

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DA GRELINA
(*GHRL*) E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS
DE INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA
NELORE**

Camila Urbano Braz
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DA GRELINA
(*GHRL*) E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE
INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Camila Urbano Braz

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Co-orientadora: Dr^a. Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

B827p Braz, Camila Urbano
Polimorfismos no gene do hormônio da grelina (*GHRL*) e suas associações com características de interesse econômico em bovinos da raça Nelore./ Camila Urbano Braz. – Jaboticabal, 2012
vii, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Humberto Tonhati
Banca examinadora: Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo, Fábio Ricardo Pablos de Souza, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante
Bibliografia

1. *Bos taurus indicus*. 2. Haplótipos. 3. Intron. 4. Marcadores moleculares. 4. SNP. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

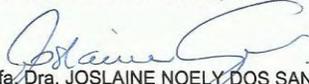
TÍTULO: POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DA GRELINA (GHRL) E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

AUTORA: CAMILA URBANO BRAZ

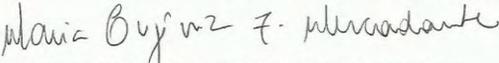
ORIENTADOR: Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JOSLAINE NOELY DOS SANTOS GONÇALVES CYRILLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JOSLAINE NOELY DOS SANTOS GONÇALVES CYRILLO
Instituto de Zootecnia / Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho.


Prof. Dr. FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. MARIA EUGENIA ZERLOTTI MERCADANTE
Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho / Instituto de Zootecnia

Data da realização: 30 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAMILA URBANO BRAZ – solteira, nascida em 25 de maio de 1988, na cidade de Araçatuba – SP, filha de Carlos Aparecido Braz e Marcia Maria Urbano de Souza. Iniciou em março de 2006 o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Ilha Solteira, obtendo o título de Zootecnista em dezembro de 2010. Durante a graduação realizou estágio em iniciação científica no Departamento de Física e Química da UNESP/FEIS, na área de química ambiental sob supervisão do Prof. Dr. Newton Luiz Dias Filho. Com o intuito de obter conhecimentos em melhoramento animal, realizou estágio no Núcleo de Manejo Racional – MANERA, na área de ambiência e bem-estar no manejo de bovinos de corte e equinos, sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Chiquitelli Neto. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal como bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq sob orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e co-orientação da Dr^a. Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo.

Dedico esse trabalho

À Deus por estar sempre comigo;

aos meus pais por sempre me apoiarem;

e ao Prof. Dr. Humberto Tonhati e a Dr^a Joslaine,

pelas oportunidades e atenção proporcionadas.

*“Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode
e que o medo impeça de tentar.”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente, a Deus, por me iluminar todos os dias, me dando forças suficientes para caminhar, mesmo quando isso parecia impossível, em busca da realização de meus ideais.

Aos meus pais, Carlos e Marcia, por serem os melhores pais que eu poderia ter, pela educação que a mim destinaram, por me apoiarem e me incentivarem em todas as decisões que tomei.

Ao meu irmão, que sempre me protegeu e me ajudou a passar por situações difíceis em nossas vidas.

À minha família, meu avô Antenor, minha avó Belmira (*in memoriam*), meus tios “Toninho” e Paulo, minhas tias Valéria e Rose, primos Rafael, Felipe e Lidiane e aos mais novos integrantes da família, Roberta, minha cunhada, Marcos, meu primo, por sempre proporcionarem alegria, companheirismo, carinho, confiança, apoio e por demonstrarem o verdadeiro significado do que é uma família. Em especial, agradeço a existência da minha sobrinha Ana Laura, que me trouxe mais uma razão para viver e é motivo de tantas felicidades.

Ao meu namorado e amigo Diego, pela compreensão, apoio, paciência e companheirismo em todos os momentos e principalmente nos que mais precisei.

Ao meu orientador Humberto Tonhati, por ter me dado as oportunidades e atenção necessárias para a realização do curso de mestrado.

À minha co-orientadora Dr^a. Joslaine Noely dos Santos Gonçalves Cyrillo pela atenção e contribuições destinadas a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal pela educação formal e informal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao Centro de Pesquisa em Pecuária de Corte de Sertãozinho – SP pela doação do material biológico e disponibilidade dos dados.

Aos meus amigos de laboratório: Diércles, Patrícia, Fernanda, Larissa Zetouni e Larissa Fonseca, pela convivência, ensinamentos e pelos momentos de descontração. Mas principalmente, agradeço ao Gregório, por toda paciência, ajuda, ensinamentos e tempo disponível.

À minha banca de qualificação, Joslaine, Lúcia e Henrique e à minha banca de defesa, Joslaine, Maria Eugênia e Fábio pela presença, sugestões e contribuições.

Aos meus colegas do Departamento de Zootecnia: Fábio, Raul, Arione, Naudin, Daniel, Daniele, Dimas, Francisco pela convivência.

Ao Daniel, Joslaine, Raul e Arione pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos meus professores que contribuíram para a minha formação. Muito obrigada pela dedicação, paciência e ajuda.

Aos funcionários da Unesp/FCAV pela ajuda, em especial aos da Biblioteca, Departamento de Zootecnia e Seção de Pós-graduação.

Aos técnicos do laboratório de Genética Molecular: João e Paulo por toda ajuda.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte da minha vida durante a pós-graduação, que me apoiaram e me ajudaram até aqui.

Sumário

CAPÍTULO 1.	8
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Marcadores moleculares	10
2.2 O hormônio grelina	11
2.3 O gene do hormônio da grelina (<i>GHRL</i>)	13
2.4 Importância das características estudadas	15
2.4.1 Consumo de matéria seca	15
2.4.2 Consumo alimentar residual	15
2.4.3 Peso ao sobreano	16
2.4.4 Altura na garupa	16
2.4.5 Características de carcaça	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DA GRELINA (<i>GHRL</i>) E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE.	27
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Animais	31
2.2 Coleta do material biológico	32
2.3 Análises laboratoriais	32
2.4 Extração de DNA	32
2.5 Análise da quantidade e qualidade do DNA	33
2.6 Desenho dos <i>primers</i>	33
2.7 Amplificação de DNA via PCR	34
2.8 Sequenciamento e genotipagem	35
2.9 Características estudadas	36
2.10 Análises estatísticas	37

2.10.1	Frequências alélicas e genotípicas	37
2.10.2	Teste de Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	38
2.10.3	Desequilíbrio de ligação.....	38
2.10.4	Análise de associação entre as variantes encontradas e os fenótipos das características estudadas	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	Extração de DNA e análise de qualidade	39
3.2	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR	40
3.3	Técnica de PCR.....	41
3.4	Sequenciamento	42
3.5	Análises estatísticas	47
3.5.1	Frequências alélicas e genotípicas	47
3.5.2	Desequilíbrio de ligação.....	49
3.5.3	Resultado das análises de associação dos SNPs com valores fenotípicos das características analisadas	50
4	CONCLUSÃO	56
5	REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ALTm	Altura da garupa em machos
ALTf	Altura da garupa em fêmeas
AOLa	Área de olho de lombo ao ano
AOLs	Área de olho de lombo ao sobreano
CA	Conversão alimentar
CMS	Consumo de matéria seca
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucléico
EGS	Espessura de gordura subcutânea
EGGa	Espessura de gordura subcutânea na garupa ao ano
EGGs	Espessura de gordura subcutânea na garupa ao sobreano
EGLa	Espessura de gordura subcutânea no lombo ao ano
EGLs	Espessura de gordura subcutânea no lombo ao sobreano
EUA	Estados Unidos da América
GH	<i>Growth hormone</i> – Hormônio do crescimento
GHRL	Gene do hormônio da grelina
GMD	Ganho médio diário
H-W	<i>Hardy-Weinberg</i>
MAS	Seleção assistida por marcadores moleculares
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
P378	Peso ao ano de machos padronizado aos 378 dias
P550	Peso ao sobreano de fêmeas padronizado aos 550 dias
pb	Pares de base
PV^{0.75}	Peso metabólico
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> – locos que controlam características quantitativas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UTR	<i>Untranslated region</i> - região não traduzida
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 1.

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de carne bovina, ficando atrás apenas dos EUA, além de ser o maior exportador de carne bovina do mundo desde 2004 (ANUALPEC, 2011). Sustentar essa posição e conseguir novos mercados é uma tarefa complexa, pois além das dificuldades impostas pela globalização da economia, aumentaram as exigências dos consumidores, a preocupação com a conservação ambiental e com o bem estar animal (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010). Além disso, há previsões de crescimento e aumento da expectativa de vida da população mundial e da demanda por alimentos, havendo necessidade de um setor mais produtivo em quantidade e qualidade dos produtos fornecidos.

A população bovina de corte no Brasil é constituída, principalmente, por animais zebuínos de diversas raças, aproximadamente 80% do rebanho, tendo a raça Nelore sua representante de maior expressão (EUCLIDES FILHO & EUCLIDES, 2010), além disso, a raça Nelore é uma das principais raças de corte do país que integram programas de melhoramento genético animal, os quais visam a mudança genética de características de interesse econômico.

As perspectivas para o melhoramento genético têm sido continuamente influenciadas pelos avanços de várias áreas das ciências e a era da biotecnologia tem despertado grandes expectativas quanto aos seus efeitos no melhoramento genético animal por meio das técnicas moleculares, que podem ser usadas para localizar, identificar, comparar e eventualmente manipular os genes (PACKER & PAZ, 2001). Dessa forma, a introdução de novas tecnologias na cadeia produtiva da carne poderá melhorar a produção de bovinos de corte, além de influenciar na competitividade do setor.

Uma dessas tecnologias é a MAS, seleção assistida por marcadores moleculares, a qual é uma forma de aumentar a acurácia de predição quando associada aos métodos tradicionais de seleção, constituindo uma ferramenta eficaz e

importante para identificação de animais superiores que pode proporcionar melhorias das características de interesse econômico (PAZ et al., 2004).

A incorporação da MAS em programas de melhoramento genético oferece maior benefício quando a característica sob seleção é de baixa herdabilidade e de difícil e/ou de alto custo de mensuração, limitadas ao sexo ou que só podem ser medidas em uma idade avançada como características de resistência a doenças, qualidade de carne e eficiência de produção (BRITO et al., 2006; OLIVEIRA, 2008).

Os marcadores moleculares são originados das variações no material genético e são também denominados de marcadores genéticos (FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998). Dentre os principais marcadores genéticos descritos estão os polimorfismos de base única (SNP), que são mutações em uma única base na sequência de DNA (CAETANO, 2009). Quando os SNPs estão localizados em regiões codificantes dos genes, esses podem influenciar em diferenças na função da proteína e consequente variação fenotípica. Entretanto, pode haver variações em regiões não codificantes, as quais podem também alterar significativamente o fenótipo (CURI, 2004).

O estudo de genes candidatos é uma forma de associação de genes com características de interesse econômico na produção animal, sendo que esses são genes de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou processos fisiológicos responsáveis pela expressão de uma característica (BRYNE & MCMULLEN, 1996; PAZ et al., 2004).

O gene do hormônio da grelina é um gene candidato para identificação de marcadores moleculares, pois estimula a ingestão alimentar, a secreção de GH e a adiposidade. Assim, o objetivo do estudo foi identificar a existência de polimorfismos no gene do hormônio da grelina (*GHRL*) e associá-los com características de importância econômica em bovinos da raça Nelore.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA denominadas de polimorfismos (SALMAN et al., 2009). O princípio da utilização dos marcadores moleculares é baseado no dogma central da genética e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, em alguns casos, diferenças fenotípicas.

Conforme PEREIRA (2008), polimorfismos genéticos consistem em variações ao longo do DNA entre indivíduos de uma mesma população, ou seja, um polimorfismo é dito como diferentes versões de certa sequência de DNA em um determinado loco. Portanto, a coexistência de alelos múltiplos em um loco é chamada de polimorfismo genético. Desse modo, qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico. A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações, como inserções, deleções e troca de bases, que podem ocorrer na sequência de DNA. Para que essas mutações sejam vistas como polimorfismos, essas devem ser transmitidas às gerações seguintes e fixadas na população em uma frequência mínima de 1% (KWOK & GU, 1999).

De acordo com REGITANO & COUTINHO (2001), marcadores genéticos moleculares têm como o objetivo aumentar a acurácia de predição do valor genético aditivo das características analisadas, reduzir o intervalo de gerações, e, conseqüentemente, aumentar o ganho genético.

Dentro de um programa de melhoramento genético, os marcadores podem ser usados para seleção de indivíduos com características de interesse, através da MAS, a qual consiste em encontrar genes ou conjunto de genes desejáveis de maneira mais rápida e eficiente, utilizando um menor número de animais e gerações, facilitando assim o estudo de QTLs. A introdução de genótipos superiores pode aumentar o ganho genético anual e tornar mais eficiente a produção dos animais (SALMAN et al., 2009).

Os estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo ou em regiões

flanqueadores. PAZ et al. (2004) afirmam que genes candidatos são sequências de genes de ação biológica conhecida que estão envolvidas no desenvolvimento da expressão de certas características.

2.2 O hormônio grelina

Uma das estratégias para o desenvolvimento de marcadores moleculares é a detecção de polimorfismos em genes que influenciam características importantes (REGITANO & COUTINHO, 2001) e o hormônio da grelina é um desses genes. Ele é produzido pela parede do estômago e estimula o consumo alimentar pela ação que o mesmo exerce sobre o hipotálamo e, segundo KOJIMA et al. (1999), a grelina é produzida em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e coração. O hipotálamo, estrutura do sistema nervoso encarregada do controle do consumo alimentar e do peso corporal, recebe diversos sinais na forma de hormônios como a grelina, que estimula a fome (ST-PIERRE et al., 2003) e a leptina, que estimula a saciedade (FRIDEMAN & HALAAS, 1998).

Os níveis plasmáticos de grelina diminuem 1h após a ingestão de alimento e voltam a aumentar anteriormente à alimentação em vacas (HAYASHIDA et al., 2001). Segundo WERTZ-LUTZ et al. (2006), injeções de grelina bovina na concentração fisiológica resultou em um aumento da concentração plasmática de GH e os animais passavam um maior tempo se alimentando.

A grelina estimula a secreção de GH atuando mediante receptores específicos distintos acoplados à proteína G (MARTINELLI et al., 2008), de forma que alterações em seu gene codificante podem estar associadas a variações no peso de bovinos em diferentes idades, pois o hormônio do crescimento é um dos principais fatores que influenciam diretamente o crescimento do indivíduo, sendo assim, sua liberação está ligada ao maior ganho de peso em animais de produção.

O nome grelina origina-se da palavra *ghre* da linguagem Proto-Indo-Européia e corresponde em inglês a *grow*, que significa crescimento (KOJIMA et al., 1999). Estruturalmente, a grelina é um peptídeo com uma modificação octanóica no seu grupo

hidroxil sobre a serina 3, que é essencial para o desempenho de sua função liberadora do hormônio do crescimento (GH) (BEDNAREK et al., 2000).

De acordo com LEIDY et al. (2004), a possibilidade de que a elevada concentração plasmática de grelina ativa a ingestão alimentar foi confirmada por diversas pesquisas em roedores nos quais a administração central, ou seja, intracerebroventricular, e periférica (subcutânea e intraperitoneal) de grelina induziu à obesidade, isso ocorreu devido ao aumento da ingestão alimentar e diminuição da oxidação lipídica.

KENNEDY (1953) propôs que a regulação do balanço energético é intermediada por um produto do metabolismo presente na circulação sanguínea que interage com receptores associados com o sistema nervoso central. De acordo com HINNEY et al. (2002), na regulação do balanço energético, a grelina aumenta a ingestão alimentar e diminui o gasto energético, realizando uma ligação entre o trato gastrointestinal e o cérebro.

Segundo KOJIMA et al. (1999); DATE et al. (2000), a grelina possui outras importantes atividades, incluindo estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, influência sobre o eixo hipofisário-gonadal, atividade orexígena (estimulante do apetite) acoplada ao controle do gasto energético; controle da secreção ácida e da motilidade gástrica, influência sobre a função endócrina pancreática e metabolismo da glicose e ainda ações cardiovasculares e efeitos antiproliferativos em células neoplásicas.

Estudos com roedores sugerem associação da grelina na diminuição da oxidação das gorduras, aumento da ingestão alimentar, adiposidade e peso corporal, independentemente dos níveis de GH (UKKOLA et al., 2002). Os ruminantes domésticos, ou seja, bovinos, caprinos e ovinos, possuem o sistema gastrointestinal-digestivo diferente do apresentado por monogástricos, como roedores e humanos, contudo, a grelina é sintetizada no abomaso desses ruminantes e foi constatado que injeções intracerebroventriculares do hormônio causaram significativa liberação de GH em cabras da raça Shiba (HAYASHIDA et al., 2001), o que sugere que essa molécula é secretada pelo estômago e circula na corrente sanguínea para estimular a secreção de GH em ruminantes.

Conforme ST-PIERRE et al. (2003) humanos ao receberem injeções de grelina reportaram sensações de intensa fome. Em ovinos, os picos de grelina no plasma foram observados logo antes do consumo (SUGINO et al., 2002 citados por FORBES, 2007), representando um fator associado à ingestão voluntária de alimento.

SHERMAN et al. (2007) relataram que a regulação fisiológica da ingestão, do crescimento e do metabolismo energético em animais está sob controle de muitos genes, os quais podem ser importantes candidatos para desvendar variações genéticas em características de importância econômica em animais. Assim, mais estudos com o gene bovino da grelina (*GHRL*) tornam-se importantes na medida em que tal hormônio exerce influência no metabolismo geral do organismo e seus polimorfismos podem caracterizar potenciais marcadores moleculares.

2.3 O gene do hormônio da grelina (*GHRL*)

De acordo com COLINET et al. (2009), o gene *GHRL* em bovinos é composto de 5 éxons e 4 íntrons. Os éxons 1, 2, 3, 4 e 5 possuem comprimentos de 21 pb, 134 pb, 114 pb, 109 pb e 154 pb, respectivamente. A região codificadora compreende os éxons 2 (parcialmente), 3, 4 e 5 (parcialmente), conforme Figura 1.

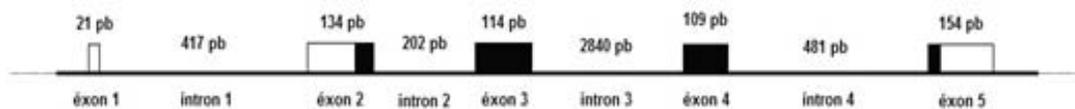


Figura 1. Esquema representativo do gene do hormônio da grelina (*GHRL*). Os traços indicam os íntrons, os retângulos são os éxons, e as partes escuras as regiões codificantes. Adaptado de COLINET et al. (2009).

WAJNRAJCH et al. (2000) mapearam o gene *GHRL* em humanos e foi feito um alinhamento na montagem Btau_4.0 que permite localizar o gene bovino *GHRL* no cromossomo 22 (BTA 22). Essa localização concorda totalmente com os dados de mapeamento comparativo entre bovinos e humanos, pois o BTA 22 corresponde a uma parte do cromossomo humano 3 (HAYES, 1995).

O gene *GHRL* bovino codifica uma molécula denominada pré-pro-grelina, a qual é constituída de 116 aminoácidos e tem 96, 78, 75, 75 e 71% de identificação com a pré-pro-grelina de ovinos, suínos, camundongos, ratos e humanos, respectivamente, sendo que essa molécula origina o hormônio grelina, composto por 27 aminoácidos em bovinos (COLINET et al., 2009). O que demonstra que o gene *GHRL* está presente no genoma de várias espécies.

COLINET et al. (2009) identificaram oito SNPs no gene *GHRL* em bovinos. Esses estão localizados em regiões não codificadoras. Os polimorfismos foram estudados em diferentes raças de bovinos, como Holstein, Belgian Blue e Simental, sendo raros na população de Holstein, mas não nas populações de Belgian Blue e Simental, todavia, nenhuma associação com características de interesse foi realizada.

Em um estudo realizado por JIN et al. (2010) com cabras, encontrou-se um SNP A/G no íntron 2 do gene *GHRL* que está associado com circunferência torácica e perímetro da canela. Segundo os autores, o alelo G é considerado recessivo e deve-se rejeitar o alelo G nos programas de melhoramento de caprinos.

SUN et al. (2011) analisaram bovinos de raças chinesas e detectaram 11 polimorfismos na forma de SNP no gene *GHRL*. Desses, dois SNPs foram identificados em regiões flangeadoras 5', 7 em íntrons e 2 em éxons. As análises de associações entre SNPs do gene *GHRL* e características de crescimento foram realizadas, entretanto não foi encontrada associação significativa dos genótipos com as características peso corporal, ganho médio diário e tamanho corporal em diferentes idades. Segundo os mesmos autores, o *GHRL* é um gene de suscetibilidade à obesidade e mutações nesse gene podem influenciar o desempenho dos animais.

SHERMAN et al. (2007) identificaram um SNP A/G no gene bovino *GHRL*, que mostrou tendência de associação com características de ingestão e conversão alimentar ($P \leq 0.10$). Esse SNP também demonstrou pequena associação com mérito de carcaça, incluindo efeitos positivos no rendimento, na produtividade e na qualidade de carne em animais que foram homozigotos AA. Apesar desse SNP estar no íntron 3 no gene *GHRL* e, por consequência, não sintetizar aminoácido, esse pode estar em desequilíbrio de ligação com outro SNP no gene *GHRL*, o que pode explicar as associações desses SNPs com características de interesses econômicos.

Um polimorfismo no gene *GHRL* de suínos da raça Berkshire foi identificado e associado com espessura de gordura subcutânea, marmoreio e outras características de carcaça (KIM et al., 2004), o que pode comprovar o possível papel do gene *GHRL* em influenciar características de carcaça.

2.4 Importância das características estudadas

2.4.1 Consumo de matéria seca

A produção animal é determinada pelo consumo de matéria seca, valor nutritivo do alimento e resposta do animal. O consumo de matéria seca constitui o primeiro ponto determinante da ingestão de nutrientes necessários ao atendimento das exigências de manutenção e produção animal, demonstrando assim, a importância desse fator dentro de um sistema de produção (NOLLER et al., 1996), além disso, é um parâmetro fundamental na formulação de dietas a fim de atender as exigências nutricionais, prever o ganho de peso diário dos animais e estimar a lucratividade (NRC, 1996).

Nos últimos anos, maior ênfase tem sido dada à redução dos *inputs*, tais como o consumo de alimentos, a fim de aumentar a eficiência e maximizar a lucratividade do sistema de produção, uma vez que 70% dos custos de produção estão associados à alimentação (RESTLE & VAZ, 1999). Dessa forma, a possibilidade de se identificar e selecionar animais de menor consumo de matéria seca e mesmo desempenho, ou seja, mais eficientes, torna a atividade mais atrativa do ponto de vista econômico.

2.4.2 Consumo alimentar residual

Antigamente, a eficiência alimentar era definida pela conversão alimentar, a qual é uma medida bruta da eficiência, mas com limitações, pois é um parâmetro de eficiência altamente correlacionado com ganho de peso e idade adulta (ARTHUR et al., 2001). Portanto, usar CA como critério na seleção da eficiência alimentar leva ao aumento do tamanho das fêmeas, o que pode ser indesejável. Atualmente a

característica CAR, sugerida inicialmente por KOCH et al. (1963), vem sendo utilizada como medida de eficiência alimentar e parece não estar correlacionada ao peso adulto do animal (LANNA & ALMEIDA, 2004).

LANNA & ALMEIDA (2004) afirmam que o CAR é obtido por meio da diferença entre o consumo real e a quantidade de alimento que o animal deveria comer, baseado no seu peso vivo médio e na sua velocidade de ganho de peso. Dessa forma, animais mais eficientes têm CAR negativo, os quais consomem menos do que o predito para o ganho observado e os menos eficientes têm CAR positivo, ou seja, o consumo observado é maior que o predito. Segundo DEL CLARO et al. (2012) a seleção para baixo CAR pode resultar em progênie que consomem menos, sem alterar o desempenho animal.

2.4.3 Peso ao sobreano

O peso ao sobreano assume grande importância por ser a última pesagem realizada pela maioria dos criadores de rebanhos de seleção antes da venda dos reprodutores, além de ser o peso mais próximo do peso de abate e, conseqüente, o que apresenta maiores correlações com esse (DIAZ, 2009). SOUZA et al. (2000) afirmam que ao avaliar características de crescimento como o peso ao sobreano avalia-se o potencial genético de crescimento do indivíduo ou seja, o mérito próprio do indivíduo em ganhar peso.

2.4.4 Altura na garupa

Alguns estudos demonstraram a existência de associação genética entre peso e altura da garupa (CYRILLO et al., 2001; SILVA et al., 2003; PEREIRA et al, 2010). Assim, a seleção apenas quanto ao peso, em longo prazo pode levar à produção de animais mais altos que, em determinados ambientes, podem ser mais tardios e menos eficientes. Além disso, YOKOO et al. (2010) estimaram, em bovinos da raça Nelore, correlação genética negativa e de magnitude moderada entre altura da garupa e espessura de gordura subcutânea na carcaça. Dessa forma, essa é uma característica

importante para ser incluída em programas de melhoramento genético de bovinos com o objetivo de monitorá-la.

2.4.5 Características de carcaça

A qualidade de carcaça e de carne em gado de corte sofre influência da espessura de gordura de subcutânea, além da quantidade total e distribuição da gordura (WHEELER et al., 1994; LOZEMAN et al., 2001). A indústria frigorífica tem evitado carcaças com EGS abaixo de 3 mm e acima de 6 mm (RESTLE & VAZ, 2003), pois um produto com cobertura de gordura inferior a 3 mm sofre escurecimento da parte externa dos músculos pelo frio das câmaras frigoríficas e encurtamento das fibras musculares em função da maior velocidade de resfriamento, o que afeta negativamente a maciez da carne (JUNQUEIRA & ALEONI, 1998; KUYPERS, 2000). Além disso, sabe-se também, que a gordura é um importante componente do sabor da carne bovina.

Outra característica de carcaça importante é a área de olho de lombo, medida relacionada à musculosidade e usada como indicadora de rendimento dos cortes de alto valor comercial, apresentando correlação positiva com a porção comestível da carcaça (LUCHIARI FILHO, 2000).

A ultrassonografia é uma maneira rápida, não invasiva e com boa acurácia para predição de componentes de carcaça, como a EGS e AOL. Diversos pesquisadores empregaram essa técnica para medir características de composição corporal de animais vivos (STOUFFER et al., 1961; WILSON, 1992).

Características de carcaça, como a EGS e AOL não são rotineiramente contempladas em programas de melhoramento genético, porém alguns autores recomendam a inclusão de escores visuais em programas de seleção como alternativa viável para melhorar a carcaça e a precocidade de terminação (MAY et al., 1992; CARDOSO et al., 2001; KOURY FILHO, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a existência dos polimorfismos em regiões do gene da Grelina (GHRL) em bovinos da raça Nelore e avaliar a associação destes polimorfismos com características de crescimento, eficiência alimentar e carcaça para a obtenção de marcadores moleculares, contribuindo para uma possível seleção de animais superiores para as características analisadas com o auxílio da seleção assistida por marcadores moleculares (MAS).

3.2 Objetivos específicos

Verificar a existência de polimorfismos no gene GHRL com a técnica de sequenciamento;

Calcular e analisar as frequências alélicas e genóticas da população para avaliar os efeitos da seleção sobre as frequências alélicas e genóticas atuais;

Analisar a existência de associação dos polimorfismos com as características consumo de matéria seca (CMS); consumo alimentar residual (CAR); peso ao ano para machos (P378) e ao sobreano para fêmeas (P550); altura na garupa; área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea no lombo (EGL) e na garupa (EGG) ao ano e ao sobreano.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2001.

ARTHUR, P.F.; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science**, v. 68, p131-139, 2001.

BEDNAREK, M.A.; FEIHNER, S.D.; PONG, S.S.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, D.L.; SILVA, M.V.; WARREN, V.A.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.; HECK, J.V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence oh ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **Journal Medicinal Chemistry**, v.43, p.4370-76, 2000.

BRITO, F.V.; CARDOSO, V.; CARVALHEIRO, R.; FRIES, L.A.; PEÑA, C.D.O.; PICCOLI, M.L.; ROSO, V.M.; SCHENKEL, F.; SEVERO, J.L.P. **A biotecnologia no melhoramento genético animal**. 2006. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/?noticialD=33237&actA=7&areaID=60&SeçãoID=170>.

Acesso em: 03/03/2012.

BRYNE, P. F.; MCMULLEN, M. D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, v.7, p.24-7, 1996

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CARDOSO, F.F.; CARDELLINO, R.A.; CAMPOS, L.T. Fatores ambientais sobre escores de avaliação visual a desmama em bezerros Angus criados no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.318-325, 2001.

COLINET, F.G; PORTETELLE, D.; RENAVILLE, R. Molecular characterization of the bovine *GHRL* gene (Short Communication). **Archiv Tierzucht**, v.52, p.79-84, 2009.

CURI, R. A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce**. 2004 Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.

CYRILLO, J.N. dos S.G.; RAZOOK, A.G.; FIGUEIREDO, L.A. de; BONILHA NETO, L.M.; MERCADANTE, M.E.Z.; TONHATI, H. Estimativas de tendências e parâmetros genéticos do peso padronizado aos 378 dias de idade, medidas corporais e perímetro escrotal de machos Nelore de Sertãozinho, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.56-65, 2001.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M.S.; SUGANUMA, T; MATSUKURA, S.; KAGAWA, K.; MASAMITSU, N. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rat and human. **Endocrinology**, v.41, p.4255-61, 2000.

DIAZ, I.D.P.S. **Interação genótipo-ambiente no peso ao sobreano na raça Nelore**. Jaboticabal, 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, 2009.

DEL CLARO, A. C.; MERCADANTE, M. E. Z.; SILVA, J. A. V. Meta-análise de parâmetros genéticos relacionados ao consumo alimentar residual e a suas características componentes em bovinos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.2, p.302-310, 2012.

EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P. B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: PIRES, A.V. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba:FEALQ, 2010.

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

FRIDEMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v.395, p.763-70, 1998.

HAYASHIDA, T.; MURAKAMI, K.; MOGI, K.; NISHIHARA, M.; NAKAZATO, M.; MONDAL, M.S; HORII, Y.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; MURAKAMI, N. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p.17–24, 2001.

HAYES, H. Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.71, p.168-174, 1995.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F., SCHÄFER, H., SIEGFRIED, W., GOLDSCHMIDT, H., REMSCHMIDT, H; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, p.2716-24, 2002.

JIN, Q.J.; FANG, X.T.; ZHANG, C.L.; YANG, L.; SUN, J.J; CHEN, D.X.; SHI, X.Y.; DU, Y.; LAN, X.Y.; CHEN, H. A novel SNP of the *GHRL* gene in goat and its association with growth traits (Short Communication). **Small Ruminant Research**, v.90, p.150-152, 2010.

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

KENNEDY, G.C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.140, p.578–592, 1953.

KIM, K.; THOMSEN, H.; BASTIAANSEN, J.; NGUYEN, N. T.; DEKKERS, J. C.M.; PLASTOW G.S.; ROTHSCHILD, M. F. Investigation of obesity candidate genes on

porcine fat deposition quantitative trait loci regions. **Obesity Research**. v.12, p.1981–1994, 2004.

KOCH, R.M.; SWIGER, L.A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K.E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.22, p486-494, 1963.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y; NAKAZATO, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v.402, p.656-60, 1999.

KOURY FILHO, W. **Escores visuais e suas relações com características de crescimento em bovinos de corte**. 2005. 80f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

KUYPERS, R. Meat tenderness: an examination of breed differences, post mortem processing, and their interactions. **S.I. : Food Science Australia**, p.114, 2000.

KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, v.12, p.538-543, 1999.

LANNA, D.P.; ALMEIDA, R. Residual feed intake: Um novo critério de seleção? In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5, 2004, Pirassununga. **Anais...** 2004

LEIDY, H.J.; GARDNER, J.K.; FRYE, B.R.; SNOOK, M.L.; SCHUCHERT, M.K.; RICHARD, E.L.; WILLIAMS, N.I. Circulating Ghrelin Is Sensitive to Changes in Body Weight during a Diet and Exercise Program in Normal-Weight Young Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, p.2659-64, 2004.

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

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

MARTINELLI, C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, p.717-725, 2008.

MAY, G.S.; MIES, W.L.; EDWARDS, J.W. et al. Effect of frame size, muscle score and external fatness on live and carcass value of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3311-3316, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, 1996. 234p.

NOLLER, C.H., NASCIMENTO JÚNIOR, D., QUEIROZ, D.S. Exigências nutricionais de animais em pastejo. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PASTAGENS, 13, 1996, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: FEALQ, 1996. p.319-352.

OLIVEIRA, D. A. A. Genética molecular – Novas tecnologias aliadas ao melhoramento animal. In: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2008.

PACKER, I. U.; PAZ, C. P. Impactos da biotecnologia no melhoramento animal. In: MATTOS, W. R. S. et al. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001.

PAZ, C.C.P.; PACKER, I.U.; FREITAS, A.R; TAMBASCO-TALHARIS, D.; REGITANO, L.C.A., ALENCAR, M.M.; RODRIGUES, A.A. Influência de polimorfismos genéticos

sobre os parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.858-69, 2004.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 5. Ed. Belo Horizonte:FEPMVZ Editora, 2008, 618p.

PEREIRA, M. C.; YOKOO, M. J.; BIGNARDI, A. B.; SEZANA, J. C.; Albuquerque, L. G. Altura da garupa e sua associação com características reprodutivas e de crescimento na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, n.6, p.613-620, 2010.

REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2001. 215p.

RESTLE, J.; VAZ, F.N. Confinamento de bovinos definidos e cruzados. In: LOBATO, J.F.P. et al. **Produção de bovinos de corte**. Porto Alegre:EDIPUCRS, 1999. p.141-168.

RESTLE, J.; VAZ, F.N. Eficiência e qualidade na produção de carne bovina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40, 2003. Santa Maria. **Anais...** 2003.

SALMAN, A.K.D; POLAINA, F.G.; MALAGO, W.J. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **Revista electrónica de Veterinaria**, v.10, n.2, p.1-17, 2009.

SHERMAN, E.L.; NKURUMAH, J.D.; MURDOCH, B.M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S.S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1-16, 2007.

SILVA, J.A. de V.; VAN MELIS, M.H.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Estimação de parâmetros genéticos para probabilidade de prenhez aos 14 meses e altura na garupa em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1141-1146, 2003.

SOUZA, J.C.; RAMOS, A.A.; SILVA, L.O.C.; EUCLIDES FILHO, K.; ALENCAR, M.M.; WECHSLER, F.S.; FERRAZ FILHO, P.B. Fatores do ambiente sobre o peso ao desmame de bezerros da raça Nelore em regiões tropicais brasileira. **Ciência Rural**, v.30, n.5, 2000.

STOUFFER, J.R.; WALLENTINE, M.V.; WELLINGTON, G.A.; DIEKMANN, A. Development and application of ultrasonic methods for measuring fat thickness and rib-eye area in cattle and rib-eye in cattle and hogs. **Journal of Animal Science**, v.20, p.759-767, 1961.

ST – PIERRE, D.H.; WANG, L., TACHÉ, Y. Ghrelin: a novel player in the gut – brain regulation of growth hormone and energy balance. **News in Physiological Science**, v.18, p.242-246, 2003.

SUN, J.; JIN, Q.; ZHANG, C.; FANG, X.; GU, C.; LEI, C.; WANG, J.; CHEN, H. Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (*GHRL*) and Syndecan-1 (*SDC1*) genes that are associated with growth traits in cattle. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.3153-3160, 2011.

UKKOLA, O; POYKOO, S. Ghrelin. Growth and obesity. **Annal of Medicine**, v. 34, p.102-108, 2002.

WAJNRAJCH, M.P.; TEN, I.S.; GERTNER, J.M.; LEIBEL, R.L. Genomic organization of the ghrelin gene. **Journal Endocrine Genetics**, p.231-233, 2000.

WERTZ-LUTZ, A.E.; KNIGHT, T.J.; PRITCHARD, R.H.; DANIEL, J.A.; CLAPPER, J.A.; SMART, A.J.; TRENKLE, A.; BEITZ, D.C. Circulating ghrelin concentrations fluctuate

relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p.3285-3300, 2006.

WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p.3145-51, 1994.

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

YOKOO, M.J.; LOBO, R.B.; ARAUJO, F.R.C.; BEZERRA, L.A.F.; SAINZ, R.D.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic associations between carcass traits measured by real-time ultrasound and scrotal circumference and growth traits in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.52-58, 2010.

CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DA GRELINA (*GHRL*) E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE.

RESUMO: O hormônio da grelina é produzido pela parede do estômago e possui principal função orexígena, além de estimular a secreção do hormônio do crescimento e atuar no balanço energético, sendo proposto como gene candidato para identificação de marcadores genéticos associados com características de importância econômica. Marcadores genéticos moleculares quando associados a características de importância econômica podem auxiliar na avaliação genética, diminuir o intervalo de gerações e aumentar o ganho genético dos animais. Foram utilizados 231 animais para estudar o gene do hormônio da grelina (*GHRL*) para a identificação de marcadores moleculares e foram encontrados seis polimorfismos do tipo SNP no íntron 2 e 4 e no éxon 5. As posições dos SNPs no gene e as substituições são: g.1905 A>G, g.2068 T>C, g.4190 T>C, g.4269 A>G, g.4384 T>C, g.4450 T>C, sendo que três SNPs estavam em desequilíbrio de ligação. Os SNPs foram encontrados em regiões intrônicas e 3'UTR, entretanto, houve associações de SNPs, utilizando o Teste F, com as características peso ao ano para machos (P378), peso ao sobreano para fêmeas (P550), consumo de matéria seca (CMS); área de olho de lombo ao ano (AOLa); altura na garupa em fêmeas (ALTf); espessura de gordura subcutânea no lombo (EGLa) e na garupa (EGGa) ao ano ($P \leq 0,05$). Foram formados haplótipos, mas apenas os haplótipos associados com característica EGGa apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Também houve aplicação do teste de Bonferroni para todas as análises, entretanto apenas os haplótipos associados com a característica EGGa apresentaram diferenças significativas para esse teste.

Palavras-chaves: *Bos taurus indicus*, haplótipos, íntron, marcadores moleculares, SNP

CHAPTER 2. POLYMORPHISMS IN THE HORMONE GHRELIN (*GHRL*) GENE AND THEIR ASSOCIATION WITH IMPORTANT ECONOMIC TRAITS IN NELLORE CATTLE.

ABSTRACT - The hormone ghrelin is produced by stomach wall and has main function is food intake, besides stimulating the secretion of growth hormone and act on energy balance, it is proposed as a candidate gene for identification of genetic markers associated with important economic traits. When molecular genetic markers associated with traits of economic importance in the genetic evaluation may help decrease the generation interval and increasing the gain genetic of the animals. Were used 231 animals to study the hormone ghrelin gene (*GHRL*) for the identification of molecular markers and six SNP polymorphisms were found in intron 2 and 4 and exon 5. The positions of the SNP in the gene and yours substitutions are: g.1905 A> G, g.2068 T> C, g.4190 T> C, g.4269 A> G, g.4384 T> C, T g.4450 > C, and three SNP were in linkage disequilibrium. The SNP were found in intronic and 3'UTR regions, however, there were associations of SNPs using the F test, with traits male weight at 378 days of age (P378), heifer weight at 550 days of age (P550), dry matter intake (CMS), longissimus muscle area (AOL); heifer height (ALTf), backfat thickness (EGL) and rump fat thickness croup (EGG) ($P \leq 0.05$). Haplotypes were formed, but only the haplotypes associated with characteristic EGG significant differences ($P \leq 0.05$). There was also applying the Bonferroni test for all analyzes, however only the haplotypes associated with the characteristic EGG significant differences for this test.

Keywords: *Bos taurus indicus*, haplotype, intron, molecular marker, SNP

1 INTRODUÇÃO

A seleção para características de interesse econômico por meio de programas de melhoramento genético adequados permite o aumento dos índices produtivos. A identificação de animais superiores e a posterior utilização dos mesmos como reprodutores promove o aumento no ganho genético, aumentando a frequência gênica favorável e reduzindo a desfavorável em toda população.

Neste contexto, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico surgiram as biotecnologias, as quais acopladas ao melhoramento genético ganharam crescente posição de destaque nos sistemas de produção de bovinos. Na produção animal, a biotecnologia pode ser empregada para aumentar a produção de alimentos, a eficiência dos sistemas de produção, a qualidade dos produtos de origem animal e a sustentabilidade do sistema (COUTINHO & ROSÁRIO, 2010).

Na última década, a seleção entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genética dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular (GARCIA, 2006), como a seleção com auxílio de marcadores moleculares (MAS) que utiliza das informações de regiões específicas dos cromossomos, ou seja, genes ou conjunto de genes desejáveis para a identificação de loci (QTL) que afetam características de importância econômica na produção de bovinos (ANDERSSON, 2001; MARTINEZ & MACHADO, 2002).

Os marcadores moleculares têm como finalidade aumentar a acurácia de predição do valor genético aditivo das características, aumentar o ganho genético e reduzir o intervalo de gerações (REGITANO & COUTINHO, 2001). Esses marcadores, originados das variações no código do material genético, são também denominados de marcadores genéticos (FERREIRA & GRATTAPALIA, 1998).

Dentre os principais marcadores genéticos descritos estão os polimorfismos de base única (SNP). Os marcadores SNP são alterações de bases únicas, ou seja, mutações, inserções e deleções que ocorrem nas bases nitrogenadas da molécula de DNA (CAETANO, 2009). Quando os SNPs estão localizados em regiões codificantes dos genes, os polimorfismos podem levar a alterações no aminoácido da sequência proteica, o que pode determinar diferenças na função da proteína e consequente

variação fenotípica. Entretanto, as variações em regiões não codificantes também podem influenciar na variação fenotípica, pois podem promover processamentos alternativos do RNA, geração ou supressão de códons de terminação ou iniciação para a tradução ou alterar sequências promotoras (CURI, 2004).

SHERMAM et al. (2007) afirmam que SNPs encontrados podem estar em desequilíbrio de ligação com outros SNPs no gene de efeitos mais acentuados sobre as características analisadas. Os íntrons e o ato de sua remoção pelo spliceosomo podem influenciar muitas outras fases do metabolismo do RNAm, incluindo transcrição inicial do gene, edição e poliadenilação, exportação nuclear e tradução do RNAm (BUCHMAN & BERG, 1988; CALLIS, 1987; DUNCKER et al., 1997).

O estudo de associações dos polimorfismos com as características de interesse econômico pode ser feito com intuito de avaliar o efeito de um único SNP, entretanto com a identificação de um número maior de SNPs no mesmo gene, pode-se utilizar haplótipos, que são combinações de alelos de marcadores genéticos em um único cromossomo, e sua relação com a característica, buscando avaliar a prevalência do conjunto de SNPs.

Uma estratégia de associação de genes com características de interesse econômico na produção animal é o estudo de genes candidatos. Os estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo. Esses são genes de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou processos fisiológicos responsáveis pela expressão de uma característica de interesse econômico (BRYNE & MCMULLEN, 1996; PAZ et al., 2004).

O gene do hormônio da grelina está localizado no cromossomo 22 em bovinos e é um gene candidato para identificação de marcadores moleculares, pois estimula a ingestão alimentar, a secreção de GH e a adiposidade. Segundo HINNEY et al. (2002) na regulação do balanço energético, a grelina aumenta a ingestão alimentar e diminui o gasto energético. UKKOLA et al. (2002) encontraram associações da grelina na diminuição da oxidação das gorduras, aumento da ingestão alimentar, adiposidade e peso corporal. SUN et al. (2011) alegam que o *GHRL* é um gene de suscetibilidade à obesidade. De acordo com MARTINELLI et al. (2008), o hormônio da grelina estimula a

secreção de GH, de forma que alterações em seu gene podem estar associadas a variações no peso de bovinos em diferentes idades.

Assim, objetivou-se neste estudo encontrar polimorfismos no gene do hormônio da grelina (*GHRL*) e estabelecer suas associações com características de interesse econômico em animais da raça Nelore.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Os animais utilizados nesse estudo pertencem ao Centro APTA Bovinos de Corte do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho-SP. Em 1981, nesse centro de Pesquisa, iniciou-se um experimento de seleção com zebuínos Nelore a fim de verificar a resposta à seleção para peso corporal. Para isso, foram criadas três linhas de seleção para peso ao sobreano, sendo duas selecionadas segundo maior diferencial de seleção para tal característica, as quais são denominadas Nelore Seleção e Nelore Tradicional e outra selecionada para diferencial nulo ou próximo de zero, denominada Nelore Controle.

Foram utilizados dados de 231 animais, sendo 110 fêmeas e 121 machos nascidos nos anos de 2009 e 2010, pertencentes às 29^a e 30^a progênie, os quais fazem parte da linha de seleção Nelore Tradicional. Os machos participaram da Prova de Ganho de Peso (PGP) conforme normas descritas por RAZOOK et al. (1997) e ambos da avaliação do Consumo Alimentar Residual (CAR) nos anos de 2010 e 2011, sendo que o período de avaliação se iniciou após a desmama dos animais.

Os animais permaneceram em baias individuais e passaram por um período de adaptação de no mínimo 28 dias e o período da coleta do consumo variou de 72 a 112 dias, recebendo diariamente uma quantidade de alimento pré-determinada, sendo que a sobra foi retirada, pesada e amostrada no início do dia seguinte. A cada 28 dias, uma amostra composta foi destinada para análises bromatológicas, as quais foram realizadas para determinar a matéria seca do alimento consumido e das sobras. A dieta fornecida foi composta de feno de braquiária, milho moído e farelo de algodão.

2.2 Coleta do material biológico

Foram coletados folículos pilosos de todos os animais. As amostras foram colocadas em envelopes, identificadas e armazenadas a 4°C até a extração de DNA.

2.3 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Jaboticabal – SP.

2.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de pêlo de acordo com o protocolo descrito por LIMA (2003). Cerca de 40 folículos/animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e contrifugados rapidamente. Logo, adicionaram-se 500 µL de solução Te-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguido de incubação no banho a 65°C por 2 horas, com agitação periódica. Após, adicionou-se 5 µL de proteinase K (20 mg de proteinase em 1 mL de água mili-q) por tubo e incubação no banho a 55°C por seis horas, com agitação periódica. Em seguida, incubou-se a 37°C por uma noite.

Posteriormente, adicionou-se 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra e agitou-se vigorosamente dos tubos por 10 segundos em agitador automático. Após, centrifugou-se a 12 000 rpm, em uma temperatura de 23°C, por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo que o volume final dessa fase foi de aproximadamente 300 µL.

Em seguida foi feito a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 µL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Depois de misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer - 80°C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4°C por 25 minutos a

12 000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente e após, armazenado em 100 μ L de TE (10:1).

2.5 Análise da quantidade e qualidade do DNA

A análise da quantidade e qualidade do material obtido foi verificada com uso do aparelho Espectrofotômetro Nanodrop 1000 (*Thermo Scientific*, EUA, 2008). A quantificação baseada na absorvância acontece pelo fato do DNA possuir pico de absorvância de luz no comprimento de 260 nm. Assim, a concentração é medida pela relação $1 \text{ OD}_{260} = 60 \mu\text{g/mL DNA}$.

As proteínas possuem pico de absorvância de 280 nm, sendo que essas podem ser contaminantes da solução de DNA. Portanto a verificação da qualidade do DNA é realizada através da relação de absorvância A_{260}/A_{280} , sendo que essa relação deve estar entre 1,8 e 2,0. A relação inferior a 1,8 indica contaminação com proteína. Após a verificação desses parâmetros, a solução estoque de DNA foi diluída a 60 ng/ μ L como solução uso, sendo que ambas foram congeladas em freezer -20°C .

2.6 Desenho dos *primers*

Foram desenhados três pares de *primers*, denominados de E3, I3 e E5, os quais amplificaram as regiões do éxon 3, íntron 3 (parcial) e íntron 4 (parcial) juntamente com o éxon 5, respectivamente, do gene do hormônio da grelina (*GHRL*). As quais foram escolhidas devido a outros autores terem encontrado polimorfismos nessas regiões em bovinos e em outras espécies.

Os pares de *primers* foram construídos por meio do uso do programa *Primer3* disponível no site (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e a qualidade foi verificada pelo site (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) visto que se buscou escolher *primers* com ΔG maior que zero, que não formassem *hairpin*, dímeros de um mesmo *primer* e entre *primers*, pois o *hairpin* (grampo) é formado por interações intramoleculares dentro do *primer*, ou seja, auto-pareamento dos *primers* e os dímeros são formados por interações intermoleculares entre dois *primers* de mesmo

sentido ou de sentidos opostos, onde apresentarem homologia. Tanto a formação de hairpin como a de dímeros são indesejáveis, pois podem fazer com que não haja pareamento desses primers com a sequência desejada prejudicando a PCR.

2.7 Amplificação de DNA via PCR

As amostras de DNA genômico foram amplificadas por PCR em reações de um volume final de 15 µL, composto de 1,5 µL de DNA, 1,5 µL de cada um dos *primers* (15pM), 7,5 µL de GoTaq Colorless Master Mix e 4,0 µL de água (*nuclease free*), sendo que este protocolo foi utilizado para os três tipos de pares de *primers*.

Foram utilizados os *primers* 5' AGCACCTCCTCTTTCCTGCAGAG 3' e 5' TTGGCCTGTTGATGGCAGAGAC 3' que amplificaram uma região de 282 pb que compreendia o éxon 3, 5' TGCATTGCCAGGTGGGTTCTCTAC 3' e 5' AGAATCTGCAGGCCCGCCGTGAAGT 3', os quais amplificaram uma região de 409 pb que abrangia uma parte do íntron 3, 5' GGGAGGAGAGCAGACACA GT 3' e 5' TGACCACAGACCAGGAATTG 3' que amplificaram uma região de 437 pb que compreendia uma parte do íntron 4 e o éxon 5, sendo que este último incluía uma região 3'UTR.

Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorf®, Alemanha, 2005. Foi feito uma PCR gradiente para os três pares de *primers* para identificar a temperatura ideal de anelamento, sendo que a mesma foi de 64,3°C, 63,4 °C e 63,3 °C, para os *primers* E3, I3 e E5, respectivamente. Para os ciclos foi utilizada a programação que pode ser visualizada na Tabela 1, sendo que essa repetiu-se do passo 2 ao 4 por 32 vezes. Depois do passo 5, as amostras foram mantidas a 4 °C até a retirada das mesmas do termociclador.

Tabela 1. Programação utilizada para realizar as reações de PCR no termociclador.

Passo	Primer utilizado	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ação
1		94	2	Desnaturação inicial
2		94	0,75	Desnaturação
3*	E3	64,3 °C	0,75	Pareamento dos <i>primers</i>
	I3	63,4 °C		
	E5	63,3 °C		
4		72	1	Extensão
5		72	5	Extensão final

*Dependendo do *primer* utilizado.

Após o término das amplificações, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi diluída com 2 µL de tampão de corrida (4 µL/mL de gelred) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 100 V, por aproximadamente 40 minutos. A visualização foi feita em luz UV, o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analysis da Kodak, com o intuito de analisar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado. As amostras foram mantidas a 4°C.

2.8 Sequenciamento e genotipagem

Para os três pares de *primers* diferentes, foram utilizados os 17 animais menos aparentados entre si para a realização do sequenciamento. Esses animais não possuíam pais, mães ou avós paternos e maternos em comum. Esse procedimento foi realizado para que pudessem ser verificadas diferenças genéticas entre esses animais que não fossem relacionadas ao parentesco dos mesmos. Para isso, as amostras de DNA dos referidos animais, foram amplificadas novamente para um volume final de 50

μ L e após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA.

Na região que amplificava o éxon 3 não foi encontrado nenhuma diferença genética, portanto esta demonstrou-se monomórfica. Para as regiões amplificadas com os *primers* I3 e E5 foram encontrados SNPs, portanto são regiões polimórficas. Assim, como foram mais de um SNP e não foram encontradas enzimas de restrição para genotipar todos os SNPs, optou-se pelo sequenciamento direto dos fragmentos amplificados para todos os animais. Dessa forma, os 231 animais foram genotipados por sequenciamento.

O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos os *primers* (*forward* e *reverse*) utilizando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNUPs), descrita por SANGER et al. (1977), usando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, (Applied Biosystems) em um sequenciador automatic ABI 3730 XL (Applied Biosystems) em serviço terceirizado pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV.

Para a identificação e análise dos polimorfismos, as sequências obtidas foram visualizadas com o programa CodonCode Aligner, disponível no site (<http://www.codoncode.com/aligner/download.html>).

2.9 Características estudadas

As características de interesse econômico analisadas foram o peso ao ano padronizado aos 378 dias de idade para machos (P378) e ao sobreano padronizado aos 550 dias de idade para fêmeas (P550), altura na garupa, consumo de matéria seca, consumo alimentar residual, área de olho de lombo e espessuras de gordura subcutânea no lombo e na garupa ao ano e ao sobreano.

A característica altura na garupa foi obtida em todos os animais por meio de fita métrica, tomada pela distância em centímetros do solo à ponta do osso sacro. O consumo de matéria seca foi determinado pela média do consumo no período do teste do CAR, em kg/dia. O consumo alimentar residual, em kgMS/dia, foi calculado como a

diferença entre o consumo de matéria seca observado ao longo do período experimental e o predito a partir de equação de regressão múltipla, considerando o GMD e $PV^{0,75}$ como covariáveis.

Foi utilizada a técnica de ultrassonografia como ferramenta para a obtenção das características de carcaça, incluindo área de olho de lombo, espessura da gordura subcutânea no lombo, ambas mensuradas entre a 12^a e a 13^a costelas no músculo *Longissimus dorsi* e espessura de gordura subcutânea na garupa medida entre os músculos *Gluteos medius* e *Biceps femoris*, localizados entre o ílio e o ísquio, conforme metodologia descrita por HERRING et al. (1994). As medidas de ultrassonografia foram realizadas quando os animais possuíam idades entre 329 a 408 dias ao ano e 503 a 600 dias ao sobreano.

2.10 Análises estatísticas

2.10.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas (x_i) para as variantes do gene *GHRL* (i) e genotípicas para o genótipo (ii), foram estabelecidas para a população, pelas Equações abaixo:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n}$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Em que n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo i , respectivamente; e n corresponde ao número de indivíduos analisados.

2.10.2 Teste de Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Pelo teorema de Hardy-Weinberg e através do teste de χ^2 a 5%, as frequências genotípicas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_ix_j + x_j^2$$

Em que x_i^2 corresponde à frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_ix_j$ é a frequência esperada para heterozigotos ij ; e x_j^2 corresponde à frequência dos homozigotos para o alelo j .

2.10.3 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação (r^2) foi estimado com o uso do programa computacional Plink (disponível no site <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) com o objetivo de verificar quais os SNPs que segregam juntos.

Considerando-se dois *loci* com dois alelos para cada *locus* (A1/A2 e B1/B2), tem-se que:

$r^2 = D^2 / [\text{freq}(A1) * \text{freq}(A2) * \text{freq}(B1) * \text{freq}(B2)]$ (HILL E ROBERTSON, 1966) sendo que:

$$D = \text{freq}(A1_B1) * \text{freq}(A2_B2) - \text{freq}(A1_B2) * \text{freq}(A2_B1) \text{ (HILL, 1981).}$$

2.10.4 Análise de associação entre as variantes encontradas e os fenótipos das características estudadas

As análises foram realizadas utilizando modelos lineares generalizados através do aplicativo PROC MIXED do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000). O efeito dos polimorfismos identificados para o gene *GHRL* sobre as características

P378, P550, CMS, CAR, ALTf, ALTm, AOLA, EGLa e EGGa, AOLs, EGLs e AGGs foi estimado usando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = GC_i + S_j + T_k + \alpha_1(I_{ijk} - \bar{I}) + \beta_1(L_{ijk} - \bar{L}) + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = variável dependente do $ijk^{\text{ésimo}}$ animal; GC_i = efeito fixo associado ao $i^{\text{ésimo}}$ grupo de contemporâneo; S_j = efeito fixo associado ao $j^{\text{ésimo}}$ polimorfismo do *GHRL*; T_k = efeito aleatório associado ao $k^{\text{ésimo}}$ touro; α_1 = coeficiente de regressão linear da característica Y_{ijk} em relação à idade da vaca; β_1 = coeficiente de regressão linear da característica Y_{ijk} em relação à idade do animal no momento da medida; I_{ijk} = idade da vaca; \bar{I} = média da idade das vacas; L_{ijk} = idade do animal na mensuração; \bar{L} = média das idade dos animais na mensuração; e_{ijk} = erro aleatório residual associado com a $ijk^{\text{ésima}}$ observação.

O grupo de contemporâneos foi formado por ano de nascimento (2009 e 2010), mês de nascimento (9,10,11 e 12) e sexo. Também foi realizada análise combinada dos SNPs, chamados de haplótipos, sendo que seus efeitos foram estimados utilizando o mesmo modelo estatístico acima, entretanto, retirou-se o efeito fixo dos polimorfismos e incluiu-se o efeito fixo dos haplótipos.

O teste F foi utilizado no estudo do efeito dos polimorfismos e dos haplótipos para todas as características, considerando valores de $P \leq 0,05$ como sendo significativos, com posterior aplicação do teste de Bonferroni.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de DNA e análise de qualidade

Os resultados da extração de DNA foram de excelente qualidade e quantidade, pois as amostras continham uma relação A260/A280 entra 1,80 e 2,00 e uma concentração maior que 100 ng/ μ L, como pode ser observada na Tabela 2. Dessa forma, esse material pôde ser utilizado com segurança, mesmo que algumas amostras

tenham apresentado valores para a relação A260/A280 acima de 2,00, indicando provável contaminação por RNAm ou fenol, entretanto não houve interferência na reações de amplificação.

Tabela 2. Exemplo de concentrações e relação A260/A280 das amostras de DNA, após a extração, obtidas através do aparelho NanoDrop[®].

Numero da extração	Concentração (ng/ μ L)	Relação A260/A280
7	1815,02	2,03
20	2331,36	2,02
119	1764,55	1,91
123	743,87	1,89
141	183,54	1,98

3.2 *Primers* utilizados nas reações de PCR

Foram desenhados três pares de *primers* para a amplificação do DNA. Os *primers* amplificavam as regiões do éxon 3 (E3), do íntron 3 (parcial) (I3) e do íntron 4 (parcial) juntamente com o éxon 5 (E5). O par de *primer* E3 compreendia do nucleotídeo 182 do íntron 2 até o nucleotídeo de posição 147 do íntron 3, correspondendo a um total de 282 pb. O par de *primer* I3 abrangia da posição 830 do íntron 3 à posição 1238 do íntron 3, resultando em 409 pb. O par de *primer* E5 se iniciava no nucleotídeo 288 do íntron 4 e terminava no nucleotídeo 89 após o término do éxon 5 correspondendo a uma região 3'UTR, num total de 437 pb (Tabela 3).

As sequências disponíveis para o gene *GHRL* (acessos: AY455980 e AY455979 no Genbank) foram utilizadas por COLINET et al. (2009) para descrever a quantidade e tamanhos dos éxons e íntrons desse gene (acesso: AM691749.1). Dessa forma, com base na sequência do genoma parcial do cromossomo 22 (acesso AC_000179.1), estabeleceu-se a posição dos éxons e íntrons, possibilitando o desenho dos *primers* nas regiões desejadas e a nomenclatura utilizada nos SNPs também foi baseada nessa sequência.

Tabela 3. Localização, sequência e quantidade de pares de bases (pb) dos pares de *primers* utilizados.

NP	Localização	Sequência	Tamanho (pb)
E3	éxon 3	F: AGCACCTCCTCTTTCCTGCAGAG R: TTGGCCTGTTGATGGCAGAGAC	282
I3	íntron 3 (parcial)	F: TGCATTGCCAGGTGGGTTCTCTAC R: AGAATCTGCAGGCCCGCCGTGAAGT	409
E5	íntron 4 (parcial) e éxon 5	F: GGGAGGAGAGCAGACACAGT R: TGACCACAGACCAGGAATTG	437

NP = nome do *primer*, F = *forward*, R = *reverse*

3.3 Técnica de PCR

Os tamanhos das três sequências de cada par de *primers* corresponderam com os tamanhos indicados anteriormente (Figura 1, 2 e 3). Na Figura 1, pode-se observar que o tamanho do fragmento amplificado parece um pouco maior do que deveria, isso ocorreu devido ao fato de ter-se utilizado o corante gelred em substituição ao brometo de etídio.

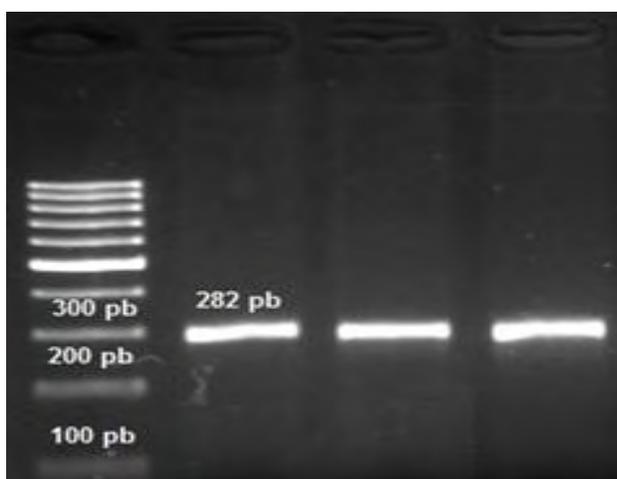


Figura 1. Fotodocumentação de confirmação dos produtos amplificados via PCR com uso do *primer* E3 para o éxon 3 do gene *GHRL* em bovinos, demonstrando o padrão de migração do fragmento com 282 pb em gel de agarose a 2%, com marcador de 100 pb.

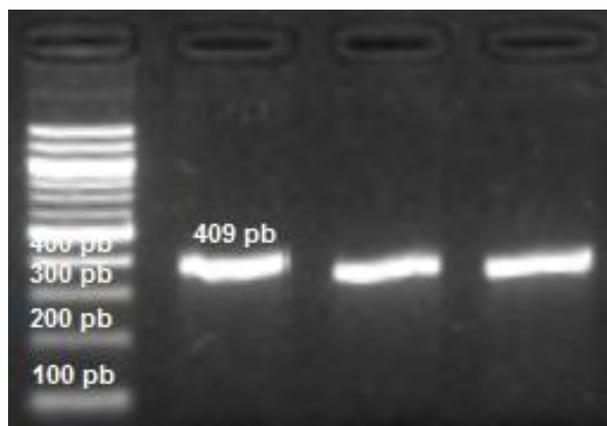


Figura 2. Fotodocumentação de confirmação dos produtos amplificados via PCR com uso do *primer* I3 para o íntron 3 (parcial) do gene *GHRL* em bovinos, demonstrando o padrão de migração do fragmento com 409 pb em gel de agarose a 2%, com marcador de 100 pb.

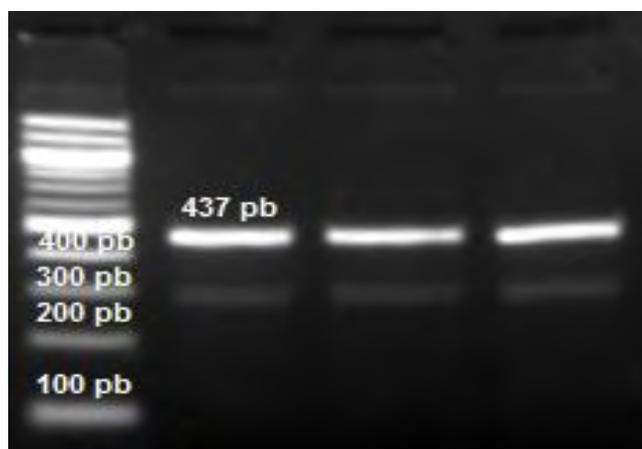


Figura 3. Fotodocumentação de confirmação dos produtos amplificados via PCR com uso do *primer* E5 para o íntron 4 e éxon 5 do gene *GHRL* em bovinos, demonstrando o padrão de migração do fragmento com 437 pb em gel de agarose a 2%, com marcador de 100 pb.

3.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR amplificados com os três pares de *primers* foram sequenciados com os *primers* *foward* e *reverse* com o intuito de se obter maior aproveitamento da região estudada. Os polimorfismos foram identificados pela presença de dois picos de cores diferentes no eletroferograma em indivíduos heterozigotos e por um pico, mas de cor diferente, para cada homozigoto. A análise dos

genótipos dos animais foi realizada alinhando-se e comparando-se as sequências de cada um dos animais através do programa CodonCode Aligner. Foram encontrados seis polimorfismos nas regiões estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Número dos SNPS e indicação da posição no gene; do *primer* utilizado; da região e da substituição dos SNPs identificados.

Nome e posição dos SNPs	<i>primer</i>	região	SNP
g.1905	I3	íntron 3	A>G
g.2068	I3	íntron 3	T>C
g.4190	E5	íntron 4	T>C
g.4269	E5	íntron 4	A>G
g.4384	E5	éxon 5	T>C
g.4450	E5	éxon 5	T>C

Foram identificados dois polimorfismos do tipo SNP para a região parcial do íntron 3 do gene *GHRL*. O SNP g.1905 A>G está no nucleotídeo de posição 1905 do gene e foram encontradas as três variações genotípicas, os homocigotos AA e GG e o heterocigoto AG (Figura 4). O SNP g.2068 T>C foi localizado na posição 2068 do gene, mas apenas duas variações genotípicas foram encontradas, o homocigoto TT e o heterocigoto TC. Não foi encontrado animal com o genótipo CC (Figura 5).

Para o par de *primer* E5, foram identificados quatro polimorfismos do tipo SNP para a região parcial do íntron 4 e do éxon 5 do gene *GHRL*. O SNP g.4190 T>C está no nucleotídeo de posição 4190 do gene e foram encontrados três variações genotípicas, os homocigotos TT e CC e o heterocigoto TC, como podem ser observados na Figura 6. Para o SNP g.4269 A>G três variações genotípicas foram encontradas, os homocigotos AA e GG e o heterocigoto AG (Figura 7), sendo que esse foi localizado na posição 4269 do gene em questão.

O SNP g.4384 T>C está no nucleotídeo de posição 4384 do gene *GHRL*, sendo que para esse SNP foram encontradas as três possíveis variações genotípicas, o heterocigoto TC e os homocigotos TT e CC, podendo ser visualizados na Figura 8. Na Figura 9, pode-se observar o SNP g.4450 T>C localizado no nucleotídeo de posição

4450 do gene, sendo que esse polimorfismo apresentou as três variações genóticas, os homozigotos TT e CC e o heterozigoto TC.

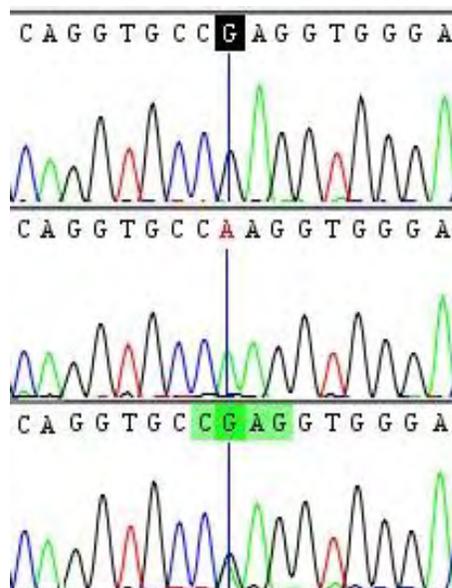


Figura 4. Saída da sequência de três animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência refere-se a um animal homozigoto GG, a segunda é de um animal homozigoto AA e a última refere-se a um animal heterozigoto AG (SNP g.1905 A>G), de cima para baixo.

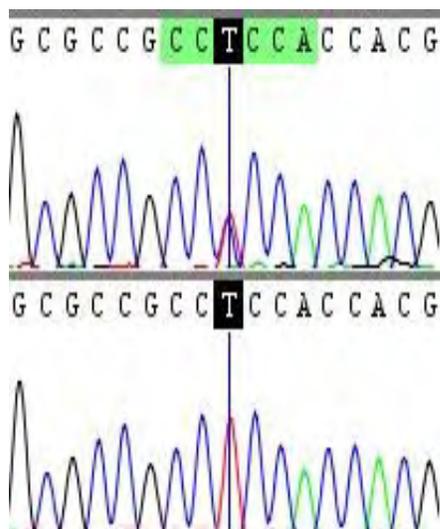


Figura 5. Saída da sequência de dois animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência refere-se a um animal heterozigoto TC e a segunda é de um animal homozigoto TT (SNP g.2068 T>C), de cima para baixo.

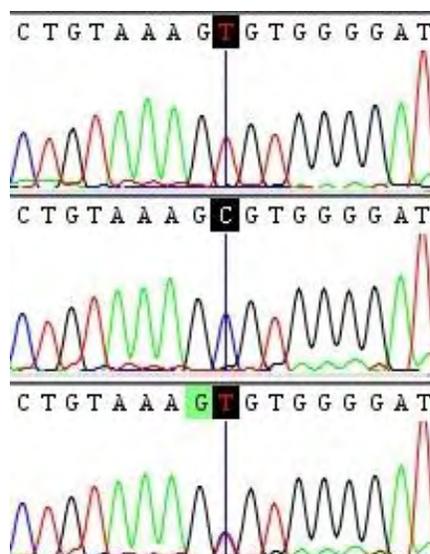


Figura 6. Saída da sequência de três animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência refere-se a um animal homocigoto TT, a segunda é de um animal homocigoto CC e a terceira pertence a um animal heterocigoto TC (SNP g.4190 T>C), de cima para baixo.

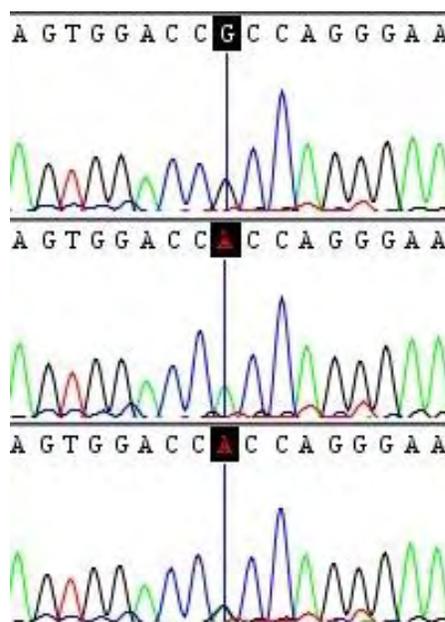


Figura 7. Saída da sequência de três animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência é de um animal homocigoto GG, a segunda sequência é de um homocigoto AA e a terceira refere-se a um animal heterocigoto AG (SNP g.4269 A>G), de cima para baixo.

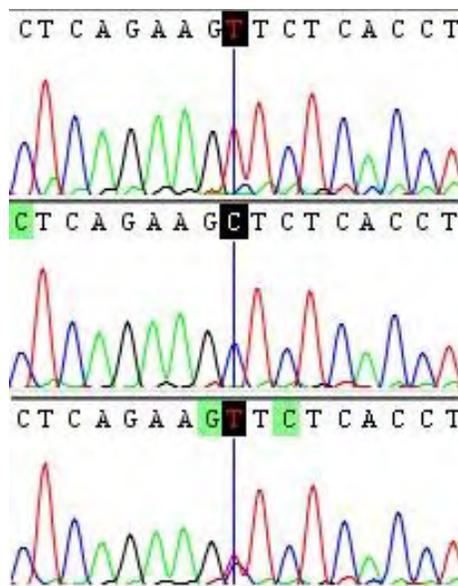


Figura 8. Saída da sequência de três animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência refere-se a um animal heterozigoto TC e a segunda é de um animal homozigoto TT (SNPg.4384 T>C), de cima para baixo.

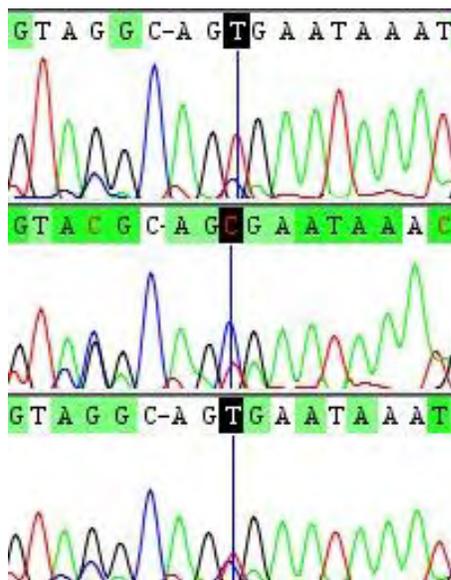


Figura 9. Saída da sequência de três animais, com genótipos diferentes, do programa CodonCode Aligner. A primeira sequência refere-se a um animal homozigoto TT, a segunda a um animal homozigoto CC e a terceira é de um animal heterozigoto TC (SNP g.4450 T>C), de cima para baixo.

Esses são os primeiros polimorfismos descritos para o gene do hormônio da grelina em bovinos da raça Nelore. Os SNPs estão localizados em regiões intrônicas e 3'UTR, portanto, não há troca de aminoácidos na formação da proteína.

3.5 Análises estatísticas

3.5.1 Frequências alélicas e genóticas

Pode-se observar, na Tabela 5, as frequências alélicas e genóticas dos seis SNPs encontrados. Os SNPs 1, 2, 3 e 5 apresentaram frequências genóticas em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de χ^2 a 5%. Entretanto, os polimorfismos 4 e 6 não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação às suas frequências genóticas, indicando que esses *loci* podem estar sob efeito do processo de seleção.

Tabela 5. Número do SNP, frequências alélicas e genotípicas observadas para os SNPs do gene *GHRL* e equilíbrio de Hardy-Weinberg estabelecido através do χ^2 a 5% para os polimorfismos encontrados.

SNP	Freq. alélica	Freq. genotípica	Nº de animais	Eq. de H-W
g.1905 A>G	A = 0,39 G = 0,61	AA = 0,13 (31) AG = 0,52 (119) GG = 0,35 (81)	231	sim
g.2068 T>C	C = 0,05 T = 0,95	CC = 0 (0) TC = 0,09 (20) TT = 0,91 (211)	231	sim
g.4190 T>C	C = 0,60 T = 0,40	CC = 0,33 (76) TC = 0,54 (122) TT = 0,13 (29)	227	sim
g.4269 A>G	A = 0,31 G = 0,69	AA = 0,06 (14) AG = 0,49 (112) GG = 0,45 (102)	228	não
g.4384 T>C	C = 0,61 T = 0,39	CC = 0,35 (79) TC = 0,53 (121) TT = 0,12 (27)	227	sim
g.4450 T>C	C = 0,46 T = 0,54	CC = 0,03 (7) TC = 0,86 (196) TT = 0,11 (25)	228	não

Para o SNP g.1905 A>G, pode-se observar que o alelo G está mais frequente na população, com 61%, em relação ao alelo A que tem uma frequência mais baixa de 39%. Para esse SNP, o genótipo mais frequente foi o heterozigoto AG com 52% de

frequência na população. Nas frequências alélicas do SNP g.2068 T>C, o alelo T apareceu em uma frequência muito maior em relação ao alelo C, isso devido a inexistência de indivíduos com o genótipo CC e poucos animais com o genótipo heterozigoto, portanto o genótipo de maior frequência para esse SNP foi o TT.

O SNP g.4190 T>C apresentou uma maior frequência alélica de G nessa população, sendo que o genótipo de maior frequência foi o heterozigoto com 54 % de presença nos animais e o homozigoto TT demonstrou frequência baixa de apenas 13%. Para o SNP g. 4269 A>G o alelo mais frequente foi o G e o genótipo mais frequente foi o heterozigoto AG com 49 % de presença nos animais, entretanto o homozigoto AA apresentou frequência muito baixa, pois apenas 6 % dos animais possuem esse genótipo.

As frequência alélicas para o SNP g.4384 T>C foram maiores para o alelo C, pois 61% dos animais o apresentaram. O genótipo mais frequente foi o heterozigoto com 53%. No SNP g.4450 T>C, o alelo de maior frequência foi T, sendo que para o genótipo o heterozigoto apresentou maior frequência com 86%. Pode-se observar que, exceto o SNP g.2068 T>C, as frequências do heterozigotos foram maiores em relação aos homozigotos existentes nessa população.

O teste do χ^2 foi realizado com 1 grau de liberdade e $P \leq 0,05$ (3,84). Esse resultado demonstra que as frequências observadas para os SNPs g.1905 A>G, g.2068 T>C, g.4190 T>C e g.4384 T>C diferem significativamente das frequências esperadas, portanto esses SNPs estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra, diferentemente dos SNPs g. 4269 A>G e g.4450 T>C.

3.5.2 Desequilíbrio de ligação

Os valores de r^2 para os seis SNPs genotipados podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores estimados de r^2 para seis SNPs genotipados em toda a população.

SNPs	g.1905	g.2068	g.4190	g.4269	g.4384	g.4450
g.1905	-	-	-	-	-	-
g.2068	0,000	-	-	-	-	-
g.4190	0,954	0,001	-	-	-	-
g.4269	0,286	0,019	0,274	-	-	-
g.4384	0,945	0,000	0,955	0,277	-	-
g.4450	0,000	0,001	0,002	0,000	0,000	-

Segundo ARDLIE et al., (2002), se o r^2 for maior que 0,33 o desequilíbrio de ligação é forte. Os valores de r^2 variaram de 0,000 a 0,955. Os SNPs g.2068, g.4190, g.4269 e g.4450 apresentaram valores de r^2 menores que 0,33, com todos os demais SNPs e entre si, variando de 0,000 a 0,286, o que significa que estão em equilíbrio de ligação e que são herdados separadamente. Os SNPs g.1905, g.4190 e g.4384 apresentaram valores maiores que 0,33 entre si para o r^2 , significando que esses SNPs estão em desequilíbrio de ligação e que provavelmente são herdados juntos.

3.5.3 Resultado das análises de associação dos SNPs com valores fenotípicos das características analisadas

Para a análise de associação dos SNPs com os valores fenotípicos das características analisadas, foram utilizados os SNPs g.2068, g.4269, g.4384 e g.4450, pois os SNPs g.2068, g.4269 e g.4450 estão em equilíbrio de ligação, portanto são herdados separadamente. Já os SNPs g.1905, g.4190 e g.4384, estão em desequilíbrio, sendo escolhido o SNP 5 para realizar as análises de associações.

Foram realizadas análises de associações dos SNPs encontrados com as características peso ao sobreano de fêmeas padronizado para 550 dias, peso ao ano de machos padronizado para 378 dias, consumo de matéria seca, consumo alimentar residual, altura das fêmeas, altura dos machos, área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea no lombo e na garupa ao ano e ao sobreano conforme ilustradas

na Tabela 7, 8 e 9. Na Tabela 10, pode-se observar os valores de P para as associações dos haplótipos com as mesmas características.

Tabela 7. Médias, erros padrão e valores de P (para os SNPs), de acordo com os genótipos encontrados para as características de crescimento P550, P378, ALTf e ALTm.

Características¹				
	P550	P378	ALTf	ALTm
SNP2				
P	0,4044	0,0152*	0,1633	0,6641
CT	345,98±14,38	324,25±9,99 ^b	137,66±1,55	132,17±1,34
TT	357,72±5,10	347,27±7,42 ^a	139,78±0,55	131,62±0,98
SNP4				
P	0,0344*	0,2588	0,0533*	0,7423
AA	351,73±11,48 ^{ab}	351,16±14,82	139,04±1,24 ^{ab}	130,55±1,99
AG	352,69±5,37 ^b	347,48±8,03	139,27±0,58 ^b	131,87±1,05
GG	366,27±6,11 ^a	338,07±8,03	140,61±0,66 ^a	131,62±1,04
SNP5				
P	0,0490*	0,2778	0,0526*	0,8762
CC	351,94±6,24 ^b	348,92±8,48	138,80±0,97 ^b	131,83±1,12
CT	357,49±5,48 ^b	388,66±8,48	140,07±0,54 ^a	131,49±1,13
TT	373,95±8,92 ^a	337,663±10,13	140,70±0,96 ^a	132,06±1,34
SNP6				
P	0,5624	0,1634	0,6077	0,2643
CC	361,31±13,32	400,23±32,32	140,23±1,32	136,89±4,33
CT	356,06±5,27	340,76±7,48	139,60±0,57	131,53±0,98
TT	364,89±9,43	345,96±11,50	140,44±1,01	132,91±1,53

¹P550 = peso ao sobreano de fêmeas padronizado para 550 dias (kg), P378 = peso ao ano de machos padronizado para 378 dias (kg), ALTf = altura das fêmeas (cm), ALTm (cm) = altura dos machos.

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste F, 5%).

Tabela 8. Médias, erros padrão e valores de P (para os SNPs), de acordo com os genótipos encontrados para as características de eficiência alimentar CMS e CAR.

	Características ¹	
	CMS	CAR
SNP2		
P	0,0262*	0,5620
CT	6,18±0,17 ^b	0,066±0,10
TT	6,54±0,10 ^a	0,013±0,05
SNP4		
P	0,3761	0,4960
AA	6,26±0,20	-0,095±0,11
AG	6,53±0,10	0,010±0,05
GG	6,50±0,11	0,028±0,06
SNP5		
P	0,5036	0,7006
CC	6,56±0,11	0,011±0,06
CT	6,45±0,11	0,002±0,05
TT	6,56±0,15	0,067±0,08
SNP6		
P	0,4827	0,6434
CC	6,70±0,26	0,024±0,14
CT	6,49±0,10	0,011±0,05
TT	6,62±0,16	0,084±0,09

¹CMS = consumo de matéria seca (kg/dia), CAR = consumo alimentar residual (kgMS/dia).

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste F, 5%).

Tabela 9. Médias, erros padrão e valores de P (para os SNPs), de acordo com os genótipos encontrados para as características de carcaça AOLa, EGLa, EGGa, AOLs, EGLs e EGGs.

	Características ¹					
	AOLa	EGLa	EGGa	AOLs	EGLs	EGGs
SNP2						
P	0,4390	0,6888	0,3643	0,0121*	0,1588	0,2207
CT	46,57±1,27	1,78±0,19	4,76±0,38	50,61±2,34 ^b	2,03±0,41	4,96±0,72
TT	47,56±0,45	1,85±0,06	5,08±0,17	56,55±1,11 ^a	2,61±0,20	5,83±0,37
SNP4						
P	0,6351	0,7908	0,8400	0,8067	0,9114	0,6202
AA	48,12±1,47	1,99±0,22	5,21±0,43	57,41±2,61	2,59±0,44	6,04±0,76
AG	47,80±0,56	1,86±0,08	5,05±0,19	55,94±1,27	2,61±0,22	5,92±0,40
GG	47,17±0,59	1,83±0,08	5,13±0,20	56,42±1,32	2,53±0,23	5,62±0,41
SNP5						
P	0,0730	0,0558*	0,0115*	0,0762	0,2109	0,1121
CC	47,26±0,65	1,94±0,10 ^{ab}	5,35±0,22 ^a	55,76±1,33	2,72±0,23	6,13±0,43
CT	47,32±0,51	1,76±0,08 ^b	4,84±0,18 ^b	55,44±1,27	2,40±0,22	5,43±0,41
TT	47,75±1,04	2,11±0,15 ^a	5,59±0,32 ^a	59,56±1,86	2,78±0,32	6,07±0,58
SNP6						
P	0,2470	0,4780	0,3489	0,1033	0,8871	0,7919
CC	46,22±1,90	2,00±0,28	5,64±0,54	52,22±3,06	2,80±0,53	6,28±0,91
CT	47,37±0,45	1,86±0,07	5,05±0,16	56,18±1,14	2,56±0,20	5,77±0,37
TT	49,25±1,15	2,02±0,17	5,39±0,35	59,19±2,10	2,63±0,37	5,99±0,65

¹AOLa = área de olho de lombo ao ano (mm), EGLa = espessura de gordura subcutânea no lombo ao ano (mm), EGGa = espessura de gordura subcutânea na garupa ao ano (mm), AOLs = área de olho de lombo ao sobreano (mm), EGLs = espessura de gordura subcutânea no lombo ao sobreano (mm), EGGs = espessura de gordura subcutânea na garupa ao sobreano (mm).

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste F, 5%).

Tabela 10. Número de haplótipos formados e valores de P (para os haplótipos), para as características AOLa, EGLa, EGGa, AOLs, EGLs e EGGs.

Características ¹	Número de haplótipos formados	Valores de P
P550	21	0.4130
P378	22	0.4932
ALTf	21	0.4180
ALMm	22	0.5416
CMS	30	0.2558
CAR	30	0.0973
AOLa	29	0.3694
EGLa	29	0.0580
EGGa	29	0.0028*
AOLs	20	0.3066
EGLs	20	0.7725
EGGs	20	0.5913

¹P550 = peso ao sobreano de fêmeas padronizado para 550 dias (kg), P378 = peso ao ano de machos padronizado para 378 dias (kg), ALTf = altura das fêmeas (cm), ALMm (cm) = altura dos machos, CMS = consumo de matéria seca (kg/dia), CAR = consumo alimentar residual (kgMS/dia), AOLa = área de olho de lombo ao ano (mm), EGLa = espessura de gordura subcutânea no lombo ao ano (mm), EGGa = espessura de gordura subcutânea na garupa ao ano (mm), AOLs = área de olho de lombo ao sobreano (mm), EGLs = espessura de gordura subcutânea no lombo ao sobreano (mm), EGGs = espessura de gordura subcutânea na garupa ao sobreano (mm).

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não são significativamente diferentes (Teste F, 5%).

De acordo com os resultados das Tabelas 7, 8 e 9, houve associações do SNP2 com as características P378, CMS e AOLa ($P \leq 0,05$). Pode-se notar que os animais com genótipo TT, em média, consumiram mais matéria seca e obtiveram, também, maiores P378 e AOLa. SHERMAN et al. (2007) identificaram um SNP A/G no íntron 3 do gene *GHRL* em bovinos taurinos, e encontraram associações ($P \leq 0,10$) com eficiência alimentar e características de carcaça, porém, diferente do presente estudo, mas não encontraram associações com peso corporal.

Em relação ao SNP4, foram encontradas associações do mesmo com as características P550 e ALTf. É possível notar que as características P550 e ALTf para o SNP4 variaram juntas, pois os animais com genótipos GG e AA apresentaram maiores médias para P550 e, também, para a característica ALTf (Tabela 7). SUN et al. (2011) associaram 11 SNPs com características de crescimento, entre elas peso ao sobreano, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de genótipos para qualquer SNP.

Observam-se nas Tabelas 7 e 9 que as médias dos animais com genótipo TT para as características P550, ALTf, EGLa e EGGa no SNP5 apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em relação às médias dos animais com os outros genótipos, sugerindo que os animais que apresentaram maior P550, também apresentaram maiores ALTf, EGLa e EGGa. Esses resultados condizem com os encontrados por KIM et al. (2004), que identificaram um polimorfismo no gene *GHRL*, sendo esse associado com espessura de gordura subcutânea em uma população de suínos da raça Berkshire.

Não houve associações do polimorfismo SNP6 com as características estudadas ($P > 0,05$), demonstrando que esse SNP não contribui para as diferenças fenotípicas encontradas nos animais para essas características.

Na tabela 10, pode-se observar que foram formados de 20 a 30 haplótipos, dependendo da característica analisada. Apenas os haplótipos associados com característica EGGa apresentaram diferença significativa entre si ($P \leq 0,05$).

Também foi realizado o Teste de Bonferroni para associação dos SNPs com todas as características, entretanto não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os genótipos para esse teste. Ao aplicar o Teste de Bonferroni na análise dos haplótipos, foram encontradas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os haplótipos na característica EGGa, onde $P = 0,028$ para o referido teste.

Os resultados apresentados condizem com as funções do hormônio da grelina que conhecidamente influenciam o peso corporal dos animais, devido ao estímulo na secreção de GH, além de induzir o CMS e a adiposidade.

Trabalhos relacionados a polimorfismos no gene da grelina são escassos na literatura. Nesse estudo, os SNPs que apresentaram associação com as características, situam-se em regiões não codificadoras do DNA, ou seja, localizam-se em íntrons e

regiões 3'UTR. Entretanto, as associações encontradas podem ser devido aos SNPs localizados nos íntrons estarem em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo presente em uma região de éxon não estudada ou podem estar em regiões de *splicing*, influenciando no local que o spliceossomo for atuar. Já as associações dos SNPs encontrados em regiões 3'UTR, podem fazer parte de um micro RNA e dessa forma, podem influenciar na formação dos aminoácidos.

Assim, supõe-se que possa haver alguma relação dos SNPs identificados nas regiões não codificadoras do DNA com as características estudadas. Sugere-se que estudos futuros sejam realizados com o intuito de verificar a implicação dos íntrons nessas características.

4 CONCLUSÃO

Foram identificados polimorfismos no gene do hormônio da grelina (*GHRL*) e associações desses polimorfismos com pesos ao ano e ao sobreano para machos e fêmeas respectivamente, altura de garupa em fêmeas, consumo de matéria seca, espessura de gordura subcutânea no lombo e na garupa ao ano e área de olho de lombo ao sobreano. Pelo teste de Bonferroni, há diferença significativa entre os haplótipos formados para a característica espessura de gordura subcutânea na garupa ao ano. Dessa forma, o gene da grelina pode ser um importante candidato para identificar variações genéticas que influenciam em características de importância econômica.

5 REFERÊNCIAS

Andersson, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature reviews genetics**, v.2, p.130–138, 2001.

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature reviews genetics**, v.3, p.299-309, 2002.

BRYNE, P. F.; MCMULLEN, M. D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, v.7, p.24-7, 1996.

BUCHMAN, A. R.; BERG, P. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, p.4395-4405, 1988.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.

CALLIS, J.; FROMM, M.; WALBOT, V. et al. Introns increase gene expression in cultured maize cells. **Genes Development**, v.1, p.1183–1200, 1987.

COLINET, F. G; PORTETELLE, D.; RENAVILLE, R. Molecular characterization of the bovine *GHRL* gene (Short Communication). **Archiv Tierzucht**, v.52, p.79-84, 2009.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. Biotecnologia animal. Estudos avançados, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

CURI, R. A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce**. 2004 Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2004.

DUNCKER, B. P.; DAVIES, P. L.; WALKER, V. K. Introns boost transgene expression in *Drosophila melanogaster*. **Molecular and General Genetics**, v.254, p.291–296, 1997.

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

GARCIA, J. F. Utilização de marcadores moleculares para a seleção. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2006. p. 195-201.

HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K.; BENYSHEK, L. L. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2216-26, 1994.

HILL, H. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, v.38, p.209-216, 1981.

HILL, H. G., ROBERTSON, A. The effect of linkage on limits to artificial selection. **Genetical Research**, v.8, p.269-294, 1966.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F., SCHÄFER, H., SIEGFRIED, W., GOLDSCHMIDT, H., REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, p.2716-24, 2002.

KIM, K.; THOMSEN, H.; BASTIAANSEN, J.; NGUYEN, N. T.; DEKKERS, J. C. M.; PLASTOW G. S.; ROTHSCHILD, M. F. Investigation of obesity candidate genes on porcine fat deposition quantitative trait loci regions. **Obesity Research**. v.12, p.1981–1994, 2004.

LIMA, S. P. G. **Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.** Jaboticabal, 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, 2003.

MARTINELLI, C. E.; CUSTÓDIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, p.717-725, 2008.

MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2002.

RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; CYRILLO, J. N. S. G. et al. **Prova de ganho de peso**: normas adotadas pela Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1997. 42p. (Boletim Técnico, 40).

REGITANO, L. C. de A.; COUTINHO, L. L. (Ed.) **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2001. 215p.

PAZ, C. C. P.; PACKER, I. U.; FREITAS, A. R.; TAMBASCO-TALHARIS, D.; REGITANO, L. C. A., ALENCAR, M. M.; RODRIGUES, A. A. Influência de polimorfismos genéticos sobre os parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.858-69, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U.S.A. v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SAS INSTITUTE. User's guide. Cary: SAS Institute, 2000.

SHERMAN, E. L.; NKRUMAH, J. D.; MURDOCH, B. M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S. S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1-16, 2007.

SUN, J.; JIN, Q.; ZHANG, C.; FANG, X.; GU, C.; LEI, C.; WANG, J.; CHEN, H. Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (*GHRL*) and Syndecan-1 (*SDC1*) genes that are associated with growth traits in cattle. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.3153-3160, 2011.

UKKOLA, O; POYKOO, S. Ghrelin. Growth and obesity. **Annal of Medicine**, v. 34, p.102-108, 2002.