sumarizados na Tabela 6 representados na figura 15 o que confirma a alta ocorrência do alelo T (0,8439) em todos os animais das raças zebuínas analisadas. O alelo T corresponde a sequência sem a alteração T/C do polimorfismo RFLP/*HpaII*. As frequências genotípicas revelaram uma alta percentagem de homozigotos (TT) para todas as raças estudadas enquanto que homozigotos que apresentaram a alteração T/C nos dois alelos não teve predominância (CC= 0,0316).

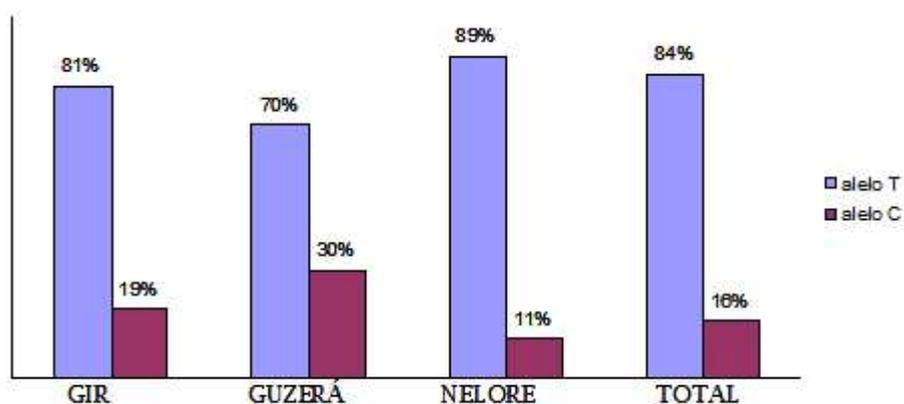


Figura 15. Histograma com a percentagem da frequência dos alelos T e C nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII*.

A figura 16 representa a percentagem dos genótipos na população bovina estudada com destaque para os homozigotos TT.

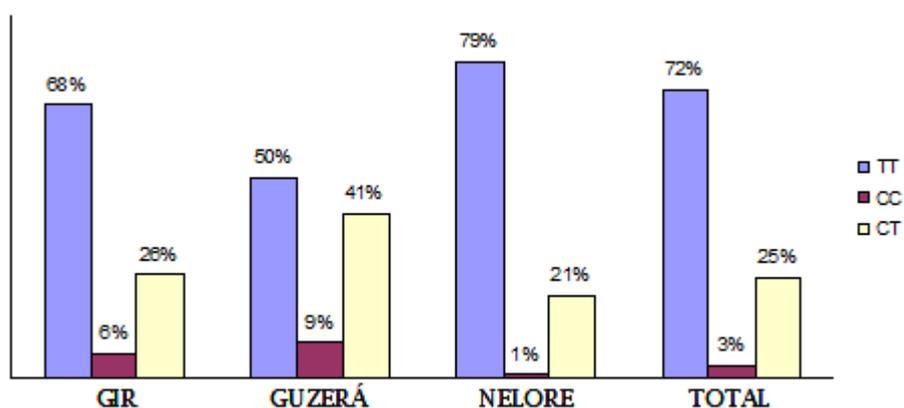


Figura 16. Histograma com a percentagem da frequência genotípica (TT,CC e CT) nas raças genotipadas com o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII*.

4.2.3. Ensaio de Metilação Alelo Específica

O Ensaio de Metilação Alelo Específica (Figura 17) demonstrou a metilação no resíduo de citosina do motivo CpG no alelo que possui a sequência com alteração da base Timina por Citosina no sítio polimórfico. As amostras de DNA genômico dos animais previamente identificados como heterozigotos foram submetidas a uma digestão com as enzimas de restrição *HpaII* e *MspI*. A seguir as amostras foram conduzidas a uma reação de PCR com os iniciadores específicos de modo a obter o fragmento de 352 pares de base. Esse fragmento foi digerido com a enzima de restrição *HpaII* para reconhecimento do sítio polimórfico (Figura 18).

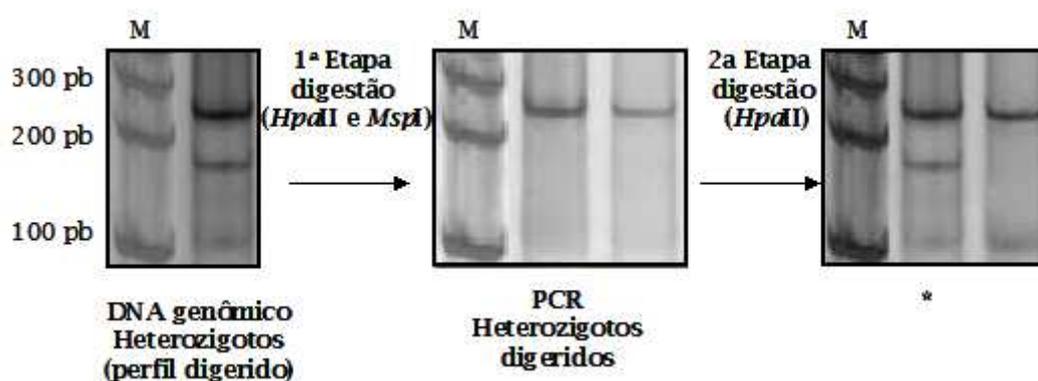


Figura 17. Ensaio de Metilação Alelo Específica com a detecção da metilação (*). M: marcador molecular de 100 pares de base.

Os animais heterozigotos genotipados das raças Gir, Guzerá e Nelore foram submetidos ao ensaio de Metilação Alelo Específica confirmando a metilação no sítio polimórfico com resíduo de Citosina (Figura 18).

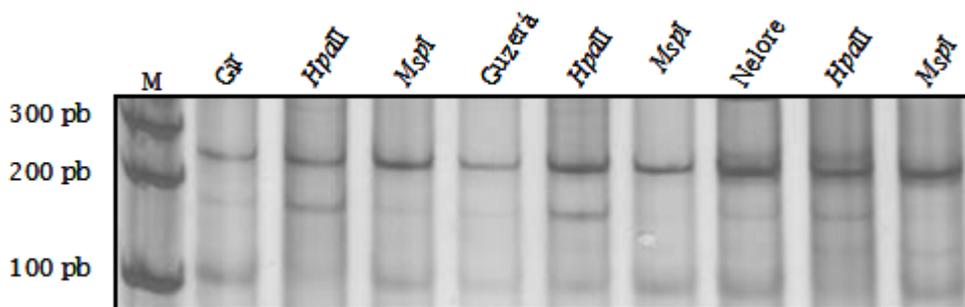


Figura 18. Ensaio de Metilação Alelo Específica em animais heterozigotos nas três raças zebuínas Gir, Nelore e Guzerá. M: marcador molecular de 100 pares de base.

A endonuclease de restrição *HpaII* tem a mesma sequência de reconhecimento que a enzima de restrição *MspI* (não sensível a metilação), consideradas portanto isosquisômeras. A digestão com a enzima de restrição *HpaII*, considerada uma endonuclease sensível à metilação, revelou dois fragmentos enquanto que a enzima *MspI* (não sensível a metilação) apresentou apenas um fragmento, confirmando que existe metilação no alelo com a base Citosina no sítio polimórfico. As amostras utilizadas no experimento foram anteriormente identificadas como originadas de animais heterozigotos, ou seja, um alelo com a base Timina e outro alelo com a base Citosina no sítio polimórfico.

4.2.4. Análises *in silico*

4.2.4.1. BLAST

O fragmento de 352 pares de base contendo o sítio polimórfico (com a base Timina) presente na região promotora do gene *CYP21* - RFLP/*HpaII* foi submetido ao banco de dados do genoma bovino para a procura de identidade na sequência. O BLAST reconheceu inúmeras

sequências com 99 a 70% de identidade devido à região com o sítio polimórfico ser considerada um elemento com características de sequências repetitivas (Tabela 8). O sítio polimórfico presente no fragmento amplificado da região promotora do gene *CYP21* está localizado na coordenada 282 da sequência de 352 pares de base. A tabela 8 mostra apenas as sequências que apresentaram identidade no cromossomo 23, geralmente com identidade para fragmentos de sequências relacionados a proteínas transportadoras e transcritos relacionados a fatores inflamatórios. Os valores de e-value correspondentes variam de acordo com as *gaps* dentro das sequências. Várias outras sequências com identidade para o sítio polimórfico foram encontradas ao longo do genoma, exceto nos cromossomos 17, 24, 29, Y e DNA mitocondrial bovino (Figura 19).

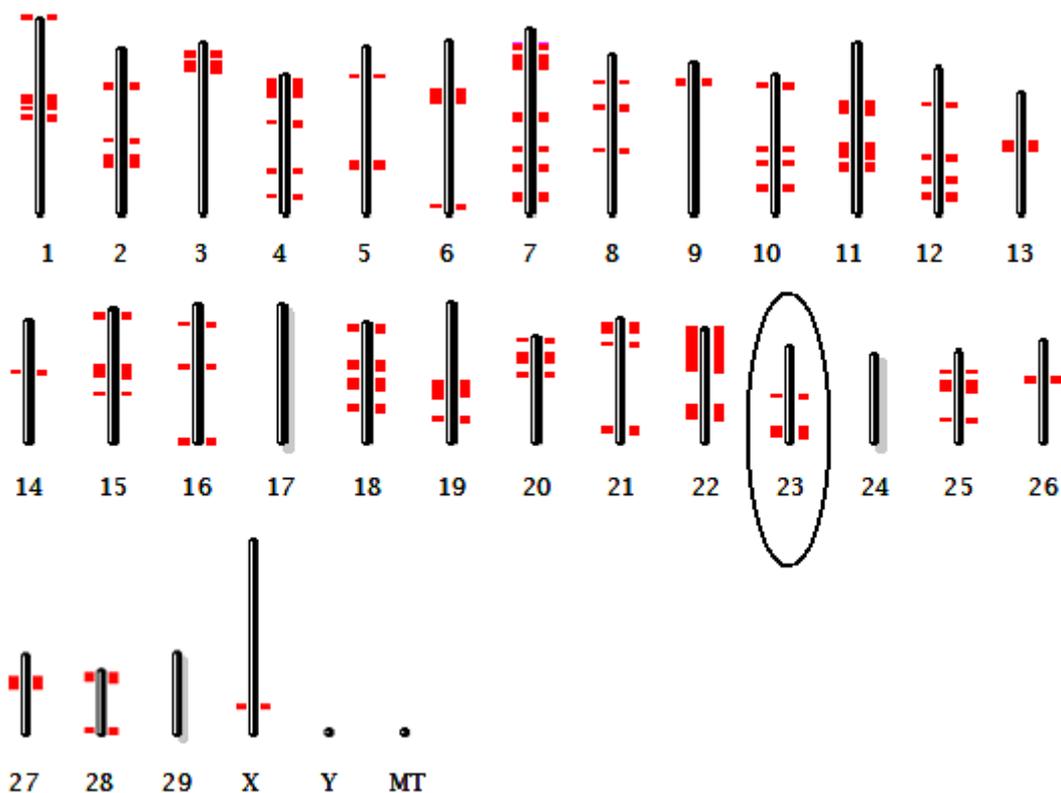


Figura 19. Localização das repetições (em vermelho) a partir da sequência de 352 pares de base do elemento encontrado na região promotora do gene *CYP21* no cromossomo 23 (em círculo) no genoma bovino. Figura gerada e modificada http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9913&RID=V13KWFPX016&CLIENT=web&QUERY_NUMBER=1).

A sequência do fragmento com a base Citosina no sítio polimórfico também foi submetida ao banco de dados do genoma bovino apresentando vários nucleotídeos em comum em diferentes regiões.

O fragmento contendo o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*Hpa*II com a base Timina no sítio polimórfico está nas coordenadas 497.030 a 497.327 do cromossomo 23 bovino que contem 2.312.061 pares de base (Tabela 7).

Tabela 7 - Identidade da sequência do fragmento amplificado com o polimorfismo no gene *CYP21* - RFLP/*Hpa*II (352 pares de base) encontradas em diferentes organismos.

Organismo	Coordenadas no cromossomo(pb)	Cromossomo/ Tamanho (pb)	Identidade (%)	e-value
Bovinos	113.287-112.988	23/ 2.312.061	100%	3e-180
Suínos	111.493-111.531	4/112.000	87%	0.010
Humanos	1.800-2.073	6/171.000	88%	3e-97

4.1.3.2. mRNA

A sequência com o fragmento polimórfico é considerada um elemento SINE e, portanto, dispersa pelo genoma. A sequência foi submetida a um banco de dados de sequências de mRNA com características regulatórias para identificar uma possível relação na regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. As sequências (com os dois perfis polimórficos) foram analisadas através do servidor da web (RegRNA) disponível no sítio <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw> que possui um banco de dados de sequências de mRNAs presentes em regiões 5' e 3' não traduzidas (5'UTR e 3'UTR). O objetivo do RegRNA é a anotação de motivos de

RNAs regulatórios e elementos potencialmente estruturais envolvidos na regulação pós-transcricional (Huang et al., 2006).

As sequências com os dois perfis polimórficos tiveram similaridade com vários motivos exônicos (R0952, R0960, R0971, R0987 e R1033) em uma sequência alvo de mRNA maduro (Figura 20).

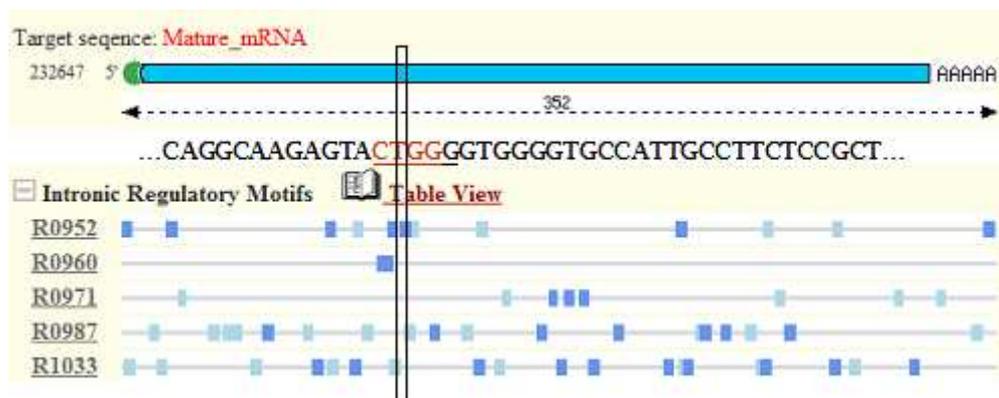


Figura 20. Representação gráfica da análise gerada pelo site (<http://regna.mbc.nctu.edu.tw>)

Os dois perfis polimórficos não tiveram nenhum motivo diferente, o que justifica que o sítio polimórfico não influenciou na similaridade pelas sequências regulatórias encontradas.

4.1.3.3. miRNA

As sequências amplificadas com os dois perfis polimórficos localizados na região promotora do gene *CYP21* bovino - RFLP/*HpaII* (com 352 pares de base) foram submetidas ao banco de dados de miRNAs (<http://www.mirbase.org/>). Os resultados gerados revelaram que nenhuma sequência com o fragmento polimórfico (localizado na coordenada 282) apresentou similaridade com miRNAs.

4.1.3.4. TF Search

As sequências polimórficas foram submetidas a um banco de dados para fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica (*TF Search* -www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2.1).

As sequências com o sítio polimórfico apresentaram 35 segmentos identificados como potenciais sítios de ligação. Um sítio de ligação Sp1 de fator de transcrição apresentou identidade com nove nucleotídeos incluindo o sítio polimórfico (Figura 21).

Alelo "T"
...TTTCCAGGCAAGAGTACTGGAGTGGGGTGGCCATTGCCTTCTCCGCCTTTAGCATGACCTCTCCTTTAAGTCC...

Alelo "C"
...TTTCCAGGCAAGAGTACC_GGAGTGGGGTGGCCATTGCCTTCTCCGCTCTTTAGCATGACCCTCCTTTAAGTCC...

Figura 21. Representação esquemática do SNP sobrepondo nove nucleotídeos com um fator de transcrição Sp1 (caixa aberta) nas sequências dos sítios polimórficos para os alelos com as bases Timina e Citosina. (Dados gerados através do site www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2.1).

4.3. Análise da Associação genótipo-fenótipo dos polimorfismos (*IGF2* - RFLP/*MboII* e *CYP21* - RFLP/*HpaII*) nos animais da raça Nelore

Do total de 175 animais da raça Nelore genotipados, um grupo de 105 touros participantes do Teste de Touros Jovens do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN/ANCP) foi submetido à análise estatística para verificar a possível associação genótipo-fenótipo. O cálculo da probabilidade de cada animal ter recebido do pai o alelo menos frequente para cada locus baseado nos genótipos dos touros analisados e nas frequências alélicas estimadas na população nos foi possível devido os animais possuírem registro com informações de seus desempenhos produtivos e reprodutivos. A principal finalidade da análise foi verificar a possível associação dos polimorfismos detectados (genótipo) com o fenótipo dos animais representado pelas DEPs (Diferenças Esperadas na Progenie) estimadas pelo PMGRN.

As DEPs representam metade do valor genético de cada pai, para determinada característica, e são usadas para comparar o mérito genético dos animais na predição do desempenho futuro dos seus descendentes, são expressas na unidade da característica (ex: kg para peso, cm para perímetro escrotal e meses para idade ao primeiro parto), com sinal positivo ou negativo. De outra forma ela prediz o mérito genético médio dos gametas passados de pai para filho e, embora possua o cálculo complexo, a DEP é de fácil interpretação pelos produtores (Paneto et al., 2009; Lôbo et al., 2009; Lôbo et al., 2010).

Nas análises foram realizadas utilizando os registros de produção de todos os filhos dos touros genotipados assim como dos outros animais que compartilharam o grupo contemporâneo com pelo menos um dos filhos destes touros. Os cálculos para a estimação dos efeitos médios da substituição alélica foram obtidos por meio da metodologia dos modelos mistos, a mesma normalmente utilizada nas avaliações genéticas dos rebanhos participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN/ANCP). No presente estudo, foi acrescido o efeito da probabilidade do animal ter recebido do pai o alelo

menos frequente de cada locus. O programa usa a metodologia dos modelos mistos com propriedade do melhor preditor linear não viciado (BLUP) sob modelo animal e analisado com o software CTAG e MTDFREM.

A tabela 8 verifica-se a associação do genótipo representado pelo polimorfismo *IGF2* RFLP/*MboII* com os valores das DEPs das características consideradas dos touros jovens analisados.

A característica de peso representada pela DEP P550 foi a única que apresentou significância (3%) segundo o teste de Bonferroni. Conforme a coluna do efeito médio de substituição do alelo, cada animal que recebeu o alelo C (menos frequente na população) tem a tendência do aumento em 8 kg na sua progênie.

Tabela 8 - Efeito médio do alelo C (menos frequente na população), erro padrão, teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni estimados para as características analisadas para o (polimorfismo *IGF2* RFLP/*MboII*).

Características	Efeito Médio	Erro padrão	T	P<t	Bonferroni
PE365 ^a	0,0150	0,1595	0,0939	0,4626	1,00
PE455 ^a	0,1998	0,2193	0,9107	0,1812	1,00
PE550 ^a	0,2655	0,3391	0,7831	0,2168	1,00
IPP	-0,1317	0,4075	0,3231	0,3733	1,00
P120 ^b	0,8737	0,8239	1,0604	0,1445	1,00
P240 ^b	1,0407	1,3248	0,7856	0,2161	1,00
P365 ^b	4,0209	1,5532	2,5888	0,0048	0,09
P450 ^b	4,1152	1,7448	2,3586	0,0092	0,17
P550 ^b	8,0494	2,7076	2,9729	0,0015	*0,03

*teste significativo; P<0,05

^a cm

^b kg

A tabela 9 mostra a associação do genótipo apresentado pelo polimorfismo *CYP21* RFLP/*HpaII* com os dados fenotípicos da mesma população de touros jovens analisada no polimorfismo anterior.

Tabela 9 - Efeito médio do alelo C (menos frequente na população), erro padrão, teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni estimados para as características analisadas para o (polimorfismo *CYP21* RFLP/*HpaII*).

Características	Efeito Médio	Erro padrão	t	P<t	Bonferroni
PE365 ^a	-0,5176	0,3503	1,4776	0,0698	1,00
PE455 ^a	-1,0509	0,4621	2,2744	0,0115	0,21
PE550 ^a	-0,3461	0,6939	0,4988	0,3090	1,00
IPP	0,3675	0,9651	0,3808	0,3517	1,00
P120 ^b	-1,2296	1,7803	0,6907	0,2449	1,00
P240 ^b	-5,1653	2,8369	1,8208	0,0343	0,62
P365 ^b	-7,1020	3,4171	2,0784	0,0188	0,34
P450 ^b	-10,2908	3,7347	2,7555	0,0029	*0,05
P550 ^b	-5,4879	6,0385	0,9088	0,1817	1,00

*teste significativo; P<0,05

^a cm

^b kg

O teste de Bonferroni apresentou significância (5%) para a característica de peso representada pela DEP P450 na incidência do alelo menos frequente. Conforme a coluna do efeito médio de substituição alélica, cada animal que recebeu o alelo C (menos frequente na população) reduziria em média 10,2 kg na sua progênie.

Na tabela 10 podem ser observadas as médias das características analisadas de acordo com número de animais representados por cada genótipo correspondente aos polimorfismos IGF2 - RFLP/*MboII* e *CYP21* - RFLP/*HpaII*.

Tabela 10 – Médias das características analisadas de acordo com número de animais (entre parênteses) representadas por cada genótipo correspondente aos polimorfismos *IGF2* – RFLP/*MboII* e *CYP21* – RFLP/*HpaII*.

Características	N total	<i>IGF2</i> – RFLP/ <i>MboII</i>				<i>CYP21</i> – RFLP/ <i>HpaII</i>			
		Média Geral	CC	TT	TC	TT	CC	CT	CT
P120 ^a	199.207	126,5	127,29 (6.039)	131,2 (1.896)	127,9 (15.715)	127,9 (23.230)	129,9 (74)	132,7 (346)	
P240 ^a	152.859	183,9	184,03 (4.448)	192,1 (1.454)	186,2 (12.630)	186,1 (18.181)	179,0 (27)	191,6 (324)	
P365 ^a	132.444	236,0	35,73 (3.452)	241,6 (1.122)	41,1 (10.647)	240,0 (14.913)	214,7 (19)	235,0 (289)	
P450 ^a	111.205	272,8	270,99 (2.893)	279,6 (947)	279,2 (9.205)	277,6 (12.751)	245,8 (19)	270,4 (275)	
P550 ^a	61.908	317,7	314,34 (1.945)	323,9 (544)	322,3 (5.810)	321,0 (8.119)	325,4 (7)	300,4 (173)	
PE365 ^b	45.973	20,1	19,68 (1.053)	20,6 (391)	20,2 (3.871)	20,2 (5.229)	20,0 (4)	20,4 (82)	
PE455 ^b	45.539	23,0	22,09 (1.115)	23,6 (368)	23,1 (4.053)	22,9 (5.425)	23,3 (7)	22,7 (104)	
PE550 ^b	22.763	26,3	25,09 (711)	26,9 (153)	26,2 (2.316)	26,0 (3108)	27,1 (4)	25,1 (68)	
IPP ^c	60.409	35,9	36,0 (1519)	34,8 (301)	35,8 (3.779)	35,8 (5534)	34,2 (65)	-	

^a kg

^b cm

^c meses

A tabela 10 mostra a tendência apresentada pelos polimorfismos a partir dos animais genotipados e seus descendentes e contemporâneos. É possível verificar que houve uma leve alteração nas médias dos genótipo CC (polimorfismo *IGF2* - RFLP/*MboII*).

Com relação ao polimorfismo *CYP21* - RLFP/*HpaII* não houve nenhuma tendência definida, embora o genótipo CC com a DEP para P550 foi superior em relação aos animais homozigotos TT e heterozigotos CT.

5. DISCUSSÃO

A influência dos polimorfismos genéticos nos aspectos de interesse econômico em diversas espécies de animais domésticos tem sido amplamente estudada por diferentes grupos de pesquisadores pelo mundo (Angiolillo et al., 2007; Daetwyler et al., 2008; Grisolia et al., 2009(a,b); Zhang et al., 2009; Pang et al., 2010). As pesquisas em genômica aplicadas à produção bovina vêm sendo conduzidas exponencialmente, associadas à aplicação de outras tecnologias moleculares com o intuito da melhor compreensão de mecanismos funcionais de cada gene estudado e sua relação com o fenótipo do animal.

No início, a procura por polimorfismos funcionais estava direcionada para a região codificadora de genes responsáveis por importantes características fenotípicas (Bastos-Silveira et al., 2009; Grisolia et al., 2009a; MacLeod et al., 2010; Rincón et al., 2009). Vários SNPs vêm sendo investigados na genética animal, em especial nos bovinos (Garrick e Golden, 2009; Yamada et al., 2009; Huang et al., 2010; Pang et al., 2010; Pryce et al., 2010; Suekawa et al., 2010; Verschoor et al., 2010; Watanabe et al., 2010; Weigel et al., 2010;) e menor proporção em raças zebus (Andrea, 2007; Curi et al., 2005; de Souza et al., 2007; Carrijo et al., 2008; Caetano, 2009; Curi et al., 2009) fato que motivou a presente investigação.

Supõe-se que os sítios polimórficos encontrados neste estudo, a partir dos genes *IGF2* e *CYP21* (RFLP/*Mbo*II e RFLP/*Hpa*II, respectivamente) podem estar localizados em regiões não codificantes do genoma bovino, destacando que os RNAs resultantes são moléculas funcionais que não são traduzidas para proteínas (Yu, 2009). Atualmente, os estudos nessas regiões têm aumentado de forma que maiores investigações poderiam esclarecer o potencial regulatório dos genes. As variações em regiões não codificantes podem alterar a expressão genética por diversos fatores ou ainda alterar sequências

promotoras dos genes (Garcia, 2006). O uso de marcadores genéticos a partir da detecção de polimorfismos em regiões de genes relacionados a características de importância econômica pode favorecer a identificação de animais geneticamente superiores em bovinos de corte (Carrijo et al., 2008).

Recentemente a genética molecular tem mostrado grande avanço devido às facilidades no desenvolvimento de métodos de análise de materiais genéticos usando grande número de amostras com a redução de custos (Suekawa et al., 2010; Garrick e Golden, 2009). Ao estudo de polimorfismos do tipo SNP em larga escala no genoma relacionados a aspectos fenotípicos define-se como seleção genômica (Goddard e Hayes, 2007). Para Meuwissem (2007) esta pode ser definida também como a seleção simultânea para muitos marcadores os quais cobrem todo genoma de modo denso, onde se espera o desequilíbrio de alguns genes, no mínimo, para alguns marcadores. A seleção genômica é uma Seleção Assistida por Marcadores, cujo termo foi primeiramente introduzido por Meuwissem e colaboradores (2001) quando o principal foco e objetivo dessas pesquisas era a redução de custos da genotipagem. Atualmente, grupos de pesquisa de diversos países (Holanda, Nova Zelândia, Estados Unidos da América e Austrália) já realizam pesquisas utilizando-se dessa tecnologia com bovinos. A decisão da seleção baseada no valor genético genômico (*Genomic Evaluation Breeding Value* - GEBV) é calculada com a soma dos efeitos dos marcadores dos GEBVs distribuídos em todo genoma capturando todos os QTLs potenciais que contribuam para a variação da característica (Hayes et al., 2009).

No presente trabalho foram investigados a ocorrência dos polimorfismos *IGF2* - RFLP/*Mbo*II e *CYP21* - RFLP/*Hpa*II localizados em regiões UTR do genoma de raças zebus (Gir, Guzerá e Nelore), assim como suas possíveis associações com características do fenótipo de animais pertencentes a um Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN).

5.1. Polimorfismo RFLP/*Mbo*II no gene *IGF2* bovino

A sequência do gene *IGF2* bovino não tinha sido muito explorada desde que Goodall e Schmutz (2003), pela primeira vez, relataram um polimorfismo RFLP/*Bsr*I no exon 2 através de um mapeamento genético. A partir daí, Flisikowski e colaboradores (2005), em estudos com raças bovinas (européias e africanas), observaram polimorfismos presentes no exon 6 do gene *IGF2*.

Os dados de genotipagem dos 270 animais das raças zebus apresentaram predominância do alelo T no genótipo da maioria das amostras principalmente nos animais da raça Gir. Os homozigotos CC com alteração nucleotídica para os dois alelos foram menos frequentes em comparação com os homozigotos TT também para a raça Guzerá. Com relação a raça Nelore houve certa uniformidade na disposição alélica (Tabela 3 e Figura 7) entretanto, no grupo com os animais que participam do Teste de Touros Jovens, o alelo C (com a alteração nucleotídica no sítio polimórfico) apresentou maior incidência. Esse viés observado para o alelo menos frequente somente no grupo de touros foi mais investigado na análise da associação genótipo-fenótipo. De acordo com Falconer e Mackay (2001) uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) apresenta frequências alélicas e genotípicas constantes. A probabilidade de geração dos genótipos a serem distribuídos na população respeitou as frequências genotípicas encontradas na composição de animais para o polimorfismo *IGF2*-RFLP/*Mbo*II, e se manteve no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A probabilidade do desvio ou da presença de HWE associada às frequências genotípicas conservadas foi obtida pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

Flisikowski e colaboradores (2005) relataram que polimorfismos encontrados no gene *IGF2* poderiam facilitar a investigação de expressões alelo-específicas em tecidos bovinos verificando diferentes *status* de *imprinting* em uma população. Em bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*), foram observados polimorfismos no exon 6, onde a comparação com o gene *IGF2* humano sugeriu que os SNPs encontrados

neste exon possuiriam uma região diferencialmente metilada (DMR - *Differentially Methylated CpG-Rich Region*) e poderiam influenciar o *status* de metilação do gene *IGF2* (Flisikowski et al., 2005). Os mesmos autores verificaram uma identidade de 99,5% em uma análise comparativa do fragmento em duas sub-espécies (*Bos taurus* e *Bos indicus*). A metilação é um dos mecanismos de regulação de expressão de genes controlados por *imprinting* e que geralmente ocorre nas regiões diferencialmente metiladas, com origem parental e tecido-específica (Lewis e Reik, 2006) essencial para o desenvolvimento de mamíferos (Jones e Takai, 2001), fato relevante que nos levou a não realizar experimentos de identificação de metilação no polimorfismo.

O gene *IGF2* é considerado importante marcador molecular para produção animal, inclusive em bovinos (McLaren e Montgomery, 1999). No intuito de investigar o comportamento e a origem do polimorfismo RFLP/*Mbo*II foram realizadas buscas *in silico* com a ferramenta BLAST para reconhecimento das sequências em outras regiões do genoma. Foi evidenciado que a sequência polimórfica estudada possui mais de 80% de identidade do locus para o mesmo gene em humanos, porém em cromossomo distinto (Tabela 4). Nos suínos observa-se que houve identidade com uma sequência não correspondente ao locus do gene *IGF2*. Nossos achados sugerem que nem sempre uma sequência semelhante possa ter o mesmo perfil funcional em organismos diferentes.

O polimorfismo estudado envolve a região 5'UTR do gene *IGF2* presente no exon 6 (não codificante para a proteína IGF2). As regiões 5' não traduzidas (5'UTR) geralmente abrangem várias proteínas em diversos processos de desenvolvimento. Flisikowski e colaboradores (2005) concluíram que a região polimórfica, em raças bovinas européias, presente na região 5' não traduzida (5'UTR) do exon 6 do gene *IGF2* pode conter sequências que funcionam como sítios de ligação para proteínas regulatórias (Wilkie et al., 2003). No geral, as UTRs são importantes na eficiência traducional tendo como determinantes as moléculas de mRNA.

Baseados na literatura e na localização da sequência polimórfica do *IGF2* - RFLP/*Mbo*II estabelecemos a hipótese de que o sítio polimórfico poderia estar presente em um motivo regulatório do gene *IGF2* (figura 10). As análises *in silico* com a sequência polimórfica revelaram parte do fragmento com o sítio polimórfico em comum com um motivo exônico identificado como proteína de ligação PTB (*polypyrimidine tract binding*) em ratos. A proteína de ligação PTB foi descrita como membro atípico da família de proteínas de ligação contendo motivos de reconhecimento para RNAs, devido a quatro domínios de ligação com potencial repressão para o processamento pós-transcricional, onde Ashiwa e Grabowski (1997) deduziram uma possível modulação para permitir que o gene aumente sua capacidade de codificar proteínas. O motivo exônico R0950 identificado para a proteína PTB foi identificado em seis nucleotídeos em comum (TTCTCT) para a sequência bovina amplificada do polimorfismo no gene *IGF2*-RFLP/*Mbo*II incluindo o sítio polimórfico com a base Timina o que nos permitiu estabelecer uma hipótese de que o polimorfismo encontrado na região 5'UTR (*IGF2* - RFLP/*Mbo*II) poderá estar localizado em um motivo regulatório e poderá ser funcionalmente significativa para a regulação gênica do gene *IGF2* bovino.

De acordo com Kuersten e Goodwin (2003), as regiões com elementos regulatórios presentes nas sequências UTR governam a expressão espacial e temporal de mRNA. Os reguladores tradicionais são altamente conservados e parecem controlar uma grande quantidade de diferentes mRNAs e proteínas envolvidas em processos de desenvolvimento, como fatores de crescimento e transcrição. Os microRNAs (miRNAs) e outros tipos de pequenos RNAs regulatórios também participam de um papel crucial na regulação da expressão de genes em eucariotos (Glazov et al., 2009) nas regiões UTRs (Trakooljul et al., 2010). Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples possuindo 19 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Kim, 2005) e regulam pós-transcricionalmente muitas

funções biológicas incluindo crescimento e desenvolvimento (Cargill et al., 2008). É relatado que, em mamíferos, os miRNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose e diferenciação, entre outras funções (Chen e Lodish, 2005; Brennecke et al., 2003; Esau et al., 2004). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros (mRNAs) alvo onde este mecanismo de atuação permite uma redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Kim, 2005). O número de miRNAs no banco de dados miRNABase vem crescendo constantemente, de 2909 em 36 genomas (junho de 2005) para 5071 em 58 genomas (agosto de 2007) com o passar de dois anos (Griffiths-Jones et al., 2008). O genoma total bovino descrito apresenta cerca de 524 miRNA identificados mas somente 117 são anotados (banco de dados do MIRBASE: <http://microrna.sanger.ac.uk>). Os miRNAs restantes (407) são anotados como genes novos pelo banco de dados do ENSEMBL (European Molecular Biology Laboratory, Wellcome Trust Genome no Campus de Hinxton, Inglaterra). Um dos objetivos do estudo do genoma bovino é catalogar proteínas de genes codificadores, microRNAs (miRNAs) e sequências repetitivas ruminante específicas (The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009). Uma procura por similaridade permitiu usar sequências homólogas encontradas para identificar miRNAs em outras espécies (Strozzi et al., 2008).

A partir da hipótese estabelecida de que a região seja considerada um motivo regulatório, análises contra um banco de dados de miRNAs identificaram o bta-miR 423-5p (no banco de dados de *Bos Taurus*) com sete nucleotídeos em comum, incluindo o sítio polimórfico com a base Timina (Figura 11).

O miRNA 423-5p foi identificado em suínos com grande abundância na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento muscular esquelético em neonatos (McDaneld et al., 2009) o que pode ter alguma relação com a sequência bovina estudada (no gene *IGF2*), visto que a região também é relacionada com a regulação do gene envolvido no desenvolvimento e crescimento em mamíferos.

Em outros estudos com suínos, foi revelada uma mutação única pontual do tipo SNP em uma região não codificante, que mostrou afetar a expressão do gene *IGF2* (Van Laere et al., 2003). Os mesmos autores relataram que mutações em regiões regulatórias são importantes para o controle da variação fenotípica, pois o genótipo de QTLs não pode ser deduzido diretamente a partir de fenótipos individuais, mas os genótipos de QTLs parentais podem ser determinados por testes de progênie e análise de segregação por Marcadores de Seleção Assistida (MAS).

A partir de um banco de dados com sequências similares a fatores de transcrição envolvidos na regulação gênica o fragmento com a base C no sítio polimórfico apresentou 28 segmentos identificados como potenciais sítios de ligação incluindo um sítio de ligação Sp1 (Figura 12). O sítio para a proteína Sp1 (*Specific protein 1*) oferece proteção contra metilação, sendo um fator de transcrição cuja função é a manutenção de sequências regulatórias (Frank et al., 1991). A maioria dos genes de manutenção apresenta um trecho rico em GC de 20 a 50 nucleotídeos reconhecidos pela família de fatores de transcrição Sp1. Segundo Bumber e colaboradores (2008) o sítio Sp1 é considerado regulador de elementos de DNA protegendo ilhas CpG da metilação durante a embriogênese.

Os resultados *in silico*, objetivos nesse estudo, sugeriram ser um bom indicativo de que há relação entre ferramentas de bioinformática com protocolos de biologia molecular a fim de encontrar novos marcadores moleculares ou detectar novos SNPs funcionais.

5.2. Polimorfismo RFLP/*Hpa*II no gene *CYP21* bovino

O polimorfismo presente no elemento Bov-A2 localizado na região promotora do gene *CYP21* (RFLP/*Hpa*II) foi primeiramente identificado em ovinos por Damiani e colaboradores (2000a) assim como identificado em raças bovinas européias, pelos mesmos autores, através da amplificação de um fragmento de 407 pares de base no elemento Bov-A2 presente na região promotora do gene *CYP21* bovino seguido por sequenciamento direto do produto amplificado. Não há estudos anteriores demonstrando que este elemento Bov-A2 específico possa influenciar a expressão do gene *CYP21* bovino. A distribuição e evolução deste retroelemento foram analisados com a finalidade de destacar um possível papel funcional, pois a presença do elemento Bov-A2 em regiões 3'UTRs de mRNAs influencia o crescimento e diferenciação celular durante a resposta imune podendo ter um importante papel funcional na regulação pós-transcricional do gene (Damiani et al., 2008).

As frequências alélica e genotípica para o polimorfismo do gene *CYP21* - RFLP/*Hpa*II foram calculadas a partir da genotipagem de 280 animais das raças Gir, Guzerá e Nelore. A tabela 6 mostra o predomínio do alelo T no genótipo de todas as amostras evidenciando uma incidência muito baixa do alelo C na população (Figura 16).

O polimorfismo *CYP21* - RFLP/*Hpa*II se manteve no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e apresentou frequências alélicas e genotípicas constantes. A probabilidade de geração dos genótipos a serem distribuídos na população também respeitou as frequências genotípicas encontradas na composição de animais para o HWE. A probabilidade do desvio ou da presença de HWE associada às frequências genotípicas conservadas foi obtida pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

No ensaio de detecção de metilação alelo-específica (Figura 17) ficou demonstrado que o resíduo de Citosina no motivo CpG, quando a sequência do polimorfismo RFLP/*Hpa*II, apresenta o alelo C (com alteração T/C), foi metilado em todos os animais heterozigotos. A mutação T>C poderá também criar um motivo CpG, o qual também

apresentará um possível sítio de metilação. A perda desse ponto de metilação, especialmente em regiões promotoras, pode ser hipotetizado como influenciando o controle transcricional, entretanto esse fato não ficou claro na região estudada. A metilação transicional CpG entre promotores não metilados e retroelementos metilados vizinhos possui um importante papel no estabelecimento de uma transcrição tecido-específica. Uma série de evidências mostrou que a metilação em retroelementos está prevista em ilhas CpG não metiladas promovendo uma metilação nesses sítios (Jung et al., 2008). O elemento Bov-A2 presente no gene CSN3 detectou a ocorrência de uma região polimórfica com dois alelos distintos em 4 raças bovinas e sugere que este polimorfismo possa estar envolvido em processos seletivos diferenciados nas raças (Damiani et al., 2000b).

A partir da investigação do polimorfismo RFLP/*Hpa*II, foi observado que o elemento Bov-A2 apresentou várias sequências similares identificadas ao longo do genoma (Figura 19), porém encontrou-se como cópia única (sequência de 352 pares de base) em todos os 280 animais zebus analisados, ou seja, na região promotora do gene *CYP21* que codifica para a enzima hidroxilase. A sequência com o fragmento polimórfico (elemento SINE) está dispersa pelo genoma (Figura 19) e a mesma foi submetida a um banco de dados de sequências de mRNA com características regulatórias para identificar uma possível relação na regulação transcricional e pós-transcricional da expressão gênica. Os resultados nos permitiram concluir que os dois perfis polimórficos tiveram similaridade com vários motivos exônicos não evidenciando nenhum motivo particular de cada alelo presente no polimorfismo, sugerindo que o sítio polimórfico não influenciou na similaridade pelas sequências regulatórias encontradas.

Os retroelementos são frequentemente associados às regiões reguladoras e são altamente metilados (Kubis et al., 2003). O padrão de metilação em sequências de DNA de retroelementos permite a reativação de eventos de transposição e concede elementos regulatórios dentro de “elementos parasitas” que agem no controle transcricional

dos genes vizinhos (Martin, 2006). Alguns exemplos clássicos de regulação de genes influenciados por genes associados a retrotransposons são reportados em alelos de camundongos *agouti viable yellow* (A^{vy}) e *axin fused* ($Axin^{fu}$) (Dolinoy et al., 2007). Não se sabe se eventos similares ocorrem em bovinos, mas, o “apagamento” mutacional de motivos CpG em um suposto sítio de ligação Sp1 em uma região promotora poderá fornecer um modelo candidato para a regulação gênica (Figura 21). Os efeitos destas sequências na expressão de genes podem provocar fenômenos epigenéticos e conseqüentemente, variabilidade fenotípica (Druker e Whitelaw, 2004).

As características genéticas e epigenéticas deste SNP poderão contribuir para um possível efeito funcional na regulação do gene *CYP21* bovino, pois foram verificadas frequências deste polimorfismo em raças zebuínas, porém outras investigações deverão ser conduzidas para elucidar se a alteração nucleotídica poderá ter relação com uma possível fonte de variabilidade epigenética na mesma posição genômica influenciando a expressão do gene *CYP21* bovino.

5.3. Associação genótipo-fenótipo

A constituição genética de uma população ocorre pela frequência gênica descrevendo quais são os alelos presentes em cada loci e suas proporções. É importante ressaltar na análise de uma população considerar a constituição genética de um indivíduo e a transmissão dos genes para a geração seguinte. No processo de transmissão de genes os genótipos dos pais são clivados havendo separação dos alelos em cada loci com uma nova composição de filhos (Falconer e Mackay, 2001).

As estratégias de seleção têm sido baseadas na presença de vários méritos genéticos dos indivíduos onde tem sido mostrado ser um processo muito eficiente principalmente quando associado ao estudo com vários outros genes desconhecidos (Boichard et al., 2003).

A capacidade reprodutiva do animal portador de determinado gene vai depender da frequência desse gene na população do tamanho da mesma e dos genótipos dos outros indivíduos. Na seleção a variabilidade genética aditiva é ferramenta importante devido aos efeitos dos genes que se somam para serem transmitidos à sua descendência. A tecnologia com base no DNA possibilita detectar polimorfismos importantes auxiliando a caracterização das populações.

Até o ano de 2009, cerca de 500 touros jovens oriundos de 123 fazendas estavam sendo testados e identificados com altos valores de DEPs para posterior multiplicação por meio da técnica de inseminação artificial nos rebanhos Nelore (cerca de 41% do total de reprodutores Nelore utilizados no país são oriundos da RP (Lôbo et al., 2010)). Desse total, 25% foram analisados nesse estudo, entretanto deve ser mencionado que como esses animais, além de pertencerem a um grupo diferenciado, eram oriundos de poucas famílias e, sendo conhecido que o aumento de parentesco entre os animais pode reduzir a variabilidade genética, esses fatos podem ter influenciado o presente resultado.

A análise da associação entre os polimorfismos e as características consideradas não revelou efeitos significativos para a maior parte das mesmas, exceto para peso aos 365 (PE365) e 450 (PE450) dias de idade conforme pode ser observado nas tabelas 8 e 9 que evidencia o efeito da substituição do alelo menos frequente para as características relacionadas ao peso (efeito positivo para o polimorfismo *IGF2* - RFLP/*MboII* e negativo para o polimorfismo *CYP21* - RFLP/*HpaII*) para os animais analisados.

Um polimorfismo In/Del no exon 6 do gene *IGF2* bovino foi detectado em raças bovinas européias associado com características de produção de leite (Flisikowski et al., 2007). Quando associaram polimorfismos nos exons 2 e 10 no gene *IGF2* com características de produção de leite em 238 vacas Polish Holstein-Friesian em análises individuais e em grupo Bagnicka et al. (2009) relataram que polimorfismos no gene *IGF2* têm sido aplicados como marcadores para predição de risco de câncer e obesidade em humanos, havendo portanto,

uma associação desses com ganho de peso tanto para humanos como para bovinos (com efeitos distintos para cada um). Em estudo realizado no Brasil, Gomes et al., (2005) verificaram uma associação positiva de um polimorfismo encontrado no gene *IGF2* com peso ao nascer em humanos. O polimorfismo *IGF2* - RFLP/*Mbo*II poderá ser uma espécie de fonte de informação no que se diz respeito a ganho de peso, porém maiores estudos poderão revelar sua associação com humanos.

Em humanos, alguns indivíduos afetados por uma mutação ou alteração nucleotídica causando uma deficiência da enzima 21-hidroxilase apresentam sinais de excesso de andrógenos. Não está suficientemente explicado a ocorrência de um excesso hormonal ocasionado pelo desbalanço na produção de cortisol ocorrer apenas em alguns casos, mas sabe-se que variações em genes candidatos, no caso do receptor do gene *IGF1*, podem influenciar o desenvolvimento do fenótipo virilizado diretamente, associado com manifestações prematuras de puberdade (Speiser, 2009).

O intuito da investigação do polimorfismo *CYP21* - RFLP/*Hpa*II foi verificar alguma associação em bovinos com a virilidade encontrada em humanos que sofrem uma mutação na enzima que codifica a hidroxilase.

Estudos com o gene *CYP* conduzidos em novilhas da raça Nelore, verificaram a ocorrência de polimorfismos nos genes relacionada à enzima P450 (membro dos genes *CYP*) e prolactina que, associado à Idade ao Primeiro Parto como indicadora de precocidade, não verificaram associação (Andréa et al. 2007). Em suínos, Moe et al. (2009) estudaram diferentes SNPs no gene *CYP21* relacionado a características de reprodução também não revelaram associação significativa com os níveis de esteróides estipulados. Em nosso foi estudo foi possível verificar associação apenas para a característica de peso (P450) analisada (tabelas 9 e 10) para o genótipo apresentado pelo polimorfismo *CYP21* - RFLP/*Hpa*II, havendo necessidade de mais estudos com outras características para futuramente serem observadas.

Em estudo com bovinos, incluindo a raça Nelore, Curi et al. (2005) detectaram marcadores microssatélites localizados na 5'UTR do gene *IGF1* e no fator GHR desses bovinos, evidenciando que a substituição alélica do polimorfismo foi significativa para as características de ganho de peso e massa corporal dos animais, confirmando que esses marcadores microssatélites encontrados em regiões 5'UTR de genes relacionados ao crescimento refletem de maneira positiva nas características de peso.

6. CONCLUSÕES

O sítio polimórfico RFLP/*Mbo*II encontrado na região 5'UTR do gene *IGF2* bovino pode ser funcionalmente significativo para a regulação da expressão gênica. Por ser um gene que sofre *imprinting* genômico, esse gene poderá ser considerado um futuro modelo de estudo para relacionar outras características ligadas à reprodução.

Os aspectos genéticos e epigenéticos do SNP *CYP21* - RFLP/*Hpa*II poderão contribuir para um possível efeito funcional na regulação do gene *CYP21* em bovinos.

Outras investigações do polimorfismo *IGF2* - RFLP/*Mbo*II deverão ser conduzidas para verificar sua possível influência outros aspectos fenotípicos de interesse para produção e reprodução nos bovinos dessas raças.

Devido à limitação dos resultados pelo reduzido número de animais analisados representando um dos perfis genotípicos, outras pesquisas deverão ser conduzidas para saber se o gene *CYP21* possa ser candidato para características ligadas à precocidade.

As frequências alélicas e genotípicas bem como a associação com características fenotípicas analisadas a partir dos polimorfismos *IGF2* - RFLP/*Mbo*II e *CYP21* - RFLP/*Hpa*II são a primeira associação da variabilidade genética destes locus já descrita em raças zebuínas do Brasil. Finalmente podemos concluir que os resultados obtidos fornecem um indicativo para relacionar ferramentas de bioinformática com protocolos de biologia molecular para delineamento de novos marcadores moleculares, como SNPs funcionais, visando melhorar as estratégias de produção animal.

7. REFERÊNCIAS

- Alibaba program. Programa para predição de sítios de ligação para fatores de transcrição em uma seqüência de DNA desconhecida. Recuperado em 27 de julho de 2008, de <http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>.
- Andréa, M.V., Meirelles, F.V., Lôbo, R.B., Millazzotto, M.P., Marson, E.P., Vila, R.A., Bittencourt, T.C.B.S.C., Marcondes, C.R. (2007) Polimorfismos SSCP e a puberdade em novilhas da raça Nelore. *Magistra*, 19, 198-203.
- Amarger, V., Nguyen, M., Van Laere, A.S., Braunschweig, M., Nezer, C., Georges, M. Andersson, L. (2002) Comparative sequence analysis of the Insulin-IGF2-H19 gene cluster in pigs. *Mammalian Genome*, 13, 388-398.
- Andrade, V.J. (1973) Efeitos de meio e herança sobre o peso de bezerros da raça Guzerá aos 205 dias de idade. Tese de Mestrado. Belo Horizonte: UFMG, 67p.
- Angiolillo, A., Amills, M., Urrutia, B., Doménech, A., Sastre, Y., Badaoui, B. Jordana J. (2007) Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*) gene. *Journal of Dairy Research*, 74(1), 47-51.
- ANUALPEC, 2009. Anuário da Pecuária Brasileira, São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009.
- Ashiya, M. e Grabowski, P.J. (1997) A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA*, 3(9), 996-1015.
- Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Recuperado em 10 de dezembro de 2009, de www.abcz.org.br.

Associação Brasileira de Inseminação Artificial, Mercês/Uberaba-MG.
Recuperado em 10 de março de 2010, de <http://www.asbia.org.br>.

Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores, Ribeirão Preto/São Paulo.
Recuperado em 10 de março de 2010, de <http://www.ancp.org.br>.

Barbosa, P.F. (2005) Objetivos e Critérios de Seleção em Bovinos de Corte. In: *42ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Goiânia, GO.

Bagnicka, E., Siadkowska, E., Strzałkowska, N., Zelazowska, B., Flisikowski, K., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L. (2009) Association of polymorphisms in exons 2 and 10 of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene with milk production traits in Polish Holstein - Friesian cattle. *Journal of Dairy Research*, 1-7.

Bastos-Silveira, C., Luís, C., Ginja, C., Gama, L.T. Oom, M.M. (2009) Genetic variation in BoLA microsatellite loci in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics*, 40(1), 101-105.

Bennett, S. (2004) Solexa Ltda. *Pharmacogenomics*, 5(4), 433-438.

Bland, J.M., Altman, D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*, 310(6973), 170.

Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., et al. (2003) Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35(1), 77-101.

Bojesen S.E. Nordestgaard B.G. (2008) The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*, 7(2), 158-163.

Boldman, K.G. (1993) A Manual for Use of MTDFREML: A Set of Programs to Obtain Estimates of Variances and Covariances. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service.

- Boumber, Y.A., Kondo, Y., Chen, X., Shen, L., Guo, Y., Tellez, C. et al. (2008) An Sp1/Sp3 binding polymorphism confers methylation protection. *PLoS Genetics*, 4(8), e1000162.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. Cohen, S.M. (2003) Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25-36.
- Caetano, A.R. (2009) Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 64-71.
- Cargill, E.J., Nissing, N.J., Grosz, M.D. (2008) Single nucleotide polymorphisms concordant with the horned/polled trait in Holsteins. *BMC Research Notes*, 1, 128
- Carneiro, G.G. e Memória, P. (1959) Prova de progênie de touros Zebus. *Zebu*, Uberaba, 19(3), 37-41.
- Carrijo, S.M., Alencar, M.M., Toral, F.L.B., Regitano, L.C.A. (2008) Association of *PIT1* genotypes with growth traits in Canchim cattle. *Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)*, 65, 116-121.
- Chen X. e Sullivan P.F. (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics Journal*, 3(2), 77-96.
- Chen, C.Z. e Lodish, H.F. (2005) MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Seminars in Immunology*, 17, 155-165.
- Chung, B.C., Matteson, K.J. Miller, W.L. (1986) Structure of a bovine gene for P450c21 (steroid 21 hydroxylase) defines a novel cytochrome P 450 gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 4243-4247.
- Curi R.A., Oliveira H.N., Silveira A.C., Lopes C.R. (2005) Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of *IGF1* and *GHR* on growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*, 36(1), 58-62.

- Curi R.A., Chardulo, L.A.L., Mason, M.C., Arrigoni, M.D.B., Silveira, A.C. Oliveira, H.N. (2009) Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPNI* and *CAST* genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics*, 40,456-462.
- Daetwyler, H.D., Schenkel, F.S., Sargolzaei, M. Robinson, J.A. (2008) A 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*, 91(8), 3225-3236.
- Damiani, G., Florio, S., Budelli, E., Bolla, P. Caroli, A. (2000a) *HpaII* PCR-RFLP within a Bov-A2 element in the promoter of the bovine *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) gene. *Animal Genetics*, 31(2), 154.
- Damiani, G., Florio, S., Budelli, E., Bolla, P. Caroli, A. (2000b) Single nucleotide polymorphisms (SNPs) within Bov-A2 SINE in the second intron of bovine and buffalo k-casein (*CSN3*) gene. *Animal Genetics*, 31(4), 277-279.
- Damiani, G., Florio, S., Panelli, S., Capelli, E. Cuccia, M. (2008) The Bov-A2 retroelement played a crucial role in the evolution of ruminants. *Rivista di Biologia (Review)*, 101(3), 375-404.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A. Robertson, E.J. (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 345(6270), 78-80.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. Efstratiadis, A. (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64(4), 849-59.
- de Koning, D-J. (2006) Conflicting candidates for cattle QTLs. *Trends in Genetics*, 22, 301-305.
- de Souza F.R., Dentillo D.B., Meola J., Biase F.H., Andréa M.V., Vozzi P.A., Lôbo R.B., Martelli L.R. (2007) The polymorphism in *MUC1* gene in Nelore cattle. *Journal of Animal Breeding of Genetics*. 124(1),42-46.

- Dindot, S.V., Kent, K.C., Evers, B., Loskutoff, N., Womack, J. Piedrahita J.A. (2004) Conservation of genomic imprinting at the *XIST*, *IGF2*, and *GTL2* loci in the bovine. *Mammalian Genome*, 15, 966-974.
- Dolinoy, D.C., Weidman, J.R. Jirtle, R.L. (2007) Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reproduction Toxicology*, 23(3), 297-307.
- Druker, R. Whitelaw, E. (2004) Retrotransposon-derived elements in the mammalian genome: a potential source of disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27(3), 319-330.
- Ellis, M.C. (2000) "Spot-on" SNP genotyping. *Genome Research*, 10(7), 895-897.
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E.G., Ravichandran, L.V., et al. (2004) MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52361-52365.
- Falconer, D.S. Mackay, T.F.C. (2001) *Introducción a la genética cuantitativa*. 4.ed. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Ferraz, J.B.; Pinto, L.F.; Meirelles, F.V.; Eler J.P.; de Rezende, F.M.; Oliveira, E.C.; Almeida, H.B.; Woodward, B., Nkrumah, D. (2009) Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 8(4), 1360-1366.
- Flisikowski K., Adamowicz T., Switonski M., Hiendleder S. Pareek C. (2005) Nucleotide sequence and variation of *IGF2* gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Animal Biotechnology*, 16, 203-208.
- Flisikowski, K., Adamowicz, T., Strabel, T., Jankowski, T., Switonski, M., Zwierzchowski, L. (2007) An *InDel* Polymorphism in exon 6 of *IGF2* associated with the Breeding Value of Polish Holstein-Friesian Bulls. *Biochemical Genetics*, 45, 139-143.
- Frank, D., Keshet, I., Shani, M., Levine, A., Razin, A. Cedar, H. (1991) Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature*, 16, 239-241.

- Freitas, M.A.R. (1975) Zoneamento Ecológico da Pecuária Bovina do Estado de São Paulo. *Boletim de Indústria Animal*, São Paulo, 32(2), 185-237.
- Freitas, M.A.R. (2004) Seleção em bovinos de corte - importância do teste de touros jovens. *In 2º WORKSHOP EM GENÉTICA E MELHORAMENTO NA PECUARIA DE CORTE*, CD-ROM, FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.
- Freitas, M.A.R e Cardoso, V.L. (2005) Melhoramento Genético dos Bovinos Leiteiros: Limitações e Oportunidades. *In: 42ª Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Goiânia, GO.
- Garcia, J.F. (2006) Utilização de marcadores moleculares para a seleção. *In 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, Londrina, PR.
- Garrick D.J., Golden B.L. (2009) Producing and using genetic evaluations in the United States beef industry of today. *Journal of Animal Science* 87(14 Suppl), E11-8.
- Georges, M. (2001) Recent progress in livestock genomics and potential impact on breeding programs. *Theriogenology*, v. 55, p. 15-21.
- GeneRunner Program. Recuperado em 10 de dezembro de 2009, de <http://www.geneRunner.net>
- Gicquel C., Le Bouc Y. (2006) Hormonal regulation of fetal growth. *Hormonal Research*, 65 (Suppl. 3), 28-33.
- Glazov, E.A., Kongsuwan, K., Assavalapsakul, W., Horwood, P.F., Mitter, N. Mahony, T.J. (2009) Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. *Plos One*, 4, 1-6.
- Goddard M.E., Hayes B.J. (2007) Genomic selection. *Journal of Animal Breeding Genetics*, 124, 323-330.

- Gomes, M.V.M., Soares, M.R., Pasqualim-Neto, A., Marcondes, C.R., Lôbo, R.B. Ramos, E.S. (2005) Association between birth weight, body mass index and *IGF2/ApaI* polymorphism. *Growth Hormone & IGF Research*, 15, 360-362.
- Goodall, J.J. Schmutz, S.M. (2003) Linkage mapping of *IGF2* on cattle chromosome 29. *Animal Genetics*, 34, 313.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. Enright, A.J. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *NAR*, 36, 154-158.
- Grisolia, A.B., Curi, R.A., De Lima, V.F., Olmedo, H.P., Kmiec, E., Nunes, C.M., et al. (2009a) Targeted nucleotide exchange in bovine myostatin gene. *Animal Biotechnology*, 20(1), 15-27.
- Grisolia, A.B., D'Angelo, G.T., Porto Neto, L.R., Siqueira, F., Garcia, J.F. (2009b) Myostatin (*GDF8*) single nucleotide polymorphisms in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 822-830.
- Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J., Goddard, M.E. (2009) Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, 92, 433-443.
- Hitchins M.P., Moore G.E. (2002) Genomic imprinting in fetal growth and development. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(11), 1-19.
- Huang, H.Y., Chien, C.H., Jen, K.H. Huang, H.D. (2006) RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucleic Acids Research*, 34, 429-34.
- Huang W., Kirkpatrick B.W., Rosa G.J., Khatib H. (2010) A genome-wide association study using selective DNA pooling identifies candidate markers for fertility in Holstein cattle. *Animal Genetics* [Epub ahead of print]
- Jeon, J.T., Carlborg, O., Tornsten, A. Giuffra, E., Amarger, V., Chardon, P., Andersson-Eklund, L., Andersson, K., Hansson, I., Lundström, K. Andersson, L. (1999) A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nature Genetics*, 21, 157-158.

- Jones, P.A. Takai, D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293(5532), 1068-1070.
- Jung, Y.C., Hong, S.J., Kim, Y.H., Kim, S.J., Kang, S.J., Choi, S.W. Rhyu, M.G. (2008) Chromosomal losses are associated with hypomethylation of the gene-control regions in the stomach with a low number of active genes. *Journal of Korean Medical Science*, 23(6), 1068-1089.
- Kelly, T.J. Smith, H.O. (1970) A restriction enzyme from *Hameophilus influenzae*. II-base sequence of the recognition site. *Journal of Molecular Biology*, 51, 393-409.
- Kim, V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376-385.
- Krawczak, M. (1999) Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*, 20, 1676-1681.
- Kubis, S.E., Castilho, A.M., Vershinin, A.V. Heslop-Harrison, J.S. (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology*, 52(1), 69-79.
- Kuersten, S. e Goodwin, E.B. (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 626-637.
- Lacorte, G.A., Machado, M.A., Martinez, M.L., Campos, A.L., Maciel, R.P., Verneque, R.S., Teodoro, R.L., Peixoto, M.G.C.D., Carvalho, M.R.S., Fonseca, C.G. (2006) DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genetic and Molecular Research*, 5(3), 475-482.
- Lenstra, J.A., van Boxtel, J.A., Zwaagstra, K.A. Schwerin, M. (1993) Short interspersed nuclear element (SINE) sequences of the Bovidae. *Animal Genetics*, 24(1), 33-39.
- Lewis, A. e Reik, W. (2006) How imprinting centres work. *Cytogenetic and Genome Research (Review)*, 113 (1-4), 81-89.

- Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.; Marcondes, C.R. (2000) Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes. Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.
- Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.; Marcondes, C.R. (2001) Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes. Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.
- Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.; Marcondes, C.R. (2002) Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes. Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.
- Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.; Marcondes, C.R. (2010) Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes. Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.
- Mac Eachern, S., McEwan, J., Mather, A., McCulloch, A., Sunnucks, P. Goddard, M. (2006) Testing the neutral theory of molecular evolution using genomic data: a comparison of the human and bovine transcriptome. *Genetics Selection Evolution.*, 38(3):321-41.
- Machugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 146, 1071-1086.
- MacLeod, I.M., Hayes, B.J., Savin, K.W., Chamberlain, A.J., McPartlan, H.C., Goddard, M.E. (2010) Power of a genome scan to detect and locate quantitative trait loci in cattle using dense single nucleotide polymorphisms. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 127, 133-142.
- Maeda, M.; Murayama, N.; Ishii, H.; Uryu, N.; Ota, M.; Tsuji, K.; Inoko, H. (1989) A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*, 34(5), 290-298.
- Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W.E. et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.

- Martin, S.L. (2006) The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (1), 45621.
- McDaneld, T.G, Smith, T.P.L., Doumit, M.E. Miles, J.R., Coutinho, L.L., Sonstegard, T.S., Matukumalli, L.K., Nonneman, D.J., Wiedmann, R.T. (2009) MicroRNA transcriptome profiles during swine skeletal muscle development. *BMC Genomics*, 10, 77.
- McLaren, R.J. e Montgomery, G.W. (1999) Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. *Mammalian Genome*, 10, 588-591.
- Meuwissen T.H., Hayes, B.J., Goddard, M.E. (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, 1819-1829.
- Meuwissen, T.H. e Goddard, M.E. (2007) Multipoint identity-by-descent prediction using dense markers to map quantitative trait loci and estimate effective population size. *Genetics*, 176(4), 2551-2560.
- Meuwissen T.H. e Goddard M.E. (2010) Accurate Prediction of Genetic Values for Complex Traits by Whole Genome Resequencing. *Genetics*, [Epub ahead of print]
- MiRBase: The microRNA database. Release 14. Recuperado em 27 de novembro de 2009, de <http://www.mirbase.org/>.
- Moe, M., Lien, S., Aasmundstad, T., Meuwissen, T.H., Hansen, M.H., Bendixen, C., Grindflek, E. (2009) Association between SNPs within candidate genes and compounds related to boar taint and reproduction. *BMC Genetics*, 10, 32, 14p.
- National Center for Biotechnology Information - U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health (2010) recuperado em 08 de março de 2010. de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppieters, W., Dettleux, J., Hanset, R., Karim, L., Kvasz, A., Leroy, P. Georges M. (1999) An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the

- IGF2* locus in pigs. *Nature Genetics*, 21, 155-156.
- New, M.I. (2006) Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4205-4214.
- Nijman, I.J., van Tessel, P. Lenstra, J.A. (2002) SINE retrotransposition during the evolution of the Pecoran ruminants. *Journal of Molecular Evolution*, 54(1), 9-16.
- O'Dell S.D. e Day I.N. (1998) Insulin-like growth factor II (*IGF-II*). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30 (7), 767-771.
- Ohlsen, S.M., Lugenbeel, K.A. Wong, E.A. (1994) Characterization of the linked ovine insulin and insulin-like growth factor-II genes. *DNA Cell Biology*, 13(4), 377-388.
- Olerup, O. e Zetterquist, H. (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipients matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39, 225-235.
- Onami, J., Nikaido, M., Mannen, H. Okada, N. (2007) Genomic expansion of the Bov-A2 retroposon relating to phylogeny and breed management. *Mammalian Genome*, 18(3), 187-196.
- Paneto J.C.C.; Bittar, E.R.; Barbosa, E.F.; Rocha, C.D.; Val, J.E.; Ferraudo, A.S.; Lôbo, R.B. (2009) Causas de variação nos preços de bovinos nelore elite no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39(1), 215-220.
- Pang, Y., Wang, J., Zhang, C., Lei, C., Lan, X., Yue, W., Gu, C., Chen, D., Chen, H. (2010) The polymorphisms of bovine *VEGF* gene and their associations with growth traits in Chinese cattle. *Molecular Biology Reports* Apr 8. [Epub ahead of print]
- Pryce J.E., Haile-Mariam M., Verbyla K., Bowman P.J., Goddard M.E., Hayes B.J. (2010) Genetic markers for lactation persistency in primiparous Australian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2202-2214.

Regitano, L.C.A. (2005) *Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento. In: 42º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia, GO*

RegRNA database, ISLAB, Integrative Systems Biology Laboratory, National Chiao Tung University, Taiwan. Recuperado em 10 de fevereiro de 2010, de <http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/>.

Reik, W. e Walter, J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics*, 2, 21-30.

Rincón, G., Islas-Trejo, A., Casellas, J., Ronin, Y., Soller, M., Lipkin, E., Medrano, J.F. (2009) Fine mapping and association analysis of a quantitative trait locus for milk production traits on *Bos taurus* autosome 4. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 758-764.

Rogler, C.E., Yang, D., Rossetti, L., Donohoe, J., Alt, E., Chang, C.J., et al., (1994) Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in Insulin-like growth factor II transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13779-13784.

Rosenberg, N.A.; Huang, L.; Jewett, E.M.; Szpiech, Z.A.; Jankovic, I.; Boehnke M. (2010) Genome-wide association studies in diverse populations. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 356-366.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H, Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: *Cold Spring Harbor*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2st ed.

Santiago, A.A. (1985) *O zebu na Índia, no Brasil e no mundo*. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 744p.

Schmutz S.M., Moker J.S., Gallagher D.S. Jr, Kappes S.M. omack J.E. (1996). In situ hybridization mapping of LDHA and *IGF2* to cattle chromosome 29. *Mammalian Genome*, 7, 473.

- Seidel, G.E. (2010) Brief introduction to whole-genome selection in cattle using single nucleotide polymorphisms. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 138-44.
- Schütz, E., Urnovitz, H.B., Iakoubov, L., Schulz-Schaeffer, W., Wemheuer, W. Brenig, B. (2005) Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(7), 814-820.
- Speiser, P.W. (2009) Nonclassic adrenal hyperplasia. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders (Review)*, 10(1), 77-82.
- Strozzi, F., Mazza, R., Malinverni, R. Williams, J.L. (2008) Annotation of 390 bovine miRNA genes by sequence similarity with other species. *Animal Genetics*, 40, 124-126.
- Suekawa Y., Aihara H., Araki M., Hosokawa D., Mannen H., Sasazaki S. (2010) Development of breed identification markers based on a bovine 50K SNP array. *Meat Science*, 85(2), 285-288.
- The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elvik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C. et al. (2009) The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science*, 324, 522.
- The Bovine HapMap Consortium et al., (2009) Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, 324(5926), 528-532.
- Trakooljul, N., Hicks, J.A., Liu, H.C. (2010) Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143. *Animal Genetics* [Epub ahead of print]
- Val, J.E. (2006) *Alternativas para Seleção de Touros da Raça Nelore Considerando Características Múltiplas de Interesse Econômico*. Tese de Doutorado, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

- Val, J.E.; Ferraudo, A.S.; Bezerra, L.A.F.; Corrado, M.P.; Lôbo, R.B.; Freitas, M.A.R.; Paneto, J.C.C. (2008) Alternativas para seleção de touros na raça Nelore considerando características múltiplas de importância econômica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(3), 705-712.
- Valouev, A.; Ichikawa, J.; Tonthat, T. et al. (2008) A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Research*, 18(7), 1051-1063.
- Van Laere, A.S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., et al., (2003) A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425(6960), 832-836.
- Vercesi Filho A.E.; Verneque R.S.; Peixoto, M.G.C.D.; Machado, M.A.; Penna, V.M.; Cardoso, V.L. (2010) Selection of tropical dairy cattle - the experience from the Brazilian Gyr and Guzerat. 9th WCGALP.
- Verschoor C.P., Pant S.D., You Q., Schenkel F.S., Kelton D.F., Karrow N.A. (2010) Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection status. *BMC Genetics*, 11(1), 23.
- Vieira, H.C.M. (2004) Variabilidade Genética em Rebanhos da Raça Guzerá Participantes de um Programa de Melhoramento Genético. Dissertação de Mestrado, Departamento de Melhoramento Genético, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Watanabe N., Yamada T., Yoshioka S., Itoh M., Satoh Y., Furuta M., Komatsu S., Sumio Y., Fujita T., Sasaki Y. (2010) The T allele at the g.1471620G>T in the EDG1 gene associated with high marbling in Japanese Black cattle is at a low frequency in breeds not selected for marbling. *Animal Science Journal*, 81(1), 142-144.
- Weigel K.A., Van Tassell C.P., O'Connell J.R., VanRaden P.M., Wiggans G.R. (2010) Prediction of unobserved single nucleotide polymorphism genotypes of Jersey cattle using reference panels and population-based imputation algorithms. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2229-2238.

- Wilkie, G.S., Dickson, K.S. Gray, N.K. (2003) Regulation of mRNA translation by 5'and 3'UTR binding factors. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 182-188.
- Yamada T., Sasaki S., Sukegawa S., Miyake T., Fujita T., Kose H., Morita M., Takahagi Y., Murakami H., Morimatsu F., Sasaki Y. (2009) Association of a single nucleotide polymorphism in ribosomal protein L27a gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Animal Science Journal*, 80(6), 631-635.
- Zhang, S., Knight, T.J., Reecy, J.M., Wheeler, T.L., Shackelford,S.D., Cundiff, L.V., Beitz, D.C. (2009) Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine acetyl-CoA carboxylase - a gene with beef fatty acid composition. *Animal Genetics* doi:10.1111/j.1365-2052.2009.02006.x
- Zwolinska, K. (2006) Retroviruses-derived sequences in the human genome. Human endogenous retroviruses (HERVs). *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 60, 637-652.

8. Anexos



INTERNATIONAL ASSOCIATION
FOR BIOLOGICALS

Developments in Biologicals

Vol. 132

Animal Genomics for Animal Health

Editors

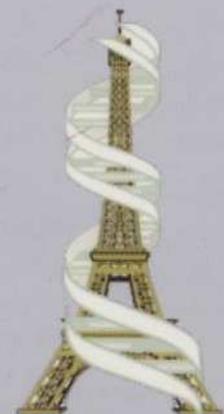
M.-H. Pinard

C. Gay

P.-P. Pastoret

B. Dodet

KARGER



AGAH

.....

IGF2/MbolI Polymorphism in Gir and Nelore Cattle

A. Martins da Silva¹, A.F.L. Rios¹, E.S. Ramos^{1,2}, V.L. Cardoso³,
A.E. Vercesi Filho⁴, R.B. Lôbo^{1,5}, M.A.R. Freitas¹

- ¹ Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP), University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil;
- ² Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital FMRP, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- ³ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA Centro Leste, Ribeirão Preto, SP, Brazil;
- ⁴ APTA Nordeste Paulista, Mococa, SP, Brazil;
- ⁵ Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores – ANCP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Key words: insulin-like growth factor 2 (*IGF2*), imprinting, Zebu breeds

Abstract: The imprinted gene insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) carries out important functions in the development of placental mammals, during the embryonic and fetal stages and is located on bovine chromosome 29. The main aim of this study was to verify the occurrence of a polymorphism (C/T transversion) in exon 6 of the *IGF2* gene in Gir and Nelore cattle, Zebu breeds of great economic importance in Brazil for dairy and beef production, respectively. A 193 bp fragment of bovine *IGF2* exon 6 was amplified by PCR with specific primers for this region and digested with *MbolI* enzyme to analyze the polymorphic segment. In a total of 39 Gir animals (29 females and 10 males), the estimated frequencies of the C and T alleles were 0.42 and 0.58, respectively. The genotypic frequencies were 0.10 for CC, 0.26 for TT and 0.64 for CT. For 28 Nelore animals (17 females and 11 males), the estimated frequencies of the C and T alleles were 0.43 and 0.57, respectively. The genotypic frequencies were 0.18 for CC, 0.32 for TT, and 0.50 for CT. This is the first report of the occurrence of this polymorphism in these breeds. The polymorphic site can be a regulatory motif with functional significance to gene regulation of the *IGF2* gene. This polymorphism could be used to investigate the allele-specific expression of the *IGF2* gene, its epigenetic status, and its role in developmental, growth and reproductive traits.

INTRODUCTION

Genomic imprinting is a mechanism of gene regulation where only one member of the allelic pair is expressed, depending on the parental origin. This phenomenon is associated with differential epigenetic markers on the regions named imprinting control regions (ICRs) [1]. Insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) is one of the first known imprinted genes and it is expressed in several tissues during mammalian development [2], influencing fetal cell division, differentiation, placental development and possibly metabolic regulation [3]. In most bovine fetal tissues, only the paternal allele of this gene is expressed, while the maternal allele is transcriptionally silent [4]. It was showed through of comparative mapping data in situ hybridization that of *IGF2* is situated in the distal end of bovine chromosome 29 [5]. A length polymorphism was identified within a poly (A) tail in the 3' UTR of the sheep (*ovis aries*) *IGF2* gene. This polymorphism was used to map *IGF2* to sheep chromosome 21 and demonstrate that *IGF2* is imprinted in these animals, being expressed from the paternal allele [6]. The main aim of this study was to verify the occurrence of a polymorphism (C/T transversion) in the exon 6 of the *IGF2* gene in Gir and Nelore cattle, Zebu breeds of great economic importance in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

A total of 39 Gir animals (29 females and 10 males) and 28 Nelore (17 females and 11 males, including three different families) were analyzed. These herds belong to the APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Nordeste Paulista) and Breeding Program for Nelore Cattle (PMGRN), respectively. Blood samples were collected from animals and the extraction of DNA was performed by digestion with proteinase K and salt extraction as previously described [7]. For the PCR reaction, primers were designed with GeneRunner Software (3.5 version) from the sequence of bovine genome and available in GenBank (accession number AY971631). The forward and reverse primers were 5'GCCCTCTCGCTGTCCCTCTC3' and 5'CAGCCCGTCCCTCCCTAAAG3', respectively (Fig. 1). The PCR reaction (25 µl) contained 50-100 ng of genomic DNA, 50 mM of MgCl₂, 1.5 µl of 10X PCR buffer, 5 pmol of each primer, 0.25 mM dNTPs and 0.2 U of Taq DNA polymerase and was performed in a TGradient thermocycler (Whatman-Biometra). Cycle conditions were 5 minutes at 94°C, followed by 40 cycles (30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C), and a final extension for 10 minutes at 72°C. For restriction enzyme analysis of the C-T polymorphic site, the 193 bp PCR product was digested at 37°C for 2 hours in 25 µl with 0.4U of *Mbo*II restriction nuclease (BioLabs, New England, USA). The fragments obtained were visualized in a 10% polyacrylamide gel stained with 0.2% silver nitrate.

RESULTS

The fragments obtained by enzymatic restriction (generating two single-nucleotide polymorphisms) are shown in Figure 2. A single base change or insertion/deletion or transversion in the DNA sequence is named SNP (Single Nucleotide Polymorphism); the results of this profile are summarized in Table 1. It was observed that the average of the heterozygote CT was greater when compared with data of CC and TT genotypes. Using the RegRNA web server (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/>) it was verified that the polymorphic site is in an RNA motif to binding PTB protein, which is described as trans-acting repressor [8], Figure 3.

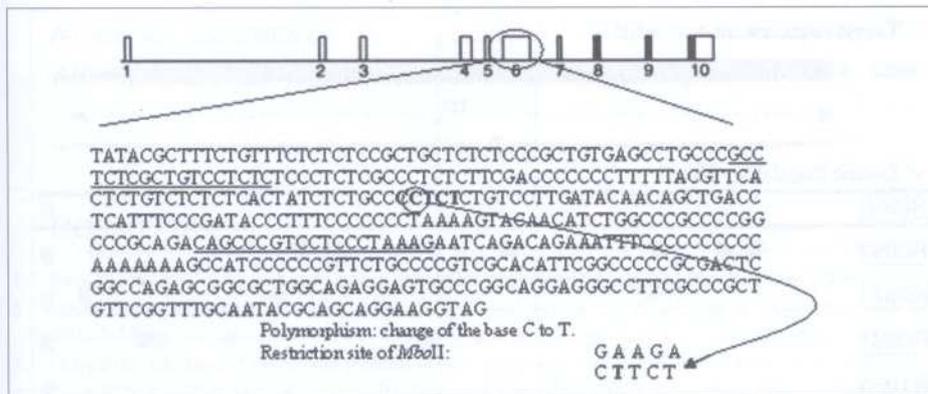


Fig. 1: Schematic representation of localization of exon 6 in the IGF2 gene locus in *Bos taurus indicus* (GenBank accession number AY971631). The polymorphism studied (change of one nucleotide) representing two SNPs is shown with the exons present in the IGF2 locus. Exons 8, 9 and a partial sequence of exon 10 are coding and visualized in black boxes. The remaining exons represent non-coding regions of the IGF2 gene.

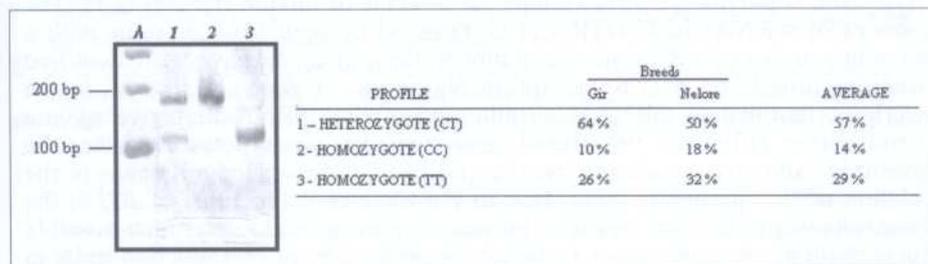


Fig. 2: Polymorphism profile of PCR products of DNA samples from Gir and Nelore breeds observed by digestion with *MboII* enzyme (λ : 100 bp DNA marker).

Table 1: Allelic and genotypic frequencies for polymorphism exon 6 IGF2 in Gir and Nelore animals studied.

Breed	N	Allelic Frequency		Genotypic Frequency		
		CC	TT	CC	TT	CT
Gir	39	0.42	0.58	0.10	0.16	0.64
Nelore	28	0.43	0.57	0.18	0.32	0.50
Total	67					

N = number of animals

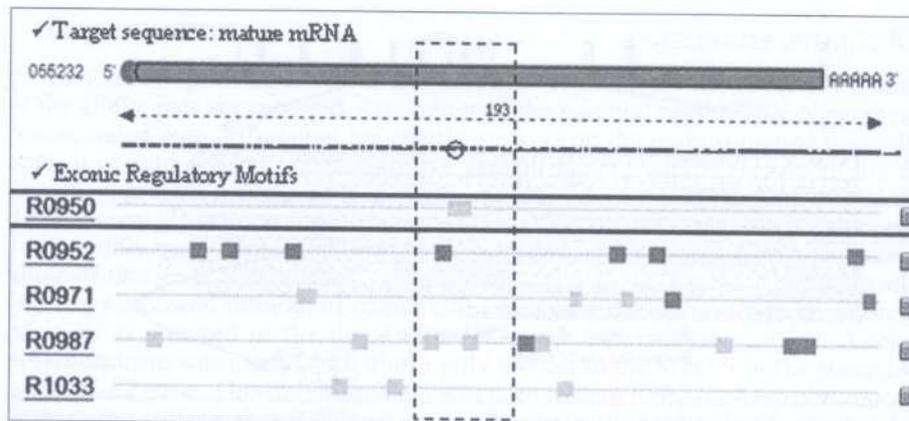


Fig. 3: Graphic representation of analysis generated by site <http://regma.mbc.nctu.edu.tw>.

DISCUSSION

The exon 6 polymorphism overlaps the 5' UTR of bovine *IGF2* (Fig.1). The sequences of mRNAs in 5' UTR can be targeted by regulatory proteins with a substantial number of mRNA structural motifs; these elements have been identified in transcriptional and post-transcription regulation of gene expression, in the transcription termination, mRNA localization and stability, mRNA alternative splicing and translation efficiency [9]. Based on our results, we hypothesized that the polymorphic site on a regulatory motif could be of functional significance to the regulation of this particular gene. Due to the biological functions of *IGF2*, the polymorphism studied here needs to be better investigated to determine possible influences on phenotypic traits of interest for production or reproduction traits in livestock. A study on the association between Birth Weight (BW), Body Mass Index (BMI) and the *IGF2/ApaI* polymorphism in adult humans was reported and although the *IGF2* genotype was not significantly associated with BW and/or BMI, the authors observed a statistically significant correlation of 0.33 ($p=0.023$) between BW and BMI in GG homozygotes whose BW was higher than 3.5kg [10]. The *IGF2* gene is potentially a very important marker for production traits in domestic animals, including cattle [11]. For *IGF2* genes, the future breeding model should consider the non-Mendelian inheritance of imprinted genes. This is the first study on *MboII* polymorphism of exon 6 in the *IGF2* gene in Brazilian Zebu breeds.

CONCLUSION

The results obtained suggest that the in vitro molecular protocols can be used to identify new molecular markers, such as the functional SNPs and can contribute with additional informations for breeding strategies of livestock. Others investigations of this polymorphism should be performed to verify possible influences on traits of interest in cattle.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by PRONEX, FAPESP, CNPq, ANCP and CAPES.

REFERENCES

- 1 Reik W, Walter J: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2:21-30.
- 2 Hitchins MP, Moore GE: Genomic imprinting in fetal growth and development. *Expert Rev Mol Med* 2002;1-19.
- 3 Gicquel C, Le Bouc Y: Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006;65(Suppl. 3):28-33.
- 4 Dindot SV, Kent KC, Evers B, Loskutoff N, Womack J, Piedrahita JA: Conservation of genomic imprinting at the *XIST*, *IGF2*, and *GTL2* loci in the bovine. *Mamm Genome* 2004;15:966-974.
- 5 Goodall JJ, Schmutz SM: Linkage mapping of *IGF2* on cattle chromosome 29. *Anim Genet* 2003;34:313.
- 6 McLaren RJ, Montgomery GW: Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. *Mamm Genome* 1999;10:588-591.
- 7 Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipients matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235.
- 8 Ji Y, Xu X, Stormo GD: A graph theoretical approach for predicting common RNA secondary structure motifs including pseudoknots in unaligned sequences. *Bioinformatics* 2004;20:1591-1602.
- 9 Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK: Regulation of mRNA translation by 5' and 3' UTR binding factors. *Trends in Biochemical Sciences* 2003; 28:182-188.
- 10 Gomes MVM, Soares MR, Pasqualim-Neto A, Marcondes CR, Lôbo RB, Ramos ES: Association between birth weight, body mass index and *IGF2/ApaI* polymorphism. *Growth Horm IGF Res* 2005;15:360-362.
- 11 Flisikowski K, Adamowicz T, Switonski M, Hiendleder S, Pareek C: Nucleotide sequence and variation of *IGF2* gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Anim Biotechnol* 2005;16:203-208.

Maria Armênia Ramalho de Freitas, Medicine College of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Bandeirantes, Avenue 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil- CEP 14049-900.

E-mail: mfreitas@genbov.fmrp.usp.br

Manuscript Number:

Title: IDENTIFICATION OF A DNA METHYLATION POINT IN THE PROMOTER REGION OF THE BOVINE CYP21 GENE

Article Type: Research Paper

Section/Category: Endocrinology

Keywords: CYP21 gene, Bov-A2, SINE, Cattle, Epigenetics, Methylation

Corresponding Author: Dr Ester Silveira Ramos, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Faculty of Medicine of Ribeirao Preto-University of Sao Paulo

First Author: Andréa Martins-da-Silva, BSc, MSc

Order of Authors: Andréa Martins-da-Silva, BSc, MSc; Maria Armênia R Freitas, DVM, PhD; Álvaro Fabrício L Rios, BSc, PhD; Adriana Renzi, MSc; Raysildo B Lobo, DVM, PhD; Marli Aparecida V Galerani; Reginaldo A Vila; Ester Silveira Ramos, MD, PhD

Abstract: The CYP21 (Steroid 21-hydroxylase) gene is involved in the synthesis of steroid hormones. The promoter region of the bovine CYP21 presents a Short Interspersed Nucleotide Element (SINE) of the Bov-A2 which overlaps a putative Sp1 binding site. Our aims were to verify the occurrence of a Bov-A2/HpaII polymorphism in bovine zebu breeds, and to verify whether the polymorphic nucleotide is associated with a methylation point. Samples of DNA from 133 animals were genotyped, and we identified a Bov-A2/HpaII polymorphism (T/C), which, using a restriction methylation sensitive assay employing the HpaII and isoschizomer MspI enzymes (methylation sensitive and non-sensitive enzymes, respectively), seems to be a DNA methylation point. To our knowledge, this is the first study on the occurrence of this polymorphism in these Zebu breeds and identification of a DNA methylation point in the bovine CYP21 promoter region.

1 **IDENTIFICATION OF A DNA METHYLATION POINT IN THE PROMOTER**
2 **REGION OF THE BOVINE *CYP2J1* GENE**

3

4 Andrea Martins da Silva¹, Maria Armenia Ramalho de Freitas¹, Alvaro Fabrício Lopes
5 Rios¹, Adriana Renzi¹, Raysildo Barbosa Lôbo¹, Marli Aparecida Vanni Galerani¹,
6 Reginaldo Aparecido Vila¹, Ester Silveira Ramos^{1,2}

7

8 ¹Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo,
9 Ribeirão Preto, SP, Brazil

10 ²Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
11 University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

12

13 Correspondence to Ester Silveira Ramos, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University
14 of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil - CEP 14049-900.

15 E-mail: esramos@rge.fmrp.usp.br

16 Tel: +55-16-3602-4914; Fax: +55-16-3633-0069

17

18 **Abstract**

19

20 The *CYP21* (Steroid 21-hydroxylase) gene is involved in the synthesis of steroid hormones.
21 The promoter region of the bovine *CYP21* presents a Short Interspersed Nucleotide
22 Element (SINE) of the Bov-A2 which overlaps a putative Sp1 binding site. Our aims were
23 to verify the occurrence of a Bov-A2/HpaII polymorphism in bovine zebu breeds, and to
24 verify whether the polymorphic nucleotide is associated with a methylation point. Samples
25 of DNA from 133 animals were genotyped, and we identified a Bov-A2/HpaII
26 polymorphism (T/C), which, using a restriction methylation sensitive assay employing the
27 *HpaII* and isoschizomer *MspI* enzymes (methylation sensitive and non-sensitive enzymes,
28 respectively), seems to be a DNA methylation point. To our knowledge, this is the first
29 study on the occurrence of this polymorphism in these Zebu breeds and identification of a
30 DNA methylation point in the bovine *CYP21* promoter region.

31

32 **Keywords:** *CYP21* gene, Bov-A2, SINE, Cattle, Epigenetics, Methylation.

33

34 INTRODUCTION

35 The most common enzymatic defect of steroid synthesis is adrenal steroid 21-hydroxylase
36 deficiency. The human *CYP21A2* gene is well-known in terms of location, duplication in
37 tandem with the fourth component (C4) isotypes, structure, and the sequencing of the gene
38 and its pseudogene and their arrangement on the chromosome (New 2006).

39 Genetic polymorphism influencing traits of economic interest has been continually
40 studied in several livestock species by different research groups around the world. In the
41 beginning, the search for functional polymorphisms focused on the coding region of genes
42 associated with important phenotypic characteristics (Grisolia *et al.*, 2009; Rincón *et al.*,
43 2009). However, nowadays, several studies have been directed towards genetic variability
44 in the regulatory region, where the presumed effect would influence the regulation of gene
45 transcription (Samarin *et al.*, 2009).

46 The composition of the regulatory elements in vertebrates could be complex
47 including modules of transcription factor binding sites, intergenic ncRNAs transcription
48 and ancient fragments derived from retrotransposition events (Nijman *et al.*, 2002).
49 Variability in the regulatory sites of genes could affect the binding of regulatory proteins or
50 erase methylation sites, as in the case of deamination in methylated CpG motifs (Gartler
51 and Riggs 1983). Retroelements are frequently associated with regulatory regions and are
52 highly methylated (Kubis *et al.*, 2003). This heavy methylation could be a source of genetic
53 mutation by deamination at these elements giving rise to new alleles of these sequences
54 (Wang and Leung 2008).

55 According to Lenstra *et al.* (1993) there are three SINE families in the Ruminantia:
56 Bov-A2, Bov-A1, and Bov-B, which are estimated to account for 1.8, 1.6, and 0.5% of the
57 bovine genome, respectively. The Bov-A2 element is composed of two monomers, called
58 Bov-A units (a segment of 115 bp), joined by a linker sequence of short repeats

59 (CACTTT)_n, with approximately 220,000 copies in the entire genome (Onami *et al.*, 2007).
60 Damiani *et al.* (2000b) showed that the mutation frequency (substitutions and
61 deletions/insertions per nucleotide site per year) of the Bov-A2 sequences is generally
62 higher than those of other genomic noncoding sequences. This high amount of genetic
63 variation in the Bov-A2 elements could be responsible for several processes such as
64 recombination and gene conversion. The same authors suggested that a considerable
65 number of point mutations, insertions, and deletions are present in the whole Bov-A2
66 sequence and therefore, this retroelement might be an important source of single nucleotide
67 polymorphism (SNP) for the analysis of the Bovidae family genomes. The effects of these
68 chromosomal “parasites” on gene expression can provoke epigenetic and consequently,
69 phenotypic variability (Druker and Whitelaw, 2004).

70 The SINE elements contain internal regulatory sequences, which are presumed to
71 influence the transcription of neighbouring genes (Zwolińska, 2006). Transposable
72 elements close to regulatory sequences of some genes in mice have been reported as
73 influencing the host gene. There are no studies demonstrating that this specific Bov-A2
74 element can influence the expression of bovine *CYP21*. In Mammals, retroelements
75 account for 30–40% of the genome, and have two open reading frames and 5' and 3'
76 untranslated regions allowing them to amplify themselves in the mammalian genome via
77 reverse transcriptase and then modify the biology of cells by reinsertion and possibly by
78 modulation of RNA biology (Ramos, 2009). Within the last decade, researchers have
79 moved away from the “selfish DNA” hypothesis (non-functional genomics residents) and
80 have understood that mobile elements are important regions within genomes (Hizer *et al.*,
81 2008). Many elements have been discovered in heterochromatin and other heavily
82 methylated regions, presumably as a genomic response to suppress their activities as
83 insurrectional mutagens and/or as sites of recombination and rearrangement considered

84 deleterious to the host (Morse *et al.*, 198). Other beneficial roles of these elements have also
85 been shown, such as DNA repair mechanisms, gene duplication, X chromosome
86 inactivation, telomere maintenance and modulators of gene expression (Hizer *et al.*, 2008).

87 The aim of this study was to identify the occurrence of a polymorphism (T/C
88 changed) of the SINE element (Bov-A2) in the promoter region of the *CYP21* gene in
89 bovines (Zebu breeds: Gir, Guzera and Nelore), which are of economic importance and an
90 animal model for human diseases and development, and also to verify a possible
91 methylation point in this site the possibility of this polymorphic site being target by
92 epigenetic marks.

93

94 MATERIALS AND METHODS

95 Animals and DNA isolation

96 DNA was isolated from peripheral blood samples of 133 animals of the *Bos Taurus* and
97 *Bos Indicus* Gir (66), Guzera (41) and Nelore (26). A total of 39 Gir animals belonged to
98 the APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Nordeste Paulista) and 27
99 belonged to a private farm. All Guzera and Nelore animals belonged to farms participating
100 in the Breeding Program for Nelore and Guzera Cattle, (PMGRN and PMGRG).

101 Approximately 10 ml of peripheral blood was withdrawn from each animal, by an
102 authorized veterinarian, into tubes containing EDTA. The DNA extraction was carried out
103 following the modified protocols of Olerup and Zetterquist (1992).

104

105 Detection of polymorphism and genotyping

106 A 351-bp fragment, comprising a portion of the promoter region of the bovine *CYP21* gene
107 (Figure 1), was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). The primer sequences
108 were obtained from the promoter region of the *CYP21* gene (GenBank accession number

109 MI1267). Sequences of the forward and reverse primers were 5'
110 CCCACCGAGTCCTGCCAC 3' and 5' GAGGGGGCAGTTGAAGGAC 3', respectively.
111 The PCR was carried out at a final volume of 25 μ l [50 mM of MgCl₂, 1.5 μ l of 10X PCR
112 buffer, 5 pmol (10pmol/ μ l) of each primer, 0.25mM dNTPs and 0.2U of Taq DNA
113 polymerase (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK)]; 50ng of genomic DNA was used
114 per reaction. The cycle conditions were 5 minutes at 94°C, followed by 40 cycles (30
115 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C), and a final extension step for 10
116 minutes at 72°C. The following thermal profile was performed in a T Gradient
117 thermocycler (Whatman Biometra – Gottingen, Gemany). The PCR products were
118 separated on 2% agarose gels and visualized using ethidium bromide and a gel
119 documentation system. The PCR fragments were digested in a final volume of 10 μ l,
120 containing 3 μ l of PCR product, 4U of the restriction endonuclease *HpaII* (New England
121 Biolabs - Beverly, MA) supplemented with the recommended 1X digestion buffer
122 (NEBuffer 1, 10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol). Digestion
123 was performed at 37°C overnight, heat inactivated at 65°C for 20 minutes and visualized
124 using electrophoresis on a 10% acrylamide gel stained with silver nitrate 0.2%.

125

126 **Bioinformatics analysis of BovA2/*HpaII* polymorphisms**

127 The sequences were analyzed using bioinformatics tools including search for identification
128 of Sp1 sites (Searching Transcription Factor Binding Sites)
129 (www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2; <http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp>).

130

131 **Analysis of DNA methylation on the C allele**

132 Genomic DNA samples (100ng per reaction) of heterozygous Nelore, Gir and Guzera
133 animals were digested with the *HpaII* enzyme (a methylation sensitive endonuclease) and a

134 separate sample was digested with the *HpaII* isoschizomer, *MspI* (which is methylation
135 non-sensitive), prior to PCR. The undigested control and the digested *HpaII* and *MspI*
136 samples were amplified with the primers for the bovine *CYP21* BovA2 polymorphism. The
137 PCR products were submitted to a second round of digestion with the *HpaII* enzyme to
138 verify the methylation status of the "C allele" in this specific BovA2 element (Figure 2).

139

140

141 RESULTS

142 The authors identified the Bov-A2/*HpaII* polymorphism (T/C changed) with allelic
143 frequencies of 0.18, 0.30 and 0.34 (C); 0.82, 0.69 and 0.65 (T), respectively for Gir, Guzerá
144 and Nelore (Table 1) and genotypic frequencies of 0.06 for CC, 0.51 for TT and 0.44 for
145 CT, in these animals, where a high frequency of heterozygotes and TT homozygotes were
146 observed (Figure 3). The results of the allele specific methylation assay demonstrated that
147 the cytosine residue in the CpG motif, when it occurs at the C allele, is methylated in all
148 heterozygous Nelore, Gir and Guzerá animals (Figure 2).

149

150

151

152 DISCUSSION

153 Bov-A2 polymorphism was first identified by Damiani *et al* (2000a) through the PCR
154 amplification of a fragment containing the Bov-A2 element in the promoter region of the
155 *CYP21* gene followed by direct sequencing of its product. Figure 1 shows the *locus* of the
156 *CYP21* gene with the polymorphism Bov-A2/*HpaII* in the promoter region of this gene.
157 The genotypic frequencies showed a high percentage of heterozygotes (CT) and
158 homozygotes (TT) animals in all breeds studied (Figure 3). It is not clear yet if this Bov-A2

159 element and its polymorphism may have any effect on the expression of the *CYP21* gene.
160 The allele specific methylation assay demonstrated that the cytosine residue in the CpG
161 motif, when it occurs at the C allele, is methylated in all heterozygous animals. The T>C
162 mutation could also create a CpG motif, which could be a possible DNA methylation site.
163 Loss of methylation points, especially in promoters regions, could be hypothesized as
164 influencing the transcriptional control.

165 Transitional-CpG methylation between unmethylated promoters and nearby
166 methylated retroelements plays a role in the establishment of tissue-specific transcription.
167 A series of evidences show that retroelement methylation is prevented at the unmethylated
168 CpG islands and promotes the methylation of the non-island-CpG sites (Jung *et al*, 2008).
169 Aberrant DNA methylation patterns in the retroelement sequences are thought to permit the
170 reactivation of transpositional events and allow regulatory elements into the “parasites”
171 that act on the transcriptional control of the neighboring genes (Martin, 2006). Some
172 classic examples of aberrant gene regulation influenced by gene associated
173 retrotransposons are reported at mouse *agouti viable yellow* (A^Y) and *axin fused* ($Axin^{Fb}$)
174 alleles (Dolinoy *et al*, 2007). It is unknown if similar effect occur in bovines, but the
175 erasing of the CpG motif on a putative Sp1 binding site in a promoter region could provide
176 a candidate model for this event. The SNP (*HpaII/BovA2* polymorphism) is overlapped by
177 a putative Sp1 transcription factor binding site (Figure 1). The genetic and epigenetic
178 features of this SNP will contribute to a possible functional effect on the regulation of the
179 bovine *CYP21* gene.

180 The present study verified the frequencies (homozygote and heterozygote) of
181 *HpaII/BovA2* polymorphism in Brazilian Zebu breeds (*Bos Taurus* and *Bos Indicus*) and is
182 the first association of the genetic variability of this locus as a possible source of epigenetic
183 variability at the same genomic position. The three genotypes CC, CT and TT for this locus

184 should influence bovine *CYP21* expression, possibly by genetically mediating epigenetic
185 variability.

186

187 ACKNOWLEDGEMENTS

188 We thank APTA, PMGRN, and PMGRG for providing DNA and blood samples. This
189 work was supported by PRONEX, FAPESP (2005/00616-5, 2007/56554-3 and
190 2008/53804-1), CNPq (408856/2006-8 and 143156/2006-3), FAEPA, ANCP, and CAPES.

191

192 REFERENCES

- 193 Angiolillo, A., Amills, M., Urrutia, B., Doménech, A., Sastre, Y., Badaoui, B., Jordana, J.,
194 2007. Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine
195 acyl-coenzyme A, diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene. *J. Dairy Res.* 74,
196 47-51.
- 197 Chung, B.C., Matteson, K.J., Miller, W.L. 1986. Structure of a bovine gene for P450c21
198 (steroid 21 hydroxylase) defines a novel cytochrome P 450 gene family). *Proc. Natl.*
199 *Acad. Sci.* 83, 4243-4247.
- 200 Daetwyler, H.D., Schenkel, F.S., Sargolzaei, M., Robinson, J.A., 2008. A genome scan to
201 detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using
202 two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J. Dairy Sc.* 91, 3225-
203 3236.
- 204 Damiani, G., Florio, S., Budelli, E., Bolla, P., Caroli, A., 2000a. HpaII PCR-RFLP within a
205 Bov-A2 element in the promoter of the bovine *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) gene.
206 *Anim. Genet.* 31, 154-155.

- 207 Damiani, G., Florio, S., Budelli, E., Bolla, P., Caroli, A., 2000b. Single nucleotide
208 polymorphisms (SNPs) within Bov-A2 SINE in the second intron of bovine and buffalo
209 k-casein (CSN3) gene. *Anim. Genet.* 31, 277-279.
- 210 Dolinoy, D.C., Weidman, J.R., Jirtle, R.L., 2007. Epigenetic gene regulation: linking early
211 developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.* 23, 297-307.
- 212 Druker, R., Whitelaw, E., 2004. Retrotransposon-derived elements in the mammalian
213 genome: a potential source of disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 319-330.
- 214 Gartler, S.M., Riggs, A.D., 1983. Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu. Rev.*
215 *Genet.* 17, 155-90.
- 216 Grisolia, A.B., Curi, R.A., De Lima, V.F., Olmedo, H.P., Kmiec, E., Nunes, C.M., Aoki,
217 S.M., Garcia, J.F., 2009. Targeted nucleotide exchange in bovine myostatin gene.
218 *Anim. Biotechnol.* 20, 15-27.
- 219 Hizer, S.E., Tamulis, W.G., Robertson, L.M., Garcia, D.K., 2008. Evidence of multiple
220 retrotransposons in two litopenaeid species. *Anim. Genet.* 39, 363-73.
- 221 Jung, Y.C., Hong, S.J., Kim, Y.H., Kim, S.J., Kang, S.J., Choi, S.W., Rhyu, M.G., 2008
222 Chromosomal losses are associated with hypomethylation of the gene-control regions
223 in the stomach with a low number of active genes. *J. Korean Med. Sci.* 23, 1068-1089.
- 224 Kubis, S.E., Castilho, A.M., Vershinin, A.V., Heslop-Harrison, J.S., 2003. Retroelements,
225 transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and
226 the relationship to somaclonal variation. *Plant. Mol. Biol.* 52, 69-79.
- 227 Lenstra, J.A., van Bostel, J.A., Zwaagstra, K.A., Schwerin, M., 1993. Short interspersed
228 nuclear element (SINE) sequences of the Bovidae. *Anim. Genet.* 24, 33-39.
- 229 Martin, S.L., 2006. The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During
230 L1 Retrotransposition. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006:45621.

- 231 Morse, B., Rotherg, P.G., South, V.J., Spandorfer, J.M., Astrin, S.M., 1988. Insertional
232 mutagenesis of the *myc* locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma.
233 *Nature* 333, 87-90.
- 234 New, M.I., 2006. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J.*
235 *Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4205-4214.
- 236 Nijman, I.J., van Tessel, P., Lenstra, J.A., 2002. SINE retrotransposition during the
237 evolution of the Pecoran ruminants. *J. Mol. Evol.* 54, 9-16.
- 238 Olerup, O., Zetterquist, H., 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-
239 specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in
240 clinical practice including donor-recipients matching in cadaveric transplantation.
241 *Tissue Antigens.* 39, 225-235.
- 242 Onami, J., Nikaido, M., Mannen, H., Okada, N., 2007. Genomic expansion of the Bov-A2
243 retroposon relating to phylogeny and breed management. *Mamm. Genome* 18, 187-196.
- 244 Ramos, K.S., 2009. Unraveling genetic regulatory networks of mammalian retroelements.
245 *BMC Proc.* 3 (Suppl 2), S3.
- 246 Rincón, G., Islas-Trejo, A., Casellas, J., Ronin, Y., Soller, M., Lipkin, E., Medrano, J.F.,
247 2009. Fine mapping and association analysis of a quantitative trait locus for milk
248 production traits on *Bos taurus* autosome 4. *J. Dairy Sci.* 92, 758-764.
- 249 Rothschild, M.F. 2003. Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comp.*
250 *Funct. Genomics.* 4, 266-270.
- 251 Samarin, J., Cicha, I., Goppelt-Struebe, M., 2009. Cell type-specific regulation of CCN2
252 protein expression by PI3K-AKT-FoxO signaling. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 79-84.
- 253 Wang, Y., Leung, F.C., 2008. Comparative Genomic Study Reveals a Transition from TA
254 Richness in Invertebrates to GC Richness in Vertebrates at CpG Flanking Sites: An

- 255 Indication for Context-Dependent Mutagenicity of Methylated CpG Sites. *Genomics*
256 *Proteomics Bioinformatics*. 6, 144-154.
- 257 Zwolińska, K., 2006. Retroviruses-derived sequences in the human genome. *Human*
258 *endogenous retroviruses (HERVs)*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 60, 637-652.
- 259
- 260

261 **LEGENDS**

262

263 **Figure 1.** Schematic representation of the bovine *CYP21* gene sequence (GenBank
264 accession number M11267) [Chung *et al.* (1986), modified]. The black box represents a
265 351-bp fragment localized in the promoter region of the bovine *CYP21* gene and the open
266 boxes show exons 1 to 10. The circle indicates the polymorphism studied (BovA2/*Hpa*II
267 polymorphism). The sequences show the SNP underlined (with BovA2/*Hpa*II
268 polymorphism) overlapping a putative Sp1 transcription factor binding site (open box in
269 sequences) (www.generegulation.com/pub/programs/alibaba2; [http://tfbind.ims.u-](http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp)
270 [tokyo.ac.jp](http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp)).

271

272 **Figure 2.** (A) Acrylamide gel with polymorphism profile (heterozygote). (B) Allele
273 specific methylation assay. Genomic DNA of heterozygous animals were digested with
274 *Hpa*II and *Msp*I enzymes, prior to PCR. The digested samples were amplified. The PCR
275 products were submitted to a second round of digestion with the *Hpa*II enzyme to verify
276 the methylation status of the “C allele”, L: 100bp DNA marker.

277

278

279

280 **Figure 3.** Acrylamide gel with polymorphism profile and genotypic percentage observed in
281 the digestion of PCR products with enzyme *Hpa*II of DNA samples from Gir, Guzera and
282 Nelore breeds. L: 100bp DNA marker.

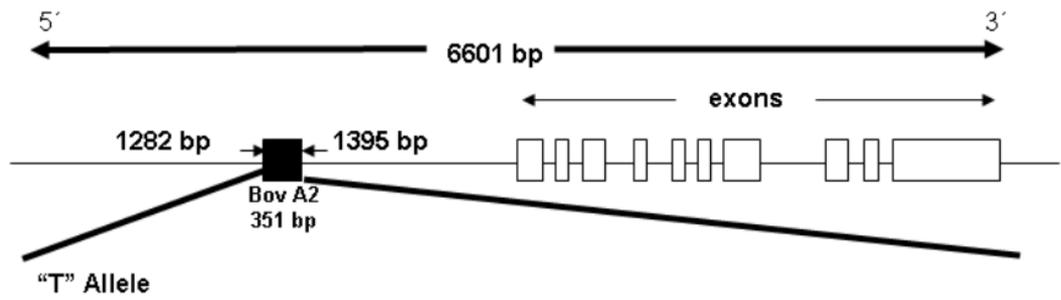
283

284

285

Table I. Allelic frequencies for Bov-A2/HpaII polymorphism in Gir, Guzerá and Nelore animals (N, total number of animals).

Breed	N	Allelic Frequency	
		C	T
Gir	66	0.1818	0.8181
Guzerá	41	0.3049	0.6951
Nelore	26	0.3461	0.6538
Total	133	0.2519	0.7481



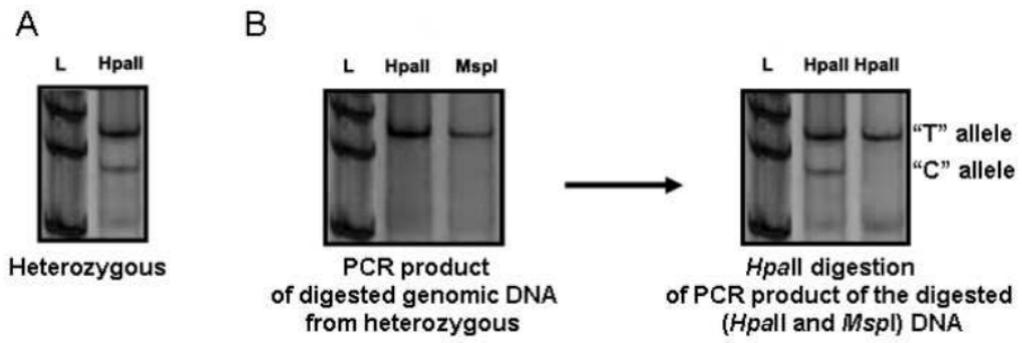
...TTTCCAGGCAAGAG **ACTGGAGTGGGG** GCCATTGCCTTCTCCGCTCTTTAGCATGACCTCTCCTTTAAGTCCTT...

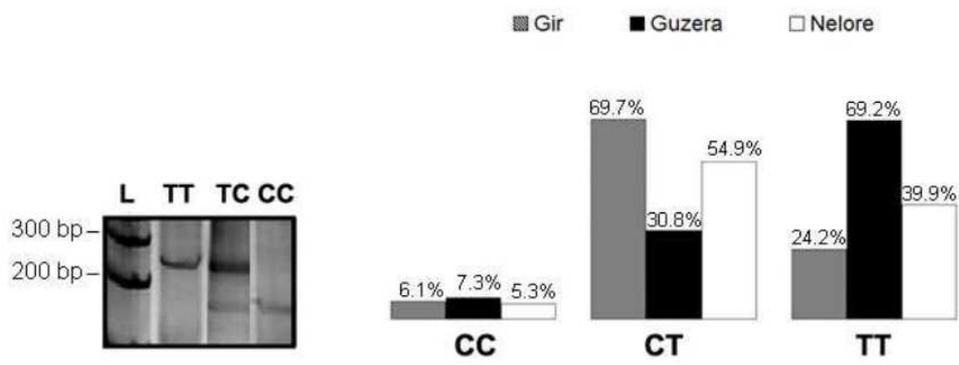
Sp1

"C" Allele

...TTTTCCAGGCAAGAGTA **CCGGAGTGGGG** GCCATTGCCTTCTCCGCTCTTTAGCATGACCTCTCCTTTAAGTC...

Sp1





22 **RESUMO**

23 O objetivo principal deste estudo foi analisar a ocorrência de dois SNPs (*Single nucleotide*
24 *polymorphisms*) dos genes *IGF2* e *CYP21* em bovinos da raça Nelore participantes de um
25 Programa de Melhoramento Genético. Os resultados mostram que os SNPs foram
26 encontrados no exon 6 do gene *IGF2* (Insulin-Like Growth Factor 2) bovino (RFLP/*MboII*)
27 bem como na região promotora do gene *CYP21* (Steroid 21-hydroxylase) (RFLP/*HpaII*)
28 nesses animais. As frequências genóticas evidenciaram alta incidência dos heterozigotos
29 TC quando comparados aos homozigotos CC e TT para o polimorfismo RFLP/*MboII*. A
30 frequência alélica para o polimorfismo RFLP/*HpaII* revelou alto valor do alelo T e a
31 população encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os SNPs estudados. A
32 associação desses polimorfismos com DEPs de algumas características reprodutivas e
33 produtivas foram investigadas, entretanto mostrou valores significativos apenas para
34 DP550 (*IGF2* - RFLP/*MboII*) e DP450 (*CYP21* - RFLP/*HpaII*). Este foi o primeiro estudo
35 da ocorrência desses dois polimorfismos nessas raças zebus.

36 **Palavras-chave:** SNPs, *IGF2*, *CYP21*, bovinos, associação genótipo-fenótipo.

37

57 **INTRODUÇÃO**

58 A pecuária de corte é uma das atividades econômicas mais relevantes do
59 agronegócio brasileiro e as raças zebuínas juntamente com seus cruzamentos representam
60 um grande percentual do total dessa população bovina. Os selecionadores estão sempre
61 atentos na busca de conhecimentos e na aplicação de novas tecnologias, visando o
62 incremento da rentabilidade de seus sistemas de produção e sua competitividade, para se
63 manterem no mercado. Entre as tecnologias envolvidas nos diversos segmentos do
64 processo produtivo, os Programas de Melhoramento Genético assumem papel relevante e
65 consideram a genética principal pilar ou instrumento condutor quando o objetivo é a
66 seleção de animais superiores para características de interesse econômico, para usar como
67 reprodutores nos rebanhos. As raças zebuínas juntamente com seus cruzamentos
68 representam um grande percentual do total da população bovina no Brasil estimada em
69 aproximadamente 160 milhões de cabeças, devido seu grande potencial de produção,
70 rusticidade e adaptação às diversas condições e regiões do país (ANUALPEC, 2007).

71 Atualmente, pesquisas na área de Biologia Molecular têm proporcionado à geração
72 de técnicas e conhecimentos que auxiliam e complementa o Melhoramento Genético
73 Animal tradicional, intensificando pesquisas sobre ocorrência de diferentes tipos de
74 marcadores moleculares no genoma bovino com a finalidade de agregar mais informações
75 aos estudos de características quantitativas de interesse zootécnico (Regitano, 2005; Garcia,
76 2006). A aplicação direta das técnicas moleculares tem permitido detectar polimorfismos
77 do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) caracteristicamente abundantes no genoma
78 e, mais recentemente, evidenciadas em pesquisas sobre a associação genótipo-fenótipo,
79 com o intuito de observar possíveis variações genótípicas que estejam relacionadas com
80 características fenotípicas (Andréa et al., 2007; de Souza et al., 2007; Carrijo et al., 2008;

81 Caetano, 2009; Curi et al., 2009).

82 O desenvolvimento do projeto de sequenciamento do genoma bovino (The Bovine
83 HapMap Consortium, et al., 2009) liderado por pesquisadores do Baylor College of
84 Medicine (BCM), Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – ARS) e
85 Universidade de Georgetown, representou um grande avanço nessa área.

86 Como reflexo da demanda crescente por reprodutores, principais responsáveis pela
87 maior parte do progresso genético alcançado pelas populações bovinas, o país procura
88 investir na identificação de animais geneticamente superiores, oriundos dos diversos
89 Programas de Melhoramento Genético das raças zebuínas em andamento disponibilizando
90 no mercado animais que transmitam precocidade, maior eficiência reprodutiva e velocidade
91 de ganho de peso, entre outras características de interesse. As avaliações genéticas
92 realizadas periodicamente por esses Programas permitem agrupar animais que possuam um
93 perfil genético mais adequado para cada sistema de produção das diversas regiões do país,
94 visando uma exploração sustentável (Lôbo, 2000; Lôbo, 2001; Lôbo, 2002; Freitas, 2004;
95 Freitas e Cardoso, 2005; Regitano, 2005; www.abcz.org.br, Lôbo, 2010).

96 A associação de características fenotípicas e a aplicação de seleção assistida por
97 marcadores (MAS) permitem favorecer um padrão apropriado de seleção para os
98 produtores, pois a aferição das informações é conduzida em animais ainda jovens, o que
99 possibilita um manejo adequado à expressão de seu potencial genético (Goodard e Hayes,
100 2007). De acordo com Meuwissen et al. (2001), os estudos abordando os aspectos de
101 produção e fertilidade tem contribuído para relacionar raças que são melhoradas
102 especificamente, caso da raça holandesa, para a produção de leite (*Bos taurus taurus*) e das
103 raças zebuínas pela sua adaptação aos trópicos e tolerância às mais variadas condições
104 climáticas e de ambiente (*Bos taurus indicus*).

105 Recentemente a genética molecular tem mostrado grande avanço principalmente
106 devido às facilidades resultantes do desenvolvimento de métodos de análise de material
107 genético usando grande número de amostras com a redução nos custos das mesmas
108 (Suekawa et al., 2010; Garrick e Golden, 2009). Atualmente, grupos de pesquisa de
109 diversos países (Holanda, Nova Zelândia, Estados Unidos da América e Austrália) já
110 realizam pesquisas utilizando-se dessa tecnologia para estudos com bovinos. A decisão da
111 seleção baseada no valor genético genômico (*Genomic Evaluation Breeding Value* -
112 GEBV) é calculada com a soma dos efeitos dos marcadores dos GEBVs distribuídos em
113 todo genoma capturando todos os QTLs potenciais que contribuam para a variação da
114 característica (Hayes et al., 2009).

115 Regiões específicas dos genes *IGF2* e *CYP21* foram analisadas com a intenção de
116 auxiliar e fornecer informações complementares aos Programas de Melhoramento
117 Genético. O polimorfismo RFLP/*Mbo*II está situado no exon 6 do gene *IGF2* (*insulin-like*
118 *growth factor 2*), localizado no cromossomo 29 em bovinos, que desempenha um papel
119 importante e essencial na proliferação e diferenciação celular para o crescimento do
120 embrião em mamíferos (Flisikowski et al., 2005). O polimorfismo RFLP/*Hpa*II encontra-se
121 no elemento Bov-A2 (considerado um elemento SINE - *Short Interspersed Nucleotide*
122 *Element*) presente na região promotora do gene *CYP21* (*Steroid 21-hydroxylase gene*) no
123 cromossomo 23 em bovinos. Em humanos este gene está envolvido na síntese
124 de hormônios esteróides, e sua mutação está associada com hiperplasia adrenal congênita
125 (Damiani et al., 2000). Assim, esse estudo procurou identificar alguns SNPs importantes
126 em bovinos da raça Nelore e relacionar aspectos do genótipo que possam estar associados
127 com algumas DEPs (Diferenças Esperadas na Progênie) para características reprodutivas e
128 de crescimento nestes animais.

129 MATERIAL E MÉTODOS

130 O DNA genômico foi isolado a partir de amostras de sêmen de 147 bovinos da raça
131 Nelore participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN)
132 sob gestão da ANCP (Associação Nacional dos Criadores e Pesquisadores) em Ribeirão
133 Preto/SP. A extração de DNA foi conduzida conforme protocolo desenvolvido por Olerup e
134 Zetterquist (1992) com modificações. As amostras foram genotipadas através do método
135 PCR-RFLP com iniciadores específicos para cada região polimórfica (*IGF2* –
136 RFLP/*Mbo*II: forward 5'GCCTCTCGCTGTCCTCTC 3' e reverse
137 5'CAGCCCGTCCTCCCTAAAG 3'; *CYP21* - RFLP/*Hpa*II: forward 5'
138 CCCACCGAGTCCTGCCAC 3' e reverse 5'GAGGGGGCAGTTGAAGGAC 3'). As
139 frequências alélica e genotípica da população foram calculadas e o equilíbrio de Hardy-
140 Weinberg foi avaliado pelo teste do qui-quadrado (χ^2) considerando o nível de
141 significância de 5% através do software Microsoft Excel.

142 A associação dos haplótipos dos genes *IGF2* e *CYP21* com as características de
143 crescimento e reprodução consideradas foram estimadas em 105 animais do total de 147
144 genotipados. A metodologia utilizada para a estimação dos efeitos médios dos genes foi a
145 dos modelos mistos (BLUP - *Best Linear Unbiased Prediction*), a mesma normalmente
146 utilizada nas avaliações genéticas dos rebanhos participantes do PMGRN (Boldman et al.,
147 1993). A correção dos testes de hipóteses para múltiplas comparações foi conduzida através
148 do método de Bonferroni (Bland e Altman, 1995).

149 O modelo linear utilizado para ajuste das variáveis quantitativas incluiu o genótipo
150 dos animais e os efeitos dos grupos contemporâneos. A definição de grupos
151 contemporâneos inclui variações do grupo genético, sexo, idade e origem da fazenda; essas

152 variações podem não ser consideradas separadamente no modelo. As DEPs das
153 características analisadas foram: peso aos 120, 240, 365, 455 e 550 dias de idade, perímetro
154 escrotal aos 365, 455 e 550 dias de idade e o efeito direto da idade ao primeiro parto
155 (DDIPP). As DEPs DP120 e DP240 representam a diferença esperada na progênie para
156 efeito direto no peso aos 120 e 240 dias de idade indicando a diferença em quilogramas
157 esperados com relação à média da progênie, ou base genética de referência, devido aos
158 genes para crescimento passados pelos seus pais. As DEPs DP365, DP455 e DP550
159 indicam a diferença esperada na progênie para efeito direto no peso aos 365, 455 e 550 dias
160 de idade e prediz a habilidade de um animal em transmitir genes para crescimento pós-
161 desmame para estas características, onde o componente mais importante é o efeito genético
162 direto. As DEPs relacionadas ao perímetro escrotal DPE365, DPE455 e DPE550 fornecem
163 a diferença esperada na progênie para efeito direto para o perímetro escrotal aos 365, 455 e
164 550 dias de idade e consideradas como preditores da habilidade do animal em transmitir
165 genes para crescimento testicular à sua progênie; são características extremamente
166 importantes na seleção de bovinos de corte, devido à correlação favorável que apresentam
167 com a fertilidade e a precocidade sexual. A DIPP é a diferença esperada na progênie para
168 efeito direto na idade ao primeiro parto que prediz a habilidade de um animal em transmitir
169 genes para idade ao primeiro parto à sua progênie influenciando diretamente a precocidade
170 sexual e com consequências sobre a produtividade (www.ancp.org.br).

171 Nas análises estatísticas foram utilizados os registros de produção de todos os filhos
172 dos touros genotipados e dos outros animais que compartilharam o grupo de
173 contemporâneos com pelo menos um dos filhos destes touros, acrescido do efeito da
174 probabilidade do animal ter recebido do pai o alelo menos frequente de cada locus. O
175 método BLUP envolve a solução de equações para cada grupo de contemporâneos

176 juntamente com uma equação para cada animal e usa as informações de parentesco entre
177 todos os animais utilizados para formar uma matriz. Esse método é comumente utilizado
178 para cálculo das DEPs e requerem estimativas dos parâmetros genéticos, variâncias e
179 covariâncias genéticas e de ambiente das características.

180 O modelo de análise do PMGRN inclui efeito genético do animal, efeito genético
181 materno e de ambiente permanente (P120 e P240), efeito permanente de ambiente (P120,
182 P240, P365 e PE365), erro aleatório, efeito fixo de idade da vaca ao parto e grupo de
183 contemporâneos. O efeito genético materno foi incluído apenas para análise dos pesos aos
184 120 e 240 dias e o efeito materno de ambiente para os pesos aos 120, 240 e 365 dias e para
185 o perímetro escrotal aos 365 dias. Os parâmetros genéticos necessários para realização das
186 análises foram também os mesmos utilizados nas avaliações genéticas do PMGRN/ANCP.

187

188 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

189 A partir da genotipagem dos 147 animais foram calculadas as frequências alélica e
190 genotípica para os polimorfismos *IGF2* RFLP/*Mbo*II e *CYP21* RFLP/*Hpa*II.

191 Os resultados apresentados mostram que as frequências genotípicas obtidas para o
192 polimorfismo *IGF2* - RFLP/*Mbo*II foram de 25% para CC; 25% para TT e 50% para TC e
193 que as frequências alélicas para o C e o T foram de praticamente 50% para cada alelo
194 (Tabela 1). O alelo C corresponde ao polimorfismo sem a troca nucleotídica C por T onde
195 foi possível observar um equilíbrio na proporção desses alelos nos resultados de
196 genotipagem dos animais.

197 Com relação ao polimorfismo *CYP21* - RFLP/*Hpa*II foram observados
198 predominância das frequências TT (92%), 1% para CC e 7% para CT. As frequências
199 alélicas para o T e o C foram de 96 e 4%, respectivamente, para cada alelo. A alta
200 incidência do alelo T indica que a maioria dos animais não apresentou o genótipo com a
201 substituição do nucleotídeo T por C revelando predominância dos homozigotos TT na
202 população estudada (Tabela 1).

203 Tabela 1 - Frequências alélica e genotípica e valor do teste de qui-quadrado (χ^2) para os
204 polimorfismos *IGF2* RFLP/*Mbo*II e *CYP21* RFLP/*Hpa*II.

	<i>IGF2</i> RFLP/ <i>Mbo</i> II			<i>CYP21</i> RFLP/ <i>Hpa</i> II		
Frequência	C	T		T	C	
Alélica	0,5034	0,4965		0,9557	0,0442	
Frequência	CC	TT	TC	TT	CC	CT
Genotípica	0,2517	0,2449	0,5034	0,9183	0,0068	0,0748
χ^2 *	0,0069			1,9339		

205 * χ^2 = 1 grau de liberdade ($P < 0,05$)

206 Um grupo de 105 animais participantes de um Teste de Touros Jovens e seus
207 respectivos registros produtivos e reprodutivos foi selecionado para avaliar a probabilidade
208 de cada animal ter recebido do pai o alelo menos frequente para cada locus baseado nos
209 genótipos dos animais analisados e nas frequências alélicas estimadas na população total.

210 A análise estatística realizada objetivou verificar uma possível associação dos
211 polimorfismos detectados (genótipo) com o fenótipo dos animais representado pelas DEPs
212 (Diferenças Esperadas na Progênie) para nove características produtivas e reprodutivas
213 estimadas pelo PMGRN. As DEPs representam metade do valor genético de cada
214 progenitor e são usadas para comparar o mérito genético dos animais para características na
215 predição do desempenho dos futuros descendentes (Paneto et al., 2009). Essa medida é
216 expressa na unidade da característica (ex: kg para peso, cm para perímetro escrotal e
217 meses para idade ao primeiro parto), com sinal positivo ou negativo (www.ancp.org.br). De
218 outra forma a DEP prediz o mérito genético médio dos gametas passados de pai para filho
219 e, embora possua cálculo complexo, é de fácil interpretação pelos produtores para uso em
220 seus rebanhos.

221 O efeito médio da substituição do alelo menos frequente, assim como o erro padrão,
222 teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni estimados para cada característica
223 constam na tabela 2.

224

225 Tabela 2 - Efeito médio, erro padrão, teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni
 226 estimados para as características sob efeito do alelo menos frequente na população
 227 (polimorfismo *IGF2* RFLP/*MboII*).

Características	Efeito Médio(kg)	Erro padrão	t	P<t	Bonferroni
DPE365***	0,0150	0,1595	0,0939	0,4626	1,00
DPE455***	0,1998	0,2193	0,9107	0,1812	1,00
DPE550***	0,2655	0,3391	0,7831	0,2168	1,00
DIPP	-0,1317	0,4075	0,3231	0,3733	1,00
DP120**	0,8737	0,8239	1,0604	0,1445	1,00
DP240**	1,0407	1,3248	0,7856	0,2161	1,00
DP365**	4,0209	1,5532	2,5888	0,0048	0,09
DP455**	4,1152	1,7448	2,3586	0,0092	0,17
DP550**	8,0494	2,7076	2,9729	0,0015	0,03*

228 *teste significativo; P<0,05

229 ** kg

230 ***cm

231 A análise da associação entre o polimorfismo *IGF2* – RFLP/*MboII* e as
 232 características reprodutivas e produtivas não revelou efeitos significativos para a maior
 233 parte das mesmas, exceto para peso aos 550 dias de idade conforme pode ser observado na
 234 tabela 2. O efeito da substituição do alelo T por C foi positivo para o polimorfismo do gene
 235 *IGF2* (o alelo menos frequente na população foi o que não houve alteração nucleotídica no
 236 sítio polimórfico). A característica de peso representada pela DEP DP550 foi considerada a
 237 única estatisticamente significativa (3%) segundo o teste de Bonferroni.

238 De acordo com efeito médio da substituição, cada animal que recebeu o alelo T
 239 (menos frequente na população) transmitiria a sua progênie uma superioridade média de
 240 8kg em relação ao seus contemporâneos.

241 Até o ano de 2009, cerca de 500 touros oriundos de 123 fazendas participantes do
 242 referido programa vem sendo avaliados com o propósito de futura multiplicação daqueles
 243 positivos nos rebanhos comerciais por meio da técnica de inseminação artificial. Desse
 244 total, 25% foram analisados neste estudo. Importante mencionar, que por se tratar de

245 animais pertencentes a um grupo diferenciado (animais pré-escolhidos para teste), os
 246 resultados obtidos no presente estudo podem carregar algum viés, portanto devem ser
 247 vistos com determinada cautela.

248 Na tabela 3, verifica-se que não houve efeito significativo para a associação do
 249 genótipo referente ao polimorfismo *CYP21* - RFLP/*HpaII* com os dados fenotípicos da
 250 mesma população de touros jovens analisada no polimorfismo anterior. O efeito da
 251 substituição do alelo C (alelo menos frequente na população) para o polimorfismo foi
 252 positivo apenas para a característica de peso aos 455 dias de idade. O teste de Bonferroni
 253 apresentou significância (5%) e o efeito médio cada animal que recebeu o alelo C reduziu
 254 em 10,2 kg a cada animal da progênie. O fato de a amostra ser constituída por animais em
 255 teste de progênie, também pode estar influenciando esses resultados.

256 Tabela 3 - Efeito médio, erro padrão, teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni
 257 estimados para as características sob efeito do alelo menos frequente na população
 258 (polimorfismo *CYP21* RFLP/*HpaII*).

Características	Efeito Médio(kg)	Erro padrão	t	P<t	Bonferroni
DPE365***	-0,5176	0,3503	1,4776	0,0698	1,00
DPE455***	-1,0509	0,4621	2,2744	0,0115	0,21
DPE550***	-0,3461	0,6939	0,4988	0,3090	1,00
DIPP	0,3675	0,9651	0,3808	0,3517	1,00
DP120**	-1,2296	1,7803	0,6907	0,2449	1,00
DP240**	-5,1653	2,8369	1,8208	0,0343	0,62
DP365**	-7,1020	3,4171	2,0784	0,0188	0,34
DP455**	-10,2908	3,7347	2,7555	0,0029	0,05*
DP550**	-5,4879	6,0385	0,9088	0,1817	1,00

259 *teste significativo; P<0,05

260 ** kg

261 ***cm

262 Vários estudos envolvendo o perfil alélico apresentado por SNPs em uma população
 263 vêm sendo conduzidos em bovinos (Damiani et al., 2000; Flisikowski et al., 2005; de
 264 Souza et al., 2007; Andréa et al., 2007; Biase et al., 2007; Bagnicka et al., 2009; Curi et al.,

265 2009; Souza et al., 2009). Como exemplo descrito na literatura, uma genotipagem de DNA
266 de sêmen de 331 animais de raças leiteiras mostraram uma alta incidência de um alelo A a
267 partir de um polimorfismo detectado no gene *DGATI*, indicando uma possibilidade de
268 associação com dados observados de produção de leite (Lacorte et al., 2006) confirmando
269 estudos anteriores e ressaltando a importância do achado para estudos usando Seleção
270 Assistida por Marcadores.

271 Tabela 4 - Efeito médio, erro padrão, teste t de *Student*, probabilidade e teste de Bonferroni estimados para as características sob efeito
 272 do alelo menos frequente na população (polimorfismo *CYP21* RFLP/*HpaII*).

Características	N total	<i>IGF2</i> – RFLP/ <i>MboII</i>				<i>CYP21</i> – RFLP/ <i>HpaII</i>			
		Média	CC	TT	TC	Média Geral	TT	CC	CT
DP120*	199.207	126,5	127,29 (6.039)	131,2 (1.896)	127,9 (15.715)	126,5	127,9 (23.230)	129,9 (74)	132,7 (346)
DP240*	152.859	183,9	184,03 (4.448)	192,1 (1.454)	186,2 (12.630)	183,9	186,1 (18.181)	179,0 (27)	191,6 (324)
DP365*	132.444	236,0	35,73 (3.452)	241,6 (1.122)	41,1 (10.647)	236,0	240,0 (14.913)	214,7 (19)	235,0 (289)
DP455*	111.205	272,8	270,99 (2.893)	279,6 (947)	279,2 (9.205)	272,8	277,6 (12.751)	245,8 (19)	270,4 (275)
DP550*	61.908	317,7	314,34 (1.945)	323,9 (544)	322,3 (5.810)	317,7	321,0 (8.119)	325,4 (7)	300,4 (173)
DPE365**	45.973	20,1	19,68 (1.053)	20,6 (391)	20,2 (3.871)	20,1	20,2 (5.229)	20,0 (4)	20,4 (82)
DPE455**	45.539	23,0	22,09 (1.115)	23,6 (368)	23,1 (4.053)	23,0	22,9 (5.425)	23,3 (7)	22,7 (104)
DPE550**	22.763	26,3	25,09 (711)	26,9 (153)	26,2 (2.316)	26,3		27,1 (4)	25,1 (68)
DIPP							5,3 (25.533)		

273 * kg
 274 **cm

275 A capacidade reprodutiva do animal portador de determinado gene vai depender da
276 frequência desse gene na população, do tamanho da mesma e dos genótipos dos outros
277 indivíduos. Na seleção a variabilidade genética aditiva é ferramenta fundamental devido
278 aos efeitos dos genes que se somam para serem transmitidos as sua descendência.

279 Em estudo com novilhas da raça Nelore, para verificar a ocorrência de
280 polimorfismos nos genes relacionado à enzima P450 (membro dos genes *CYP*) e prolactina,
281 associadas à Idade ao Primeiro Parto como indicadora de precocidade, Andréa e
282 colaboradores (2007) não observaram essa associação fazendo com que os autores
283 sugerissem o uso de outras características para investigar essa possível relação. Em suínos,
284 Moe et al. (2009) estudando diferentes SNPs no gene *CYP21* suíno relacionados a
285 características de reprodução também não verificaram associação significativa com os
286 níveis de esteróides estipulados.

287 Foram observados polimorfismos do gene MUC relacionado à proteção e adesão
288 celular no útero de novilhas; os polimorfismos foram associados com taxa de gestação e
289 DEPs em novilhas da raça Nelore e revelaram que a ausência do polimorfismo pode
290 constituir uma característica específica de *Bos taurus indicus* (de Souza et al., 2007).
291 Outras pesquisas com relação a estudos de SNPs na raça Nelore foram realizadas por Curi
292 et al., 2005, Biase et al., 2007; Curi et al., 2009, Grisolia et al., 2009, Ferraz et al., 2009 e
293 Souza et al., 2010.

294 Grisolia e colaboradores (2009) estudaram 14 SNPs na região codificadora do gene
295 da miostatina (com 8 alterações na proteína comparadas com sequências do gene para
296 musculatura dupla bovina) em bovinos da raça Nelore. Zhang et al. (2009) em pesquisa
297 com cruzamentos de fêmeas (Hereford, Angus, Brangus, Beefmaster, Romosinuano e
298 Bonsmara) a partir de inseminação artificial de sêmen de machos da raça Angus

299 observaram a ocorrência de SNPs na região promotora do gene acetil CoA carboxilase
300 associados com composição de gordura na carne. Bagnicka et al. (2009) associaram
301 polimorfismos nos exons 2 e 10 no gene *IGF2* com características de produção de leite em
302 238 vacas Polish Holstein-Friesian em análises individuais e compostas com o grupo de
303 animais. Kemenes et al. (1999) observaram genes candidatos associados com proteínas do
304 leite no eixo somatotrófico e em antígenos linfocitários em sete raças distribuídas em dois
305 grupos (zebuíno e europeu) revelando considerável similaridade entre as frequências
306 analisadas nas raças. Blott et al. (2003) observaram um polimorfismo no receptor do gene
307 de crescimento localizado no cromossomo 20 bovino associado com maior efeito na
308 composição e produção de leite.

309 Em uma associação de dois SNPs do gene *IGF2* com características ligadas a
310 produção de leite (em regiões não traduzidas nos exons 2 e 10) com características de
311 produção diária, conteúdo de gordura e lactose entre outros na raça Holandesa foram
312 encontradas diferenças estatisticamente significativas para a maioria das variáveis com
313 exceção para a lactose onde menores produções foram associadas ao genótipo CT/GT
314 (Bagnicka et al., 2009).

315

316

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 317
318 Andréa, M.V.; Meirelles, F.V.; Lôbo, R.B.; Millazzotto, M.P.; Marson, E.P.; Vila, R.A.;
319 Bittencourt, T.C.B.S.C.; Marcondes, C.R. (2007) Polimorfismos SSCP e a puberdade
320 em novilhas da raça Nelore. *Magistra*, v.19, p.198-203.
- 321 ANUALPEC, 2007. Anuário da Pecuária Brasileira, São Paulo: FNP, Consultoria &
322 Comércio, 2007.
- 323 Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Recuperado em 10 de dezembro de 2009, de
324 www.abcz.org.br.
- 325 Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores, Ribeirão Preto/São Paulo. Recuperado
326 em 10 de março de 2010, de <http://www.ancp.org.br>.
- 327 Bagnicka, E.; Siadkowska, E.; Strzałkowska, N.; Zelazowska, B.; Flisikowski, K.;
328 Krzyzewski, J.; Zwierzchowski, L. (2009) Association of polymorphisms in exons 2
329 and 10 of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene with milk production traits in
330 Polish Holstein – Friesian cattle. *Journal of Dairy Research*, p. 1-7.
- 331 Biase, F.H.; Meirelles, F.V.; Gunski, R.; Vozzi, P.A.; Bezerra, L.A.F.; Vila, R.A.; Rosa,
332 A.J.M.; Lôbo, R.B.; Martelli, L.R. (2007) Mitochondrial DNA single nucleotide
333 polymorphism associated with weight estimated breeding values in Nelore cattle (*Bos*
334 *indicus*). *Genetics Molecular Biology*, v. 30, p. 1058-1063.
- 335 Bland, J.M.; Altman, D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*,
336 v. 310(6973), p. 170.
- 337 Blott S.; Kim J.J.; Moision S.; Schmidt-Küntzel A. et al. (2003). Molecular dissection of a
338 quantitative trait locus. A phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane
339 domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on
340 milk yield and composition. *Genetics*, v. 163, p. 253-266.

341 Boldman, K.G. (1993) A Manual for Use of MTDFREML: A Set of Programs to Obtain
342 Estimates of Variances and Covariances. U.S. Department of Agriculture, Agriculture
343 Research Service.

344 Caetano, A.R. (2009). Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no
345 melhoramento animal e perspectivas para o futuro. Revista Brasileira de Zootecnia, v.
346 38, p. 64-71.

347 Carrijo, S.M.; Alencar, M.M.; Toral, F.L.B.; Regitano, L.C.A. (2008) Association of *PIT1*
348 genotypes with growth traits in Canchim cattle. Scientia Agricola. (Piracicaba, Brazil),
349 v. 65, p. 116-121.

350 Curi R.A.; Oliveira H.N.; Silveira A.C.; Lopes C.R. (2005). Effects of polymorphic
351 microsatellites in the regulatory region of *IGF1* and *GHR* on growth and carcass traits
352 in beef cattle. Animal Genetics, v. 36(1), p. 58-62.

353 Curi R.A.; Chardulo, L.A.L.; Mason, M.C.; Arrigoni, M.D.B.; Silveira, A.C.; Oliveira,
354 H.N. (2009). Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPNI* and *CAST* genes on
355 meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*.
356 Animal Genetics, v. 40, p. 456-462.

357 Damiani, G.; Florio, S.; Budelli, E.; Bolla, P.; Caroli, A. (2000). *HpaII* PCR-RFLP within a
358 Bov-A2 element in the promoter of the bovine *CYP21* (steroid 21-hydroxylase) gene.
359 Animal Genetics, v. 31(2), p. 154.

360 de Souza F.R.; Dentillo D.B.; Meola J.; Biase F.H.; Andréa M.V.; Vozzi P.A.; Lôbo
361 R.B.; Martelli L.R. (2007). The polymorphism in *MUC1* gene in Nelore cattle. Journal
362 of Animal Breeding of Genetics, v. 124(1), p. 42-46.

363 Ferraz, J.B.; Pinto, L.F.; Meirelles, F.V.; Eler J.P.; de Rezende, F.M.; Oliveira,
364 E.C.; Almeida, H.B.; Woodward, B., Nkrumah, D. (2009) Association of single

365 nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular*
366 *Research*, v. 8(4), p. 1360-1366.

367 Flisikowski K.; Adamowicz T.; Switonski M.; Hiendleder S.; Pareek C. (2005). Nucleotide
368 sequence and variation of *IGF2* gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle.
369 *Animal Biotechnology*, v. 16, p. 203-208.

370 Freitas, M.A.R. (2004). Seleção em bovinos de corte - importância do teste de touros
371 jovens. In 2º WORKSHOP EM GENÉTICA E MELHORAMENTO NA PECUARIA
372 DE CORTE, CD-ROM, FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.

373 Freitas, M.A.R.; Cardoso, V.L. (2005). Melhoramento Genético dos Bovinos Leiteiros:
374 Limitações e Oportunidades. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de
375 Zootecnia. Goiânia, GO.

376 Garcia, J.F. (2006). Utilização de marcadores moleculares para a seleção. In 2º Simpósio
377 Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR.

378 Garrick D.J.; Golden B.L. (2009) Producing and using genetic evaluations in the United
379 States beef industry of today. *Journal of Animal Science*, v. 87(14 Suppl), E11-8.

380 Goddard M.E.; Hayes B.J. (2007) Genomic selection. *Journal of Animal Breeding*
381 *Genetics*, v. 124, p. 323-330.

382 Grisolia, A.B.; Curi, R.A.; De Lima, V.F.; Olmedo, H.P.; Kmiec, E.; Nunes, C.M.; et al.
383 (2009). Targeted nucleotide exchange in bovine myostatin gene. *Animal*
384 *Biotechnology*, v. 20(1), p. 15-27.

385 Hayes, B.J.; Bowman, P.J.; Chamberlain, A.J.; Goddard, M.E. (2009) Invited review:
386 Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, v.
387 92, p. 433-443.

388 Kemenes P.A., Regitano L.C.A., Rosa A.J.M., Packer I.U., et al. (1999). κ -casein, β -

389 lactoglobulin and growth hormone allele genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá,
390 Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genetics and Molecular*
391 *Biology*, v. 22, p. 539-541.

392 Lacorte, G.A., Machado, M.A., Martinez, M.L., Campos, A.L., Maciel, R.P., Verneque,
393 R.S., Teodoro, R.L., Peixoto, M.G.C.D., Carvalho, M.R.S., Fonseca, C.G. (2006)
394 DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genetic and Molecular*
395 *Research*, v. 5(3), p. 475-482.

396 Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.;
397 Marcondes, C.R. (2000) *Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes*.
398 Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.

399 Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.;
400 Marcondes, C.R. (2001) *Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes*.
401 Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.

402 Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.;
403 Marcondes, C.R. (2002) *Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes*.
404 Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.

405 Lôbo, R.B.; Bezerra, L.A.F.; Oliveira, H.N.; Garneiro, A.V.; Schwengber, E.B.;
406 Marcondes, C.R. (2010) *Avaliação Genética de Animais Jovens, Touros e Matrizes*.
407 Ribeirão Preto, GEMAC /FMRP/ USP, 90p.

408 Meuwissen T.H.; Hayes, B.J.; Goddard, M.E. (2001) Prediction of total genetic value using
409 genome-wide dense marker maps. *Genetics*, v. 157, p. 1819-1829.

410 Moe, M.; Lien, S.; Aasmundstad, T.; Meuwissen, T.H.; Hansen, M.H.; Bendixen, C.;
411 Grindflek, E. (2009) Association between SNPs within candidate genes and
412 compounds related to boar taint and reproduction. *BMC Genetics*, v. 10(32), 14p.

413 Olerup, O.; Zetterquist, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-
414 specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in
415 clinical practice including donor-recipients matching in cadaveric transplantation.
416 *Tissue Antigens*, v. 39, p. 225-235.

417 Paneto J.C.C.; Bittar, E.R.; Barbosa, E.F.; Rocha, C.D.; Val, J.E.; Ferraudo, A.S.; Lôbo,
418 R.B. (2009) Causas de variação nos preços de bovinos nelore elite no Brasil. *Ciência*
419 *Rural*, Santa Maria, v. 39(1), p. 215-220.

420 Regitano, L.C.A. (2005). *Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento*. In: 42º Reunião
421 Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia, GO.

422 Souza F.R.; Mercadante M.E.; Fonseca L.F.; Ferreira L.M.; Regatieri I.C.; Ayres D.R.;
423 Tonhati H.; Silva S.L.; Razook A.G.; Albuquerque L.G. (2010) Assessment of DGAT1
424 and LEP gene polymorphisms in three Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth
425 and their relationship with growth and carcass traits. *Journal Animal Science*, v. 88(2),
426 p. 435-441.

427 Suekawa Y.; Aihara H.; Araki M.; Hosokawa D.; Mannen H.; Sasazaki S. (2010)
428 Development of breed identification markers based on a bovine 50K SNP array. *Meat*
429 *Science*, v. 85(2), p. 285-288.

430 The Bovine HapMap Consortium et al., (2009) Genome-wide survey of SNP variation
431 uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, v. 324(5926), p. 528-532.

432 Zhang, S., Knight, T.J., Reecy, J.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Cundiff, L.V., Beitz,
433 D.C. (2009) Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine acetyl-CoA
434 carboxylase - a gene with beef fatty acid composition. *Animal Genetics*
435 doi:10.1111/j.1365-2052.2009.02006.x