UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Estudo de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos como candidatos à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore

Marina Mortati Dias
Biotecnologista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Estudo de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos como candidatos à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore

Marina Mortati Dias

Orientador: **Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira**

Co-Orientador: **Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza**

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.

Dias, Marina Mortati
D541e **Estudo de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos como candidatos à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore / Marina Mortati Dias. – – Jaboticabal, 2012**
vii, 49 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Henrique Nunes de Oliveira
Co-orientador: Fábio Ricardo Pablos de Souza
Banca examinadora: Lucia Galvão de Albuquerque, Simone Cristina Méo Niciura
Bibliografia

1. SNPs. 2. Genotipagem. 3. FABP4. 4. PPP3CA. 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, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Marina Mortati Dias – solteira, nascida em 7 de junho de 1985, na cidade de Araraquara – SP, filha de Gabriel Dias Neto e Inês Maria Mortati Dias. Iniciou em março de 2007 o curso de graduação em Biotecnologia na Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, campus de Araras obtendo o título de Biotecnologista em dezembro de 2010. Durante a graduação, foi bolsista PIBIC de Iniciação Científica sob orientação do Prof. Dr. Jozivaldo Prudêncio Gomes de Morais. 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. Henrique Nunes de Oliveira.

"... e não há ninguém com espírito sem preconceitos que consiga estudar qualquer criatura viva, por mais humilde que seja, sem se deixar entusiasmar pela sua maravilhosa estrutura e propriedades"

Charles Darwin, *em Descendência do Homem (1871)*

À minha família, em especial aos meus avós que eu sei que estão comigo por onde quer que eu vá. Aos meus pais Inês Maria e Gabriel, ao meu irmão Guilherme e sua esposa Steffany por serem meu porto seguro.

Dedico e Ofereço

Agradecimento

Agradeço...

À Deus, por ter me dado tudo o que eu tenho, família, amigos, todas as oportunidades e até mesmo posto em meu caminho obstáculos, pois tudo o que eu vivi e aprendi é que me tornou quem sou hoje.

Ao professor Dr. Henrique Nunes de Oliveira, pouco me conhecendo me aceitou como orientada em meu estágio obrigatório, depois tive o prazer de tê-lo como orientador do mestrado e agora nessa nova etapa que irá iniciar, terei a hora de ser novamente orientada dele em meu doutorado. O senhor me ensinou além de melhoramento genético animal, o senhor me mostrou o que é um bom orientador e com calma e um sorriso podemos resolver tudo. Muito Obrigada!!

À minha família, por sempre, sempre, estar ao meu lado, independente das minhas escolhas. Foi a educação, o exemplo, amizade e amor que sempre encontrei dentro de casa que me faz acreditar que posso alcançar todos os meus objetivos Sem vocês eu não sou nada!

Ao meu co-orientador Fábio, por toda ajuda, conhecimento e amizade. Fico feliz em poder mesmo agora com você indo para longe, contar novamente com o seu apoio e ajuda. Muito Obrigada!!

À Universidade Federal de São Carlos, que me deu todo o ensinamento necessário para me formar como Biotecnologista, chegar até aqui e ir muito mais além.

À todos os orientadores que tive até chegar aqui : Profa. Marta Verruma Bernardi, Prof. Jozivaldo Prudêncio Gomes de Morais, Dra. Simone Cristina Méo

Niciura, Profa. Dra. Alessandra Penha e Msc. Renata Wolf Suñé. Acredito que se não fosse o conhecimento e todas as oportunidades que eu tive, não estaria onde estou.

À Conexão Delta G pela doação do material biológico e disponibilidade dos dados.

Aos meus amigos do departamente da pós-graduação: Gregório, Fernanda, Patrícia, Larissa, Fabieli, Francisco , Dierclés, Arione, Luciana e a Iara. Obrigado pela convivência, risadas e ensinamentos.

Aos meus amigos: Ellen (Gorda), Gisela (Cabeção), Vanessa, Maristella, Larissa (viz), Ana Luisa, Adriana ,Camila (Bagaça), Mariana (Piriquita), Débora (Frita), Alessandra, André (Xuxa), Robson (Tru), Leo (Gordo) . Obrigado por estarem em minha vida. Sem vocês eu não sou ninguém!

À minha banca de qualificação e defesa, Dr. Henrique, Dr. Marcílio, Dra. Arione, Dr. Fábio, Dra. Lúcia e Dra. Simone, pela disponibilidade atenção e valiosas sugestões para aprimorar este trabalho

À UNESP e ao Programa de Pós-Graduação, pelo apoio financeiro devido à bolsa do programa de pós-graduação junto com a **CAPES**, pela oportunidade de crescimento científico

Aos funcionários da FCAV-Unesp/Jaboticabal pela ajuda principalmente da Seção de Pós-Graduação, Biblioteca e Departamento de Zootecnia.

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

à todos vocês o meu:
Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

Capítulo 1: Considerações Gerais

1. Introdução.....1

2. Revisão Bibliográfica.....2

2.1. Precocidade Sexual e sua Importância na Produção Animal.....2

2.2. A Influência do Tecido Adiposo na Precocidade de Prenhez.....4

2.3. Genética Molecular e o Melhoramento Animal.....6

2.4. Genes Candidatos.....9

3. Objetivo.....18

3. Referências Bibliográficas.....18

Capítulo 2: Estudo de genes relacionados ao metabolismo de lipídios como candidatos à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore

Resumo.....27

Abstract.....28

1. Introdução.....29

2. Objetivo.....30

3. Material e Métodos

3.1. Animais e Coleta das Amostras.....30

3.2. Extração de DNA.....31

3.3. Quantificação e Qualidade do DNA.....32

3.4. Genes Candidatos.....33

3.5. Painel de SNP e Genotipagem.....34

3.6. Reconstrução de Haplótipos.....35

3.7. Análise Estatística.....35

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração de DNA e Genotipagem.....37

4.2. Seleção de SNPs e formação de haplótipos.....37

4.3 Análises estatísticas.....40

5. Discussão.....41
6. Conclusão.....44
7. Referências Bibliográficas.....44

Capítulo 1: Considerações Gerais

1. Introdução

A raça Nelore é importante para o contexto nacional de produção de carne, pois é bem adaptada ao clima tropical (BIANCHINI et al., 2006). Porém, um dos problemas da pecuária de corte brasileira refere-se a baixa precocidade reprodutiva do rebanho. A produção do gado de corte depende do seu desempenho reprodutivo, uma vez que, os aspectos reprodutivos interferem na eficiência e lucratividade dessa atividade. (OLIVEIRA et al., 2003).

A redução da idade ao primeiro parto poderá levar ao aumento no rendimento econômico proporcionado pelos animais, devido à diminuição dos custos de manutenção de novilhas, à antecipação do início da idade produtiva das vacas, à recuperação mais rápida do capital investido e ao possível aumento da vida útil (PEROTTO et al., 2006a). Outros aspectos interessantes relacionados a esta característica são seus efeitos sobre o intervalo de gerações e o progresso genético. Quanto menor for a idade ao primeiro parto, maior será a possibilidade de haver um menor intervalo de gerações e, em decorrência, maior a taxa de progresso genético por unidade de tempo obtida como resposta à seleção (PEROTTO et al., 2006b).

A puberdade é função do genótipo e do nível de nutrição até a idade de reprodução (FRIES, 2005). Altas taxas de ganho de peso para novilhas mestiças, obtidas por meio de elevados níveis de alimentação através de concentrado no inverno, propiciaram maior precocidade sexual e peso à puberdade (SHORT & BELLOWS, 1971).

Uma das influências do peso sobre a puberdade é a resposta do hipotálamo ao estímulo da secreção de leptina pelos adipócitos, hormônio responsável pela saciedade alimentar e altamente correlacionado com obesidade em humanos e ratos (VOZZI, 2008). O hipotálamo, por sua vez, é responsável pela produção do hormônio liberador de gonadotrofina (*GnRH*), liberador do luteinizante (*LH*) e do foliculoestimulante (*FSH*), hormônios necessários ao início da puberdade (DODE, 2002; THOMPSON, 2006) .

Brumatti et al. (2011) observaram que a taxa de prenhez precoce, como medida direta da fêmea, possui alto valor econômico associado. Altos valores de herdabilidade para taxa de prenhez precoce que possibilitam ganho genético por seleção foram descritos na literatura (SHIOTSUKI et al., 2009 e BOLIGON e ALBUQUERQUE et al, 2011), porém, por ser uma característica de difícil mensuração nas fêmeas, os ganhos genéticos para essa característica têm sido obtidos principalmente por meio de seleção indireta, sendo a característica selecionada o perímetro escrotal (ELER et al., 2010).

Havendo possibilidade de se aplicar seleção assistida por marcadores moleculares, o potencial genético pode ser determinando com maior acurácia. Com isso, a avaliação pode acontecer de forma antecipada, sem necessidade de mensuração das características na progênie (REGITANO & COUTINHO, 2008; FERRAZ e ELER, 2010).

2. Revisão de literatura

2.1. Precocidade sexual e sua importância na produção animal

As características reprodutivas, em particular a idade ao primeiro parto, estão diretamente ligadas à eficiência de produção dos rebanhos (PHOCAS et al., 1998). Devido à importância do tema, vários trabalhos indicam vantagens de diminuir a idade ao primeiro parto das fêmeas.

Segundo Formigoni et al. (2006), a taxa de prenhez e habilidade de permanência no rebanho em animais da raça Nelore são dependentes entre si. O desempenho produtivo das novilhas depende da idade em que entram em reprodução pela primeira vez. Quanto mais cedo elas parirem maior será sua vida reprodutiva e, com isso, haverá aumento na produtividade do sistema de cria (MARTIN et al., 1992; BERETTA et al., 2001; FORMIGONI et al., 2006).O perímetro escrotal é a única característica associada à precocidade sexual que é considerada em praticamente todos os programas avaliação genética de bovinos de corte no Brasil (CONEXÃO DELTA, 2010; LÔBO et al., 2011). Um dos motivos é que esta característica possui correlação genética negativa, variando de -0,13 a

-0,44, com a idade ao primeiro parto (GRESSLER et al., 2000; PEREIRA et al., 2000; BOLIGON et al., 2010a), e positiva, variando de 0,11 a 0,38 com características de crescimento (BOLIGON et al., 2010b). A seleção para aumento do perímetro escrotal leva a aumento da precocidade sexual. Contudo, a resposta será notada a longo prazo, pois os valores da correlação não são altos e, com isso, a resposta correlacionada para precocidade sexual é lenta.

A idade ao primeiro parto (IPP) é outra característica que vem sendo empregada como indicadora de precocidade sexual. Em geral, os valores de herdabilidade para IPP variam de baixos a moderados (GRESSLER et al., 2000; PEREIRA et al., 2000; DIAS et al., 2004b; BOLIGON et al., 2010a). Isto indica grande influência do ambiente, dos efeitos não aditivos e também que a resposta à seleção para esta característica deve ser lenta. Um aspecto importante que explica o baixo valor da herdabilidade é o fato de a maioria dos modelos de análise empregados, apenas permitir a inclusão de fêmeas paridas. A utilização de metodologias que permitam a inclusão nas análises de todas as fêmeas, tanto as que pariram como as que estão vazias, proporcionam incrementos nas estimativas de herdabilidade (GRESSLER et al., 2000; DIAS et al., 2004).

Outra característica que está sendo utilizada para avaliar a precocidade sexual de fêmeas é a ocorrência de prenhez. Todas as fêmeas são naturalmente incluídas nas análises, pois a ocorrência de prenhez é uma característica binária, sendo atribuído "1" (sucesso) para as novilhas que conceberam e pariram, e "0" (fracasso) para as que falharam. A herdabilidade para prenhez de novilhas Nelore com 16 meses de idade é de 0,52, enquanto para novilhas com 24 meses é de 0,12 (SILVA et al., 2005).

A seleção para maior peso ao sobreano, escores de conformação, bem como circunferência escrotal podem levar a pequenas mudanças favoráveis na precocidade sexual (ELER et al 2004; SHIOTSUKI et al., 2009; BOLIGON & ALBUQUERQUE, 2011). Segundo Shiotsuki et al. (2009) a seleção para prenhez aos 16 meses resulta em animais com menor altura. Todavia, a seleção para maiores pesos ou ganhos de peso e escores visuais de terminação e musculatura afeta muito pouco ou não afeta a ocorrência de prenhez aos 16 meses.

Vários estudos demonstram que novilhas Nelore apresentam grande variabilidade genética com relação à precocidade sexual e frequentemente há estudos realizados nesta área, tanto em genética quantitativa, como molecular. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permitirá que o potencial genético de um animal seja determinado com maior acurácia e antes mesmo da expressão do seu fenótipo, ou mesmo que o animal sob seleção não expresse o fenótipo, como é o caso da idade ao primeiro parto nos machos. Assim, é possível determinar até mesmo o potencial genético de um embrião sem que seja necessário avaliar sua produção e/ou progênie (REGITANO & COUTINHO, 2008). Com isso, a biologia molecular poderá auxiliar os programas de melhoramento genético de bovinos de forma a promover retorno econômico mais rápido para o produtor e para o país.

2.2. A influência do tecido adiposo na precocidade de prenhez

O início da puberdade e maturidade sexual em fêmeas bovinas é influenciado, entre muitos fatores, pela taxa de ganho de peso e composição corpórea. O aumento na deposição de gordura corporal reduz o *feedback* negativo causado pelos estrógenos na pulsatilidade de *GnRH* e *LH*, sendo que o consumo adequado de energia é o principal fator nutricional que afeta o desempenho reprodutivo de vacas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; THOMPSON, 2006).

Animais em balanço de energia negativo têm menores concentrações plasmáticas de glicose, insulina e fator de crescimento semelhante à insulina-I(*IGF-I*); têm menor frequência de pulsos de *LH*; possuem menores concentrações de progesterona no plasma e apresentam alterações na atividade ovariana (FONSECA-ALANIZ et al, 2006; SALMAN & COSTA, 2006; SANTOS & FILHO, 2008).

O tradicional conceito de que o tecido adiposo é somente um reservatório passivo para o armazenamento de energia não é mais válido (KERSHAW & FLIER, 2004; FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Siiteri (1987) identificou o tecido adiposo como o local principal para o metabolismo dos esteróides sexuais. Zhang

et al. (1994) comprovaram que a leptina é liberada pelo tecido adiposo, estabelecendo-o assim, como órgão endócrino.

A leptina é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos e age sobre o sistema nervoso central sinalizando sobre o estado nutricional e assim regulando o consumo alimentar e o balanço energético (GARCIA et al, 2002; BELTRAN, 2007). Após este hormônio entrar na corrente sanguínea, ele atinge os sítios hipotalâmicos, nos quais controla o apetite e a secreção de GnRH que, por sua vez, é liberador de hormônios como o *FSH* e o *LH* (THOMPSON, 2006; BELTRAN, 2007). Outro hormônio que também está relacionado com essas respostas é o *IGF-I*.

Sabe-se que o início da puberdade e a manutenção da função reprodutiva estão fisiologicamente ligados à nutrição e à condição corporal. Há interações importantes entre a nutrição e o sistema reprodutivo (KEISLER & LUCY, 1996), condições de restrição alimentar ou nutrição inadequada durante o período pré-púbere podem acarretar atrasos da puberdade (GARCIA et al., 2002).

Quando houve situações de restrição alimentar, observou-se redução na frequência de pulsos de *LH* (SCHILLO, 1992). Essa diminuição da frequência dos pulsos de *LH* pode atrasar o início da puberdade, sendo que o restabelecimento do balanço energético positivo poderia estimulá-lo. (DODE, 2002; WILLIAMS, 1998 citado por BELTRAN, 2007).

Outro fator que se pode considerar importante para a precocidade sexual é o ganho em peso da desmama à puberdade. Novilhas Nelore que apresentam maior peso aos 12 e 18 meses possuíram o primeiro cio em menor idade (ALENCAR et al., 1987).

O hormônio da leptina, produzido pelos adipócitos, estimula a secreção de *IGF-I* além de aumentar sua disponibilidade para o sistema nervoso central (SNC) (FOSTER & NAGATANI, 1999). Desse modo, o SNC reconhece que o corpo atingiu o peso adequado para a reprodução.

Não foram encontrados na literatura consultada relatos de polimorfismo de outros genes que estão ligados com o metabolismo do tecido adiposo e que tenham efeito sobre a precocidade sexual, contudo, dada a existência de muitas

interações entre peso e características reprodutivas, é provável que polimorfismos com efeito sobre o metabolismo de gordura, afetem também a precocidade sexual.

2.3. Genética molecular e o melhoramento animal

A partir dos trabalhos de Mendel em 1865, novos conhecimentos e ferramentas surgiram, permitindo uma melhor compreensão dos padrões de herança das características observadas. Segundo Regitano & Coutinho (2008) destacam-se, neste contexto, Avery demonstrando que a informação genética estava contida na molécula de DNA em 1944; Watson, Crick e Franklin com a descoberta da estrutura tridimensional do DNA em 1953; e Saiki e Mullis com o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (*PCR*) em 1985 (FRANCO e MELO, 2006), culminando recentemente, no sequenciamento do genoma de vários organismos como humanos, ovinos, bovinos, entre outros.

A partir do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular como sequenciamento do DNA, surgiu a possibilidade do uso de marcadores moleculares para rastrear regiões genômicas relacionadas a doenças e características de interesse em várias espécies, com possível utilização deste conhecimento em programas de melhoramento.

Há duas estratégias principais de identificação de mutações causadoras de variação em características quantitativas, como é o caso da maioria das características de interesse econômico. A primeira seria por meio de teste de associação entre marcadores microssatélites e variações fenotípicas, para rastreamento das regiões genômicas de elevados efeitos e que provavelmente contenham genes relacionados a expressão fenotípica da característica. A segunda seria a detecção de polimorfismos em genes que podem estar diretamente relacionados com a característica de produção, denominados genes candidatos (VENERONI, 2010).

Os genes candidatos são sequenciados e seus polimorfismos detectados e associados com a característica em questão. Se uma mutação é associada à variação na característica de interesse é possível a seleção direta. Um dos principais tipos de polimorfismos são os *SNPs* (single nucleotide polymorphisms) e

seus métodos de detecção mais comumente usados são análise por *SSCP* (single strand conformation polymorphism) e sequenciamento.

Hastings et al. (2006) estudaram três *SNPs* no éxon 11 no gene do *LHR* (receptor do hormônio luteinizante) em bovinos da raça Holandesa e observaram a correlação deles com intervalo de partos, número de dias para o primeiro serviço e um índice econômico de produção no Reino Unido.

Islam et al. (2009) estudaram a associação de um *SNP* na região promotora do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (*IGF1*) com a deposição de gordura e características da carcaça de animais da raça Angus e Charolês. Os autores encontraram associações significativas do SNP para espessura de gordura e rendimento de carne magra na carcaça na raça Angus. Análises de ligação dos fatores de transcrição nos sítios revelaram que a adição de um alelo 'C' introduzia um sítio de ligação do fator nuclear I, que tem uma regulamentação específica no tecido adiposo e, portanto, este *SNP* poderia contribuir para o efeito na deposição de gordura na população de bovinos Angus.

Veneroni (2010) identificou *SNPs* associados à deposição de gordura em animais da raça Canchim criados a pasto. Os genes estudados foram o fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1 (*DDEF1*) e proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina 3 (*IGFBP3*), verificando também à associação de SNPs presentes nos cromossomos 4, 6, 10 e 14 com espessura de gordura em animais Canchim. *SNPs* localizados no éxon 31 do gene *DDEF1* causaram mudança de aminoácidos na proteína. SNPs localizados nos éxons 4, 5 e 7 resultaram em alteração de aminoácido na proteína *IGBP3*, sendo que os aminoácidos alterados possuem propriedades químicas distintas, o que pode indicar alteração funcional do produto gênico.

As características de interesse econômico são geralmente quantitativas que possuem herança poligênica (BOURDON, 1997). Com isso, outra maneira de analisar as características quantitativas é a partir de estudos de mapeamento de *QTLs* (*Quantitative Trait Loci*) (PAREEK et al., 2011). Para a identificação das bases genéticas das características quantitativas, a quantificação do desequilíbrio de ligação (*LD - Linkage disequilibrium*) ao longo do genoma é um fator

importante (McKAY et al., 2007). O *LD* é observado quando determinadas combinações de alelos de diferentes *loci* em um cromossomo ocorrem com maior frequência do que aquelas esperadas em uma situação ao acaso (GODDARD et al., 2009). Com isso, para que se possa identificar variações no genoma relacionadas a fenótipos de caracteres quantitativos, aplicam-se metodologias baseadas em marcadores genéticos que devem estar fortemente ligados às mutações causais, ou seja, em *LD* (KHATKAR et al., 2006).

Esse tipo de análise tornou-se mais eficaz devido ao desenvolvimento de painéis de alta densidade de *SNPs* e dos métodos de análise em larga escala (ANDERSSON, 2009), sendo que, para garantir maior existência de *LD* em toda a população, os marcadores devem estar suficientemente próximos às mutações causais (DEKKERS, 2004). FORTES et al. (2011) relataram que para um *SNP* ser considerado perto, sua distância deve ser de até 2,5Kb tanto na direção 5' como na 3'. Por conta dessa proximidade, a taxa de recombinação é consideravelmente pequena, desse modo, os alelos de um marcador associado a um *QTL* são transmitidos juntos (FAY & WU, 2000).

Ao estudo que utiliza os painéis de alta densidade dá-se o nome de estudos de associação ampla do genoma (*Genome Wide Association Studies – GWAS*) já que milhares de marcadores espalhados pelo genoma são testados ao mesmo tempo. Tais estudos são de grande importância principalmente na medicina, para identificação de genes relacionados a doenças genéticas e na agropecuária para a identificação de regiões que contenham genes relacionados à expressão de fenótipos desejáveis em plantas e animais domésticos.

Dessa forma, para o melhoramento animal a *GWAS* teria importância principalmente na identificação de *QTLs* e seria o primeiro passo para se determinar a assinatura genômica de uma característica (KHATKAR et al., 2006) em uma determinada raça e ambiente. Esses dados poderiam ser então aplicados à seleção genômica que seria a formação de valores genéticos genômicos dos animais para a seleção de reprodutores e/ou no auxílio da seleção precoce ou descarte de animais que expressariam fenótipos indesejáveis.

Segundo Sahana et al. (2010), o estudo realizado com GWA apresentou evidências fortes e altamente consistente para associação de *SNPs* com características de fertilidade em bovinos da raça Holandesa nos Estados Unidos da América e Canadá. Mapeou-se *QTLs* em regiões estreitas, alguns deles com menos de 1 Mb de largura, e estes resultados podem ser utilizados para a identificação de genes candidatos causal por enriquecimento para *SNPs* nos intervalos identificados. A partir deste estudo será possível determinar o mérito genético de animais individuais através da combinação de efeitos estimados para o *SNPs*.

Embora o desenvolvimento dos painéis de SNPs de alta densidade tenha gerado grandes expectativas quanto à possibilidade de detecção de QTLs, e determinação de genes com efeito maior sobre características importantes em diversas espécies, os resultados encontrados até o presente são considerados frustrantes. Especialmente em humanos, em que foram extensivamente utilizados na tentativa de localização de genes causadores de doenças com possível componente genético, a maioria dos trabalhos não conseguiu detectar genes de efeito maior sobre estas características. Estas dificuldades são em parte atribuídas aos métodos estatísticos aplicados, uma vez que a grande quantidade de testes estatísticos envolvidos reduz consideravelmente o poder do teste, levando a grandes dificuldades na determinação de SNPs associados às características de interesse, quando elas são afetadas por um grande número de genes (CAMPOS et al., 2010). Porém estes mesmos autores verificaram que predição do valor genético genômico por meio de marcadores, utilizada com frequência em estudos envolvendo animais, é mais apropriada para lidar com este tipo de característica.

2.4. Genes candidatos

No caso do presente estudo, foram considerados como candidatos alguns genes responsáveis pela produção, e secreção ou que influenciam de algum modo o metabolismo de lipídios e no tecido adiposo, uma vez, como visto anteriormente, estes podem ter alguma influência na precocidade sexual.

O tecido adiposo é também considerado um órgão central do controle metabólico, com isso, o tecido sofre a atuação de uma imensa lista de hormônios que causam efeitos diversos, não só sobre o seu metabolismo como sobre a função endócrina e regulação da adipogênese. Foram identificados muitos receptores hormonais nos adipócitos e alguns destes foram utilizados como genes candidatos (Tabela 1) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Tabela 1. Receptores hormonais identificados em adipócitos

Receptor Hormonal	**Principais efeitos biológicos**
Adenosina (gene *ADA)*	Influencia negativamente na lipólise e auxilia na captação de glicose
Angiostensina II (gene *AGTRAP*)	Influencia positivamente a lipólise e induz a resistência à insulina
Apolipoproteina E (gene *Apo-E*)	É um componente proteico das lipoprotenínas e não possui ação hormonal
Colcistocinina (gene *CCK*)	É um dos responsáveis pela expressão da leptina
Fator de crescimento epidermal (gene *EGF*)	É um dos responsáveis pelo regulamento da diferenciação de adipócitos
Gastrina (gene *GAST*)	É um dos responsáveis pela expressão da leptina
Glucagon (gene*GCG*)	Age positivamente na lipólise
Peptídeo gastro-indicador (gene *GIP*)	Atua positivamente na síntese de ácidos graxos livres e da triacilglicerol
Interleucina 6 (gene *IL 6*)	Atua positivamente na lipólise e negativamente na lipase de sipoproteínas
Peptídeo natrirético atrial (gene *NPPA*)	Modula o metabolismo de glicose

A proteína codificada pelo gene *ACADL* pertence à família desidrogenase acil-CoA. Esta proteína é uma das quatro enzimas que catalisam o primeiro passo de beta-oxidação mitocondrial da cadeia linear de ácidos graxos (LUTHER et al., 2012).

Taniguchi et al. (2008 a) observaram que a maior expressão do gene *ACADL* não influenciou a espessura de gordura, porém esse gene pode interferir uma proporção mais elevada no consumo de energia em animais cruzados Charolês X Red Angus.

O gene *ACOX1* codifica uma enzima da via do ácido graxo da beta-oxidação, que catalisa a dessaturação de acil-CoA a 2-trans-enoil-CoA. A ausência dessa enzima causa um acúmulo de ácidos graxos no organismo (VARANASI et al., 1994). Este e mais 5 genes, *ACRP30, GK, PPAR-α, PCK1*, e *RXRB,* estão envolvidos na via de sinalização de *PPAR*, adipocitocinas, insulina, e também no metabolismo de ácidos graxos e glicerolipideo (TANIGUCHI et al., 2008b). Estes mesmos autores encontraram genes que são diferencialmente expressos e detectados na diferenciação de pré-adipócitos, sendo eles : *PPARα, PCK1, ACOX1, ACOX2,GK, PRKACA, MAPK3, BRAF, PPP3CA, RAC2, GRB2, MYC, RXRB* e *TP53*.

A adiponectina, ao contrário da demais adipocinas, age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade insulínica. O *ADIPOQ* tem como efeitos biológicos o aumento à sensibilidade à insulina e possui efeito anti-inflamatório.O gene *ADIPOQ* também é responsável por uma proteína expressa exclusivamente em adipócitos diferenciados (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Em suínos, estudo mostra que o gene *ADIPOQ* foi associado negativamente com a adiposidade e a lipogênese (JACOBI et al., 2004). Em ratos este gene está relacionado com a obesidade (FRUEBIS et al., 2001). Em bovinos cruzados o gene *ADIPOQ* está negativamente associado com a gordura subcutânea (TANIGUCHI et al., 2008a).

O β_3 -receptor adrenérgico, codificado pelo gene *ADRB3*, é um subtipo de receptor adrenérgicos, sendo expresso abundantemente pela superfície de adipócitos e fazem parte da regulação do balanço de energia (HU et al., 2010). Em humanos este gene está relacionado com o início prematuro de diabetes mellitus (WALSTONS et al., 1995). Hu et al. (2010) encontraram em bovinos seis variações alélicas, 4 *SNPs* e três deleções/inserções. Esses polimorfismos podem ter impacto sobre a função e nível de expressão de β_3 -receptor adrenérgico bovino.

O gene *AGT* codifica o angiostensinogênio, que é o precursor da angiostensina II, estando envolvido na regulação da pressão arterial (FONSECA-ALANIZ et al., 2006), sendo secretado principalmente pelos adipócitos viscerais (WAJCHENBERG, 2000) mas também é secretado pelo tecido adiposo branco (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O responsável pela expressão da apelina é o gene *APLN*. A apelina ainda não possui ação biológica muita clara, mas está relacionada ao controle dos estoques energéticos corporais (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Outra função a qual deve estar relacionada é com a regulação da ingestão alimentar (BOUCHER et al., 2005 citado por FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O gene *BRAF* é também conhecido como v-raf murino sarcoma B1 homólogo viral oncogene e está envolvido com a divisão celular (WAN et al., 2004). Tanaguchi et al. (2008 b) detectaram ação deste gene na diferenciação de preadipócitos em bovinos.

A diferenciação de adipócitos é um processo complexo que envolve uma cascata de expressão e fatores de transcrição e muitos genes específicos do adipócito. Evidências sugerem que duas famílias de fatores de transcrição, CCAAT / potencializador de proteínas de ligação e proliferador de peroxissomo receptores ativados (*PPARs*) são importantes reguladores da expressão do gene de adipócitos e diferenciação. O gene *C / EBP* também regula a expressão dos genes específicos do tecido adiposo necessários para a adipogênese (LIN & LANE, 1992, citado por YAMADA et al., 2009)

Yamada et al. (2009) analisaram três grupos de animais, da raça Wagyu, com diferentes tipos de alimentação, observando diferenças no tamanho dos

adipócitos no tecido adiposo intramuscular. Com isso mostraram que certos tipos de dieta interferem no depósito do tecido adiposo e no padrão de expressão do gene *C/BEP*.

A adipsina, expressa pelo gene *CFD*, é secretada pelo tecido adiposo branco, esta proteína é responsável por ativar a via alternativa de complemento do mesmo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O gene *DGAT1* contribui para o controle genético para a espessura da gordura subcutânea e catalisa a formação de triglicerídeos de diacilglicerol e acil-CoA (WU et al., 2005).

Wu et al. (2005) analisaram genes candidatos que afetassem a espessura de gordura subcutânea, os genes estudados e seus polimorfimos estão na Tabela 2, o *DGAT1* foi o que obteve o maior efeito aditivo.

Tabela 2. Gene e mutação para os genes candidatos (WU et al., 2005)

Gene	**Mutação**
Tireoglobulina (gene *TG*)	C/T
Leptina (gene *LEP*)	C/T (exon 2)
Diacilglicerol aciltransferase 1-O *(gene DGAT1)*	C/A
Hormônio do crescimento (gene *GH1*)	MspI (intron 3)
Proteínas de ligação de ácidos graxos 3 (gene *FABP3)*	A/G

Tanaguchi et al. (2008 b) induziram a adipogênese "*in vitro*" para definir os padrões de expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação. Os resultados mostram que os genes *FASN, FABPs e DGAT1* apresentaram semelhanças nos padrões de expressão da regulação. Tanaguchi et al. (2008 a) observaram que o *DGAT1* tem correlação positiva com espessura de gordura em Charolês × Red Angus.

O *DLK1* codifica uma proteína transmembranar , que em sua forma solúvel é clivado pela *ADAM17*, ativando assim a inibição da adipogênese (WANG & SUL, 2009). Pickworth et al (2010) encontraram maior concentração da proteína transmembranar *DLK1* na gordura intramuscular do que no tecido adiposo subcutâneo. Assim, o depósito de da gordura intramuscular pode conter uma

maior proporção de pré-adipócitos e maiores taxas de hiperplasia do que o tecido adiposo subcutâneo.

A proteína de ligação de ácido graxo (*FABP*) é uma família de proteínas que facilitam o transporte desses entre membranas celulares (WEISIIGER, 2002). Tanaguchi et al. (2008 a) observaram que a expressão do *FABP3* tem uma correlação positiva com a espessura de gordura tanto em animais Hereford x Aberdeen Angus como em Charolês x Red Angus.

O ácido palmitoléico (C16:1), também chamado de lipocina, é um ácido graxo monoinsaturado produzido no tecido adiposo e age sobre o tecido muscular recuperando a sensibilidade à insulina na obesidade (QUEIROZ et al., 2009). Hoashi et al. (2008) encontraram que o gene *FABP4* estava associado significativamente com a lipocina.

A enzima responsável pela síntese de ácido graxos é codificada pelo gene *FASN* (PICKWORTH et al., 2010). Este gene também é responsável pelo armazenamento de gordura e o metabolismo dentro de adipócitos funcionais (URS et al., 2004). Por esse gene ser responsável pelo armazenamento de gordura, Pickworth et al. (2010) formularam a hipótese de que animais que se alimentassem com mais concentrado teriam uma expressão maior desse gene, porém não houve diferença entre os tipos de tratamentos e a concentração de *FASN.*

Alguns testes comerciais para genes com efeito determinado sobre algumas características que envolvem o metabolismo de lipídeos estão disponíveis para serem utilizados por produtores (Tabela 3) (FURLAN et al., 2007).

Tabela 3. Testes comerciais para a genotipagem de marcadores moleculares em bovinos (modificado de HOCQUETTE *et al*., 2007 citado por FURLAN et al., 2007).

Gene	Característica
Tireoglobulina (gene *TG*)	Marmoreio
Diacilglicerol aciltransferase 1-O *(gene DGAT1)*	Produção de Gordura
Hormônio do crescimento *(gene GH1)*	Marmoreio
Leptina (gene *LEP*)	Marmoreio/Gordura
Desaturase estearoil-CoA (gene *SCD*)	Relação de ácidos graxos

O gene *HGF* expressa o fator de crescimento hepático, que é produzido e secretado pelo tecido adiposo branco e estimula a diferenciação e desenvolvimento de adipócitos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Já o gene *IGF-I* é responsável por codificar o O fator de crescimento semelhante à insulina I é produzido e secretado pelo tecido adiposo branco e estimula a proliferação e diferenciação dos adipócitos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo (Zhang et al,. 1994) e atua sobre o sistema nervoso central sinalizando a saciedade (EHRHARDT et al., 2000 citado por BELTRAN, 2007). Como comentado no tópico anterior, muitos autores demonstraram a sua influência na precocidade sexual (MOORE et al., 2003; WU et al., 2005; SALMAN & COSTA 2006; LEW, 2006; BELTRAN, 2007; VAICIUNAS, 2007; FURLAN et al., 2007; FERNYHOUGH et al., 2007;).

Uma enzima estimuladora da hidrólise de triaglicerol de lipoproteínas é produzida e secretada pelo tecido adiposo branco e é codificada pelo gene *LLP* (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Em suínos, a lipoproteína lipase, expressa pelo gene *LPL,* pode ser inibida pela ação do *TNFα*, consequentemente, isso pode acarretar na diminuição da expressão de *PPARγ* nos adipócitos (FERNYHOUGH et al., 2007).

O gene codificante da mitogénio-cinase - proteína ativada 1 é o *MAPK1,* esta proteína é capaz de medir a fosforilação do fator de transcrição dominante do

receptor adipogênico ativado por *PPAR* e reduzir a sua atividade transcripcional (JIN et al., 2010)

O fator inibidor de glicosilação é produzido e secretado pelo tecido adiposo branco e é um imuno-regulador com atuação parácrina no tecido adiposo branco, sendo o gene codificante o *MIF* (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Em humanos obesos, não houve a alteração na expressão do *MIF* envolvido na infiltração de macrófagos (TAM et al., 2012).

A visfatina é produzida e secretada pelo tecido adiposo branco e é um insulinomimético produzido predominantemente pela gordura visceral, sendo o gene responsável pela sua expressão o *NAMPT* (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Tanaguchi et al. (2008a) encontraram alguns genes que afetam a expessura de gordura, investigou-os e estudou as vias envolvidas, dentre eles estão: *ADIPOQ, PLIN2, ACADL, FABP3 e SSP1*. Os genes *FABP3, PLIN2 e SSP1* tiveram uma correlação positiva com a espessura de gordura em Charolês x Red Angus; e os genes *ADIPOQ e ACADL* tiveram correlação negativa com a mesma característica nos mesmos animais.

Variações genéticas dentro do gene *RARRES2* codificante de quimerina, está associada com a aumento de gordura visceral em indivíduos não obesos, porém esse efeito genético pode ser mascarado pela associação íntima com o corpo obeso como um todo e a massa de gordura visceral (MUSSIG et al., 2009).

O gene *RETN* é responsável pela expressão da resistina, esta é produzida e secretada pelo tecido adiposo branco, é responsável pelo aumento da resistência à insulina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Ela também é capaz de exercer processos pró-inflamatórios no tecido adiposo (NAGAEV et al., 2006 citado por MAILLARD et al., 2011).

Recentemente, alguns dados sugerem que a resistina poderia afetar a fertilidade masculina e feminina (MAILLARD et al., 2011). MAILLARD et al. (2011) encontraram evidências de que a resistina estava presente em várias estruturas de ovário de bovinos e de ratos, desse modo, ela poderia ser utilizada como um sinal metabólico envolvido nas funções reprodutoras.

Os genes *SCD* e *FASN* codificam enzimas que desempenham papéis importantes na determinação do perfil de ácidos graxos em ruminantes (KIM & NTAMBI, 1999). Li et al. (2012) demonstrara, que o papel do *SCD* na dessaturação de ácido graxos pode ser modificada na presença de diferentes genótipos de *FASN* e vice-versa.

O gene *SERPINE 1* é responsável por codificar a serpina inibidora de peptidase que é produzida e secretada pelo tecido adiposo branco e inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Animais, Charolês X Red Angus, com alta espessura de gordura possuem uma expressão mais alta de *SERPINE1* (JIN et al., 2012).

O fator de necrose tumoral , codificado pelo gene *TNF,* é produzido e liberado pelo tecido adiposo branco, é um agente lipolítico e aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). O TNF-α é uma citocina que age diretamente no adipócito regulando o acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes da insulina (SETHI et al., 1999). Kim et al. (2011) encontraram uma correlação negativa deste gene com o teor de gordura intramuscular em Hanwoo (gado coreano).

O desacoplamento de proteína, expressa pelo gene *UCP*, e a via mitocondrial transferência de prótons, parece ser única para o tecido adiposo castanho (RICQUIER et al., 1991 citado por BRANDER et al., 1993). Brander et al. (1993) concluiram, que o gene *27-mer oligonucleótido* correspondente à uma região altamente conservada do éxon do gene que codifica *UCP*, com isso, essa região, pode ser usado para detectar o mRNA para a *UCP* em muito diferentes espécies.

Zhang et al. (2001) estudaram o papel do *UCP2* na regulação da secreção de insulina em ratos, e observaram que este gene pode ser utilizado na detecção da glicose em células β, e é um elo crítico entre a obesidade e a disfunção das células β e o diabetes tipo 2.

3.Objetivo

O presente estudo teve como objetivos detectar associações entre polimorfismo detectados nos genes relacionados com o tecido adiposo e a precocidade sexual em bovinos da raça Nelore, visando sua utilização em programas de melhoramento da raça Nelore.

4. Referências Bibliográficas

ALENCAR, M.M.; COSTA, J.L.; CORREA, L.A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças canchim e nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 753-758, 1987.

ANDERSSON, L. Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. **Genetica**, v.136, p.341-349, 2009.

BELTRAN, M.P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmático sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*).** 2007. Dissertação (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2007.

BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários criadores diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho de cria. no Rio Grande de Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30:1278-1288. 2001.

BIANCHINI, E.; McMANUS, C.; LUCCI, C. M.; FERNANDES, M. C. B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A. S.; EGITO; A. A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p. 1443-1448, 2006.

BOLIGON, A.A.; ALBUQUERQUE, L.G.; MERCADANTE, M.E.Z.; LÔBO, R.B. Study of relations among age at first calving, average weight gains and weights from weaning to maturity in Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p.746-751, 2010a.

BOLIGON, A.A.; SILVA, J.A.V.; SESANA, R.C.; SESANA, J.C.; JUNQUEIRA, J.B.; ALBUQUERQUE, L.G. Estimation of genetic parameters for body weights, scrotal circumference, and testicular volume measured at different ages in Nellore cattle. **Journal of Animal Science,** v.88, p.1215-1219, 2010b.

BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic parameters and relationships of heifer pregnancy and age at first calving with weight gain, yearling and mature weight in Nelore cattle. **Livestock Science,** v.141, p.12–16, 2011.

BOURDON, R.M. **Understanding animal breeding**. Prendice-Hall do Brasil, Ltda., Rio de Janeiro, p. 71-76, 1997.

BRANDER, F.; KEITH, J. S.; TRAYHURN, P. A 27-mer oligonucleotide probe for the detection and measurement of the mRNA fo uncoupling protein in brown adipose tissue of different species. **Comparative Biochemistry and Physiology part B: Comparative Biochemistry**, v.104, p. 125-131, 1993.

BRUMATTI, R. C. FERRAZ, R. C., ELER, J. P. Desenvolvimento de índices de seleção em gado de corte sob enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**., v.60, p. 205-213, 2011.

CAMPOS, G.; GIANOLA, D.; ALLISON, D. B. Predicting genetics predisposition in humans: the promise of whole-genome markers. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p. 880-886, 2010.

CONEXÃO DELTA, G., 2009. Sumário de avaliação de reprodutores – Gensys Consultores Associados S/C LtdaAvailable at: http://www.gensys.com.br, 2010. Accessado em: Junho 05, 2012.

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

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G.. Efeito da idade de exposição de novilhas à reprodução sobre estimativas de herdabilidade da idade ao primeiro parto em bovinos Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.56, n. 3, p.370-373, 2004.

DODE, M.A.N. Aspectos fisiológicos da fecundação e estabelecimento da prenhez. In: SERENO, J. R. B.; LIMA, E.C.N.Z. (Eds). **Eficiência no manejo reprodutivo: sucesso no rebanho de cria**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 117-134, 2002.

ELER, J. P., et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nellore cattle. **J. Anim. Sci.,** vol. 82, p. 2519–2527, 2004.

ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; TEIXEIRA, L. D. Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte.** Piracicaba: FEALQ, 2010.

FAY, J.C.; WU, C. Hitchhiking under positive Darwinian selection. **Genetics**, v.155, p.1405-1413, 2000.

FERNYHOUGH, M. E.; OKINE, E.; HAUSMAN, G.; VIERCK, J. L.; DODSON, M. V. PPARγ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiaton into an adipocyte. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p. 367-378, 2007.

FERRAZ, J. B. S., ELER, J. P. Melhoramento genético para aumento de produtividade em gado de corte no Brasil: A história, o presente e o futuro. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte.** Piracicaba: FEALQ, 2010.

FONSECA-ALANIS, M.H.; TAKADA,J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinal. Metab.**, vol.50, n.2, p 216-229. 2006.

FORMIGONI, I.B.; FERRAZ, J.B.S.; RIBEIRO, S.; ELER, J.P.; PEDROSA, V.B.; MATTOS, E.C. Economic importance of stayability and heifer pregnancy in cow-calf production systems in Brazil: A bioeconomic simulation. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 8, Belo Horizonte, 2006.

FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; NAGARAJ, S. H., ZHANG, Y.; JONSSON, N. N.; BARRIS, W.; LEHNERT,S.; BOE-HANSEN, G. B.; HAWKEN, R.J. A single nucleotide polymorphism-derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1669-1683, 2011.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biology of Reproduction**, v.
60, p. 205 - 215, 1999.

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

FRIES, L.A. Avanços do uso dos recursos genéticos e biotécnicas reprodutivas com vistas ao melhoramento do gado de corte. **I SIMBOI**, Brasília-DF, 2005.

FRUEBIS, J.; TSAO, T. S.; JAVORSCHI, S.; EBBETS-REED, D.; ERICKSON, M. R. S.; YEN, F. T.; BIHAIN, B. E.; LODISH, H. F. Proteolytic cleavage product of 30kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proceedings of the Natacional Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 2005-2010, 2001.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p. 331-341, 2007.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H. NIZIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science,** v.80, p.2158-2167, 2002.

GRESSLER, S.L.; BERGMANN, J.A.G.; PEREIRA,C. S. Estudos das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas Nelore **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 29, n.2, p. 427-437, 2000.

GODDARD, M.E.; WRAY, N.R.; VERBYLA, K.; VISSCHER, P.M. Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data. **Statistical Science**, v.24, n.4, p. 517-529, 2009.

HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; et al Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, vol. 37, p. 583–585, 2006.

HOASHI, S.; HINENOYA, T.; TANAKA, A.; OHSAKI, H.; SASAZAKI, S.; TANIGUCHI, M.; OYAMA, K.; MUKAI, F.; MANNEN, H. Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXRα in Japanese Black cattle. **BMC Genetics**, 2008.

HU, J.; ZHOU, H.; SMYTH, A.; LUO, Y.; HICKFORD, J. G. H. Polymorphism of the bovine ADRB3 gene. **Molecular Biology Reports**, v.37, p. 3389-3392, 2010.

ISLAM, K.K.; VINSKY, M.; CREWS, R.E.; OKINE, E.; MOORE, S.S.; CREWS JR, D.H.; LI, C. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. **Animal Genetics**, vol. 40, n.5, pag. 766-769. 2009.

JACOBI, S. K.; AJUWON, K. M.; WEBER, T. E.; KUSKE, J.L.; DYER, C. J.; SPURLOCK, M. E. Clonind and expression of porcine adiponectin and its relationship to adiposity lipogeneses and the acute phase response. **Journal of Endocrinology**, p. 133-144, 2004.

JIN, W.; DODSON, M. V. MOORE, S. S. BASARAB; J. A.; GUAN, L. L. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissue: a potencial regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. **BMC Molecular Biology**, 2010.

JIN, W.; OLSON, E. N.; MOORE, S. S.; BASARAB, J. A.; BASU, U; GUAN, L. L. Transcriptome analysis of subcutaneous adipose tissues in beef cattle using 3' digital gene expression-tag profiling. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 171-183, 2012.

KEISLER, D.H.; LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **Journal of Animal Science**, v.74, p. 1-17. Supplemento 3. 1996.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J.S. Adipose Tissue as a Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 89, n. 6, p. 2548-2556. 2004.

KHATKAR, M.S.; COLLINS, A.; CAVANAGH, J.A.L.; HAWKEN, R.J.; HOBBS, M.; ZENGER, K.R.; BARRIS, W.; McCLINTOCK, A.E.; THOMSON, P.C.; NICHOLAS, F.W.; RAADSMA, H.W. A first-generation metric linkage disequilibrium map of bovine chromosome 6. **Genetics**, v.174, p.79-85, 2006.

KIM, Y.C.; NTAMBI, J. M. Regulation of *stearoyl-CoA desaturase* genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.266, p. 1-4, 1999.

KIM, N.; LIM, D.; LEE, S.; CHO, Y.; PARK, E. LEE, C.; SHIN, B.; KIM, T.; YOON, D. Heat shock protein B1 and its regulator genes are negatively correlated with intramuscular fat content in the longissimus thoracis muscle of Hanwoo (korean cattle) steers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p. 5657-5664, 2011.

LEW, B. J. Desenvolvimento mamário em novilhas leiteiras: aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no processo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.36-41, 2006.

LI, N.; ALDAI, N.; VINSKY, M.; DUGAN, M. E. R.; McALLISTER, T. A. Associaton analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine *stearoyl-CoA desaturase* and *fatty acid synthase* genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. **Animal Genetics**, v. 43, p. 93-97, 2012.

LÔBO, R.B.; BEZERRA L.A.F.; VOZZI, P.A.; MAGNABOSCO, C.U.; ALBUQUERQUE, L.G.; SAINZ, R.D.; BERGMANN J.A.G.; FARIA C.U.; OLIVEIRA, H.N. 2009. **Sumário de Touros das Raças Nelore Guzerá Brahman e Tabapuã**. 15 anos ANCP. Sumário 2011.

LUTHER, R. J.; ALMODOVAR, A. J.; FULLERTON, R.; WOOD, P. A. Acadl - SNP based genotyping assay for long-chain acyl-CoA dehydronase deficient mice. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, p. 62-67, 2012.

MAILLARD, V.; FROMENT, P.; RAMÉ, C.; SVETLANA, U.; ELIS, S.; DUPONT, J. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell steroidogenesis and proliferation. **Reproduction**, v. 141, p. 467-479, 2011.

MARTIN, L.C.; BRINKS, J.S.; BOURDON, R.M. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science.**, 70:4006-4017. 1992.

McKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; MURDOCH, B.M.; MATUKUMALLI, L.K.; AERTS, J.; COPPIETERS, W.; CREWS, D.; DIAS NETO, E.; GILL, C.A.; GAO, C.; MANNEN, H.; STOTHARD, P.; WANG, Z.; VAN TASSEL, C.P.; WILLIAMS, J.L.; TAYLOR, J.F.; MOORE, S.S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. **BMC Genetics**, v.8, n.74, doi:10.1186/1471-2156-8-74, 2007.

MICKE, G.C.; SULLIVAN, T.M.; GATFORD, K.L.; OWENS, J.A.; PERRY, V.E.A. Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. **Anim. Repr. Sci.,** vol 121, pag. 208–217. 2010.

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

MUSSIG, K.; STAIGER, H.; MACHICAO, F.; THAMER, C.; MACHANN, J.; SCHICK, F.; CLAUSSEN, C. D.; STEFAN, N.; FRITSCHE, A.; HARING, H.U. *RARRES2*, encoding the novel adipokine chemerin, is a genetic determinat os disproportionate regional body fat distribution: a comparatie magnetic resonance imaging study. **Metabolism**, v.58, p. 519-524, 2009.

OLIVEIRA, C. M. G.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, M. L.; KUNZ, T.L.; VIU, M. A. Índice de gestação em novilhas nelore que atingiram a puberdade em idade precoce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p. 237-239, 2003.

PAREEK, C.S.; SMOCZYNSKI, R.; PIERZCHALA, M.; CZAMIK, U.; TRETYN, A. From genotype to phenotype in bovine functional genomics. **Briefings in Functional Genomics**, v.10, n.3, p.165-171, 2011.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, vol. 29, n.6, p. 1676-1683, 2000.

PEROTTO, D.; MIYAGI, A.P.; SOUZA, J.C.; MOLETTA, J.L.; FREITAS, J.A. Estudos de características reprodutivas de animais da raça Canchim, criados a pasto, no Estado do Paraná, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.2, p.1-6, 2006 a.

PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; KROETZ, I.A. Intervalo de partos de fêmeas bovinas Nelore, Guzer x Nelore, Red Angus x Nelore, Marchigiana x Nelore e Simental x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1-7, 2006 b.

PHOCAS, F.; BLOCH, C.; CHAPELLE, P. Developing a breeding objective for a French purebred beef cattle selection programme. **Livestock Production Science.**, vol. 57, p. 49-65, 1998.

PICKWORTH, C.L.; LOERCH, S.C.; VELLEMAN, S.G.; PATE, J.L.; POOLE, D.H.; FLUHARTY, F.L. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. **Journal of Animal Science**, v. 89 , p.355-366 , 2010.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582-94, 2009.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L.L. (Eds.) **Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal**. 1ª. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.

SALMAN, A.K.D.; COSTA, R.B. **Ação hormonal da leptina em ruminantes**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.

SANTOS, J.E.P.; FILHO, M.F.S. **Nutrição e reprodução em bovinos**. 2° Simpósio Interncional de Reprodução Animal Aplicada. 2008.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; BENDIXEN,C.; LUND, M.S. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Animal Genetics**, v. 41, p 579-588, 2010.

SCHILLO, K.K.; HALL, J.B.; HILEMAN, M. Effects of nutrion and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3994-4005, 1992.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. .S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.10, p. 19-29, 1999.

SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A. Relationships among Weight Gains, Age at Puberty and Reproductive Performance in Heifers. **Journal of Animal Science**, v. 32, p. 127-131, 1971.

SHIOTSUKI, L.; SILVA, J. A. II V; TONHATI, H. et al Genetic associations of sexual precocity with growth traits and visual scores of conformation, finishing, and muscling in Nelore cattle. **Journal of Animal Science,** v.87, p.1591-1597, 2009.

SIITERI, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. **The American Journal of Clinical Nutricion**, v.45, p. 277-282, 1987.

SILVA, J. A. II V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** vol. 34, n.5, p.1568-1572. 2005.

TAM, C. S.; COVINGTON, J. D.; RAVUSSIN, E.; REDMAN, L. M. Little evidence of systemic and adipose tissue inflammantion in overweight individuals. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 58, 2012.

TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; BASARAB, J. A.; DODSON, M. V., MOORE, S. S. Comparative analysis on gene expression profiles in cattle subcutaneous fat tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part D 3, p. 251-256, 2008 a.

TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; ZHANG, B.; DODSON, M. V; OKINE, E.; MOORE, S. S. Gene expression patterns of bovine perimuscular preadipocytes during adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, p. 246-351, 2008 b.

THOMPSON, F. N. Reprodução em mamíferos do sexo feminino. In: REECE, W. O. (Ed.). **Dukes - Fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.39, p. 644-699. 2006.

URS, S.; SMITH, C.; CAMPBELL, B.; SAXTON, A.; TAYLOR, J.; ZHANG, B. SNOODY, J.; VOY, B.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Gene expression profiling in human preadipocyes and adipocytes by microarray analysis. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 762-770, 2004.

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoce e não precoces.** Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinãria e Zootecnia – Universidade de São Paulo. Pirassununga- SP. 2007

VARANASI, U.; CHU, R.; CHU, S.; ESPINOSA, R.; LEBEAU, M. M.; REDDY, J. K. Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA axidase gene : organization, promoter analysis, and chromosomal localization. **Proceedings of the Natacional Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91 (8), p. 3107-3111, 1994.

VENERONI, G.B. **Associação de SNPS em genes candidatos e de regiões cromossômicas com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim.** Dissertação (doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e de Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2010.

VOZZI, P.A. **Análise genético-quantitativa de características de precocidade sexual na raça Nelore.** 2008. Dissertação (doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2008.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, 21: 697–738, 2000.

WALSTON, J.; SILVER, K.; BOGARDUS, C.; KNOWLER, W. C.; CELI, F. S.; AUSTIN, S.; MANNING, B.; STROSBERG, D.; STERN, M. S.; RABEN, N.; SORKIN, J. D.; ROTH, J.; SHUDINER, A. R. Times of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β³-Andrenergic- Receptor gene. **The New England Journal of Medicine**, p. 343-347, 1995.

WAN, P. T. C.; GRANETT, M. J.; ROE S. M.; LEE, S.; NICULESCU-DUVAZ, D.; GOOD, V. M.; JONES, C. M.; MARSHALL, C. J.; SPREINGER, C. J.; BARFORD, D.; MARAIS, R. Mechanism of activation of the raf-erk signaling pathway by oncogenic mutations of b-raf. **Cell**, v. 116, p. 855-867, 2004.

WANG, Y.; SUL, H. S. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation throught Sox9. **Cell Metabolism**, v.9, p. 287-302, 2009.

WEISIGER, R. A. Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two steps in intracellular transport of their ligands. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 239, p. 35-43, 2002.

WU, X.; McNEIL, M. D.; DE, S.; XIAO-JUN,Q. MICHAL, J. J.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; WRIGHT, R. W. JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects fo beef backfat via baysian model selection. **Genetica**, v. 125, p. 103-113 2005.

YAMADA, T.; KAWAKAMI, S. I.; NAKANISHI, N. Effects of dietary roughage levels on the expression of adipogenic transcription factor in Wagyu steers. **Meat Science**, v.83, p. 775-781, 2009.

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

ZHANG, C.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUS, S.; PERONI, O.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A. J.; BOSS, O.; KIM, Y.; ZHENG, X. X.; WHEELER, M. B.; SHULMAN, G. I.; CHAN C. B.; LOWELL, B. B. Uncloupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction and type 2 diabetes. **Cell**, v.105, p. 745-755, 2001.

Capítulo 2: Estudo de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos como candidatos à precocidade sexual em bovinos da raça Nelore

Resumo: O presente estudo foi desenvolvido a fim de detectar associações entre polimorfismos conhecidos nos genes relacionados com o tecido adiposo e a precocidade sexual em bovinos da raça Nelore. Foram analisadas 1.085 novilhas precoces e não precoces provenientes de fazendas participantes do programa de melhoramento genética da Conexão Delta G. Foram utilizados *SNPs* do painel de 777.000 *SNPs* do *High Density Bovine SNP BeadChip*, localizados dentro da região dos genes candidatos e com uma distância de até 5 Kb, pois sabe-se que com essa distância há desequilíbrio de ligação (LD). Apenas 445 novilhas, precoces e não precoces, foram genotipadas, nas outras 640 foi utilizado o número médio de cópias de cada alelo na população genotipada. Para a análise estatística foram utilizados modelos lineares. Os programas fastPHASE e GenomeStudio foram utilizados para a reconstrução dos haplótipos e análise do LD a partir da estatística r^2. Foram analisados 54 genes candidatos e um total de 443 *SNPs*, dentre esses 370 eram formadores de 83 haplótipos e o restante dos *SNPs* foram estudados isoladamente. As análises estatísticas revelaram que apenas dois haplótipos formados por dois e quatro *SNPs* localizados no gene *FABP4* e *PPP3CA* e um *SNP* isolado no gene *PPP3CA*, tiveram efeito significativo ao nível de $p<0,05$ para a precocidade sexual. Com isso, pode-se concluir que os genes *FABP4* e *PPP3CA* influenciam a precocidade sexual e, podem desse modo serem considerados em programas de seleção que visem melhorias na precocidade sexual de animais da raça Nelore.

Palavras-chave: *SNPs*, Genotipagem, *FABP4, PPP3CA*

Investigation of genes related to lipid metabolism as candidate for sexual precocity in Nellore cattle

Abstract: The aim of this study was to evaluate possible associations between known polymorphisms in genes related to adipose tissue and sexual precocity in Nellore cattle. 1,085 precocious and non-precocious heifers belonging to Delta G Connection (Conexão Delta G) breeding program were analyzed. A subset of SNPs from the panel of High Density Bovine SNP BeadChip of 777,000 SNPs was evaluated. This subset of SNPs is located within a region of candidate genes with a distance up to 5 Kb, since it is considered that in this distance there is linkage disequilibrium (LD). Only 445 precocious and non-precocious heifers were genotyped, for the remained 640, the average number of copies of each allele from the genotyped population, was used. The statistical evaluation was made by linear models. To analyze the reconstruction of haplotypes and LD presence, the fastPHASE and GenomeStudio softwares were used, using r^2 procedure. In total, 54 candidate genes and 443 SNPs were analyzed. Among these SNPs, 370 formed 83 haplotypes while the remained SNPs were studied separately. The statistical analyses revealed that only two sets of haplotypes, formed by two and four SNPs located on FABP4 and PPP3CA, and one isolated SNP on PPP3CA gene, had significant effect ($p<0.05$) for the sexual precocity trait. These results indicate that FABP4 and PPP3CA genes have an influence on sexual precocity of the animals and should be considered in selection breeding programs in Nellore cattle to evaluate this trait.

Keywords: SNPs, genotyping, *FABP4, PPP3CA*

1. Introdução

O bovino Nelore foi introduzido no Brasil em 1875 (SANTOS, 1998) desde então o rebanho proliferou principalmente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país (CEZAR et al, 2005). Hoje o país possui o maior rebanho comercial de bovinos com mais de 185 milhões de cabeças e é o país que mais abate no mundo (ANUALPEC, 2012). Cerca de 80% do rebanho é constituído por raças zebuínas que são animais mais adaptados ao ambiente tropical, em função principalmente da tolerância ao calor, resistência a parasitas e alta velocidade em ganho de peso (SANTOS, 1998; LENSTRA & BRADLEY, 1999). Dentre as raças zebuínas, podemos destacar o Nelore, com 90% desta parcela (ABIEC, 2012). Porém, um dos problemas da pecuária de corte brasileira refere-se a baixa precocidade sexual do rebanho. A produção do gado de corte depende do seu desempenho reprodutivo, uma vez que, os aspectos reprodutivos interferem na eficiência e lucratividade dessa atividade (PHOCAS et al., 1998).

Várias são as características empregadas em programas de melhoramento animal que são indicadoras da precocidade sexual. Dentre elas podemos citar o perímetro escrotal (PE), a idade ao primeiro parto (IPP), seleção para maior peso ao sobreano e ocorrência de prenhez. Por ser uma característica binária recebendo "1" para o sucesso e "0" para o fracasso, a ocorrência de prenhez tem herdabilidade alta, com um valor de 0,52 aos meses 16 meses e herdabilidade baixa, com um valor de 0,12 aos 24 meses de idade (SILVA et al., 2005). Apesar de a prenhez precoce, ter herdabilidade alta, é uma característica de difícil seleção, em função de só ser expressa em fêmeas. Assim, vários estudos tem buscado genes marcadores de DNA para estas características (Hastings et al., 2006; Sahana et al., 2010; Islam et al.,2009).

Os microarranjos de DNA com alta densidade disponíveis no mercado permitem obter, em bovinos Nelore, genótipos para cerca de 450.000 SNPs polimórficos distribuídos em todos os autossomos e podem ser utilizados para a busca de QTLs com os estudos de associação do genoma completo. Contudo, o enorme número de teste estáticos aplicados nestes estudos, reduz tremendamente o poder do teste quando o número de amostras disponível não é

suficientemente grande, especialmente se várias características podem ser avaliadas (CAMPOS et al., 2010). Assim, quando o número de amostras é reduzido, é melhor buscar associação considerando um pequeno número de SNPs localizados em regiões correspondentes a genes candidatos que podem ter associação com alguma ou algumas características especificas.

Há fortes evidências de que o início da puberdade está relacionado com a taxa de crescimento e o tecido adiposo. Novilhas Nelore que apresentam maior peso aos 12 e 18 meses possuíram o primeiro cio em menor idade (ALENCAR et al., 1987). Estudos recentes mostram que em humanas, meninas que têm índice de massa corporal relativamente maior são mais propensas a ter menstruações antecipadas (KAPLOWITZ, 2008; WAGNER et al., 2012). Além da correlação de ganho de peso com a precocidade sexual, o tecido adiposo foi identificado como o local principal do metabolismo dos hormônios esteróides (SIITERI, 1987).

Estudos a partir de marcadores moleculares já demonstraram alguns genes que são relacionados ao metabolismo de lipídio e que tiveram efeito significativo para a característica precocidade sexual. Com isso, selecionamos de um painel de SNPs de alta densidade marcadores localizados em íntrons e éxons de 54 genes candidatos que estão relacionados ao metabolismo de lipídio e ao tecido adiposo,para buscar associações entre marcadores e a característica prenhez precoce.

2. Objetivo

O presente estudo teve como objetivos detectar associações entre polimorfismo detectados nos genes relacionados com o tecido adiposo e a precocidade sexual em bovinos da raça Nelore, visando sua utilização em programas de melhoramento da raça Nelore.

3. Material e Métodos

3.1. Animais e Coleta das Amostras

Foram utilizados dados de 1127 novilhas precoces e não precoces oriundos de fazendas participantes do programa de melhoramento da Conexão Delta G.

Dentre as fêmeas utilizadas, 25,82% eram precoces. As amostras de pelos obtidas a partir da vassoura da cauda foram colhidas durante a estação de monta dos anos de 2008 e 2009, e fêmeas com idade entre 14 e 16 meses. Após a coleta, as amostras foram colocadas em envelopes, identificadas e armazenadas a 4 ºC até a extração de DNA.

As novilhas de 14 a 16 meses de idade, realiza-se uma estação de monta antecipada, entre os meses de fevereiro e abril, com duração de, aproximadamente, 60 dias. Todas as novilhas são expostas à reprodução independente do peso e da condição corporal. Os sistemas de acasalamentos utilizados são inseminação artificial, monta controlada e reprodutor múltiplo, com relação touro:vaca de 1:50. As épocas de nascimento dos bezerros se concentram de agosto a outubro e novembro a janeiro, e os mesmos são mantidos com suas mães até os sete meses de idade à pasto. As novilhas são avaliadas quanto à prenhez por palpação retal, aproximadamente, 60 dias após o término da estação de monta antecipada. Novilhas que não concebem na estação de monta antecipada são utilizadas em outra estação de monta, aos dois anos de idade. Os critérios de descarte de fêmeas no rebanho são: falha reprodutiva até os dois anos de idade, falha da vaca em um ano, baixa avaliação de desempenho de progênies e uma pequena percentagem, por sanidade.

3.2. Extração de DNA

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Genética Molecular “Marcos Antônio Giannoni” do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal – SP.

As extrações de DNA das amostras de pelo coletadas foram realizadas a partir da metodologia adaptada por Lima (2003). Cerca de 40 folículos/animal foram depositados em um microtubo (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, adicionaram-se 500 μL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguindo à incubação a 65°C por 1,5 horas, com agitação periódica; após esse período, adicionaram-se 2 μL de proteinase

K/tubo (600 μg/μL) e incubou-se a 55 ^{o}C por 6 horas, com agitação periódica; e em seguida incubou-se a 37 ^{o}C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se 1 volume de PCI 25:24:1 (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra, agitou-se vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 12000 rpm a 23 ^{o}C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final dessa fase foi de aproximadamente 300 μL. Em seguida foi feita 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). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer – 80 ^{o}C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4 ^{o}C por 25 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e em seguida armazenado em 100 μL de TE (10:1).

3.3. Quantificação e Qualidade do DNA

A verificação de quantidade e qualidade do material obtido foi feita com uso do aparelho do espectrofotômetro (*Nanodrop 1000, Thermo Scientific*, EUA, 2008). A quantificação baseada na absorbância advém do fato de o DNA possuir pico de absorbância de luz no comprimento de 260 nm. Assim, a concentração é medida pela relação 1 OD260 = 50 μg/mL DNA.

A qualidade é medida pela relação de absorbância A260/A280. Proteínas têm pico de absorbância de 280 nm e essas podem ser possíveis contaminantes da solução de DNA. Assim sendo, espera-se que a relação A260/A280 esteja entre 1,8 e 2,0. A relação inferior a 1,8 sugere contaminação com proteína e a relação superior a 2,0, contaminação por RNA. Após a constatação desses parâmetros, a solução estoque foi diluída a 50 μg/mL em solução uso. Ambas foram congeladas em freezer.

3.4. Genes Candidatos

Foram considerados como candidatos 54 genes (Tabela 1) que codificam substâncias que são produzidas, secretadas ou que influenciam de algum modo o metabolismo de lipídios e no tecido adiposo.

Tabela 1. Lista dos genes candidatos, descrição, cromossomo e localização.

Gene	Descrição	Cromossomo	Localização
ACADL	Adiponectina	2	[98,416,820 - [98,456,944
ACOX1	acil-CoA oxidase 1, palmitoyl	19	[56,300,362 - [56,321,420
ADA	adenosina desaminase	13	[73750479 - [73773897
ADIPOQ	Adiponectina	1	[81,006,597 - [81,018,375
ADRB3	receptor, adrenérgicos beta-3,	27	[32912524 - [32915668
AGT	angiotensinogênio	28	[46147260 - [46156094
AGTRAP	proteína receptor de angiotensina II associados	16	[42806428 - [42825905
Apo-E	Apolipoproteína E	18	[53040105 - [53042792
BRAF	oncogene v-raf sarcoma murino viral homólogo B1	4	[104875266 - [105031758
CCK	Colecistocinina	22	[15190717 - [15196325
CEBPA	CCAAT enhancer proteína / ligante (C / EBP), alfa	18	[43928610 - [43929840
CFD	Fator do Complemento D (adipsin)	7	[45030310 - [45032846
DGAT 1	diacilglicerol aciltransferase 1-O	14	[1795425 - [1804838
DLK1	Delta-like 1 homólogo	21	[67274800 - [67283089
EGF	fator de crescimento epidermal	6	[16565618 - [16669065
FABP3	proteínas de ligação de ácidos graxos 3	2	[122723225 - [122783830
FABP4	ácidos graxos proteína de ligação 4, adipócitos	14	[46833665 - [46838053
FASN	síntese de ácidos graxos	19	[51384922 - [51403614
GAST	Gastrina	19	[42565344 - [42567655
GCG	Glucagon	2	[34398011 - [34408393
GH-1	hormônio de crescimento	19	[48768618 - [48772014
GIP	polipeptídeo inibitório gástrico	19	[38202539 - [38207784
GRB2	proteína do receptor do fator de crescimento ligado 2	19	[56754112 - [56818430
HGF	fator de crescimento hepatócito	4	[39116167 - [39197870
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1	5	[66532879 - [66604699
IL 6	interleucina 6	4	[31578311 - [31582679
Lep	Leptina	4	[93249874 - [93266624
LLPH	LLP homólogo, a longo prazo facilitação sináptica	5	[47901612 - [47905608
LPL	lípase lipoprotéica	8	[67481089 - [67487742
MAPK1	proteína quinase ativada por mitógeno 1	17	[74016491 - [74033720
MAPK3	proteína quinase ativada por mitógeno 3	25	[26437044 - [26444129
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos	17	[73273379 - [73274171

MYC	v-myc mielocitomatose homólogo do oncogene viral	14	[13769242 - [13774438
NAMPT	fosforibosiltransferase nicotinamida	4	[47594642 - [47635332
NPPA	peptídeo natriurético	16	[42712138 [42713218
PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1	13	[59144588 - [59150714
PLIN2	perilipin 2	8	[25129178 - [25137854
PPARa	alfa do receptor de peroxissoma proliferador-ativado	5	[117150468 - [117233112
PPARy	receptor gama ativado proliferador de peroxissomo	22	[57367072 - [57432321
PPP3CA	proteína fosfatase 3, subunidade catalítica, isoenzima alfa	6	[24812739 - [25136267
PRKACA	proteína quinase, o AMPc-dependente, alfa catalítico	7	[12693767 - [12712110
RAC2	toxina botulínica ras relacionadas C3 substrato 2	5	[76033363 - [76050188
RARRES2	Chemerin - retinoic acid receptor responder 2	4	[113564406 - [113567492
RETN	Resistina	7	[17737516 - [17738903
RXRB	receptor de retinóide X, beta	23	[7321254 - [7326765
SCD	estearoil-CoA desaturase	26	[21137945- [21148317
SERPINE1	serpin inibidor peptidase, E clado , 1 membro	25	[36198554 - [36206859
SPP1	fosfoproteína 1 secretada	6	[38120578 - [38127541
TG	Tireoglobulina	14	[9296197 - [9508938
TNF	fator de necrose tumoral	23	[27533901 - [27536674
TP53	proteína p53 do tumor	19	[27985494 - [27997841
UCP - 1	proteína desacopladora 1	17	[17467450 - [17473934
UCP - 2	proteína desacopladora 2	15	[54196170 - [54202633
UCP - 3	proteína desacopladora 3	15	[54213566 - [54224046

(GeneBank, 2012).

3.5. Painel de SNP e Genotipagem

Para a análise dos genes candidatos (Tabela 1) foram avaliados os *SNPs* do painel de 777.000 *SNPs* do *High Density Bovine SNP BeadChip* em ligação a estes genes. A escolha dos *SNPs* foi realizada tomando como base a posição do gene no genoma feita através do acesso ao gene no *GeneBank* e a posição dos SNPs do painel *Illumina*. Foram selecionados todos os SNPs localizados a até 5Kb (kilobases) dos genes propostos. Este chip apresenta cobertura uniforme com espaçamento médio entre marcadores de 5 Kb, e além disso, possui frequência média de alelos de frequência mínima (MAF) de 0,25 (*Illumina® SNP Genotyping*), em bovinos de raças taurinas.

A genotipagem foi feita segundo o protocolo da *Illumina - Infinium ® II Assay Multi-Sample,* utilizando-se o aparelho *HiScan™SQ System*, foram

genotipados apenas 487 novilhas precoces e não precoces, as outras 640 novilhas não foram genotipadas. Para assegurar a qualidade das amostras nas análises, utilizou-se o programa *GenomeStudio* para eliminar as amostras que obtiveram taxa de genotipagem (call rate) abaixo de 90%, também foram eliminados *SNPs* com MAF < 0,05; com taxa de genotipagem (call frequency) inferior a 0,9 e aqueles com valor de p para o teste de equilíbrio de Hardy Weinberg menor que 0,001.

Este mesmo programa foi utilizado para gerar os arquivos com as informações de cada *SNP* para cada animal, de acordo com o sistema *Illumina "TOP/BOT"* .

3.6. Reconstrução dos Haplótipos

Após a obtenção dos *SNPs* dentro da região dos genes, as regiões selecionadas foram analisadas utilizando-se o programa fastPHASE (SCHEET & STEPHENS, 2006) para a reconstrução dos haplótipos. Os resultados foram então inseridos no programa *Haploview v4.1* (BARRET et al., 2005), para estimar o LD entre os pares de *SNPs*, baseado na estatística r^2 (HILL & ROBERTSON, 1968) e obter os padrões dos alelos formados para cada haplótipo. Os *SNPs* que não faziam parte de nenhum haplótipo foram considerados marcadores isolados.

3.7. Análises Estatísticas

A característica utilizada nas análises estatísticas foi a prenhez precoce de novilha, que é uma característica binária, sendo que as novilhas com diagnóstico de prenhez positivo recebem o valor "1" e, as negativas, o valor "0".

As frequências alélicas e genotípicas para cada polimorfismo foram calculadas de acordo com Weir (1996).

Embora a característica tenha distribuição binária, modelos lineares foram utilizados para esta análise, em função da maior facilidade de implementação e interpretação dos resultados. Desta forma, para cada marcador *SNP* isolado ou haplótipo, a associação da característica de interesse foi verificada por meio de análises considerando um modelo linear misto.

Para todos os marcadores, o modelo de análise inclui como efeito fixo o grupo de contemporâneo e como aleatório o pai do animal (efeito touro). O grupo de contemporâneo foi definido pelas informações de fazenda, ano e mês do nascimento do animal. Para os animais com pai desconhecido foram adotados valores empíricos para tal informação.

Se definiu como haplótipo aqueles *SNPs* que segregaram juntos formando um locus, sendo os alelos a combinação dos *SNPs* de cada haplótipo. Nas análises com os *SNPs* isolados, o número de cópias do alelo mais frequente presente no genótipo do animal foi incluído como covariável. Nos segmentos onde foi possível detectar a presença de haplótipos, as análises foram realizadas considerando-se todos os *SNPs* formadores e cada haplótipos conjuntamente. Também nesse último caso variáveis contendo um número de cópias de cada alelo detectado na população, exceto o menos frequente, foram incluídos como covariável. Em ambos os casos para os animais não genotipados incluídos na análise utilizou-se o número médio de cópias de alelos por animal na população genotipada. O modelo de análise utilizado pode ser representado por:

$$y_{ijk} = GC_i + s_j + \sum_{l=1}^{n-1} b_l x_{ijkl} + e_{ijk}$$

em que: y_{ijk} é igual ao valor observado da característica estudada para o k^{ésimo} animal filho do j^{ésimo} touro no i^{ésimo} grupo de contemporâneo; GC_i é o efeito fixo do i^{ésimo} grupo de contemporâneo; s_j é o afeito aleatório do i^{ésimo} touro; b_l é o coeficiente de regressão do efeito do número de cópias do l^{ésimo} alelo sobre a característica estudada; x_{ijkl} é o número de cópias do l^{ésimo} do alelo no animal; e_{ijk} é o erro aleatório; n é o número de alelos para esse marcador analisado.

Todas as análises foram realizadas por meio do Procedimento Mixed do pacote estatístico SAS®. A fim de garantir a manutenção da taxa de erro dos testes estatísticos no experimento, foi aplicado o método de *Bonferroni* para comparações múltiplas.

4. Resultados

4.1. Extração de DNA e Genotipagem

Os resultados obtidos para a extração de DNA foram de excelente qualidade, pois mais que 97% das amostras tinham concentração maior que 100ng/μL e relação 260/280 entre 1,80 e 2 (Tabela 2), possibilitando a utilização do material com sucesso na análise genômica.

Tabela 2. Concentração média, máximo e mínimo de DNA obtido pelo método de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico a partir de folículos pilosos quantificados pelo aparelho NanoDrop®

	Concentração	***Relação 260/280***
Média	525, 90	1,94
Máximo	2798, 45	2, 01
Mínimo	85, 12	1,79

Após a genotipagem, amostras que apresentavam *call rate* abaixo de 90% foram eliminadas. Apesar da excelente qualidade do DNA extraído, 20 amostras foram excluídas em razão do baixo valor de call rate. Como a extração do DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (PCL), é possível que tenha havido contaminação por resíduo de PCL, o que pode ter prejudicado a leitura dos resultados.

4.2. Seleção de *SNPs* e formação de haplótipos

Do total de 777.000 *SNPs*, 480.556 (61,9%) tinham call rate igual ou superior a 90%, MAF>0,05 e *p* para o teste de equilíbrio de Hardy Weinberg maior que 0,001. Espigolan et al. (2012) encontraram 57,3% de *SNPs* de acordo com os mesmo critérios. Os painéis de *SNPs* para a genotipagem foram desenvolvidos a partir do genoma de diversas raças, principalmente de raças taurinas, mas também com raças zebuínas, tornando os marcadores mais informativos para

animais da raça taurinas do que para zebuínos, os quais apresentam vários alelos em frequência muito baixa (MAF) (MATUKUMALLI et al., 2009).

O número de *SNPs* encontrados dentro de cada região dos genes candidatos variou de 0 a 73 (Tabela 3). Após a localização dos *SNPs* foram montados os grupos de haplótipos (Tabela 4) e então foram feitas as análises estatísticas. Os haplótipos variaram em sua formação de dois a dezesseis SNPs.. Zhang et al. (2003) relataram que em humanos, não há padrão para a quantidade de *SNPs* por haplótipo.

Tabela 3. Quantidade de *SNPs* encontrados em cada gene candidato

Gene	Número de SNPs	Gene	Número de SNPs	Gene	Número de SNPs
ACADL	13	**GAST**	6	**PLIN2**	1
ACOX1	10	**GCG**	2	**PPARa**	14
ADA	19	**GH-1**	3	**PPARy**	16
ADIPOQ	4	**GIP**	1	**PPP3CA**	73
ADRB3	1	**GRB2**	6	**PRKACA**	2
AGT	4	**HGF**	12	**RAC2**	5
AGTRAP	15	**IGF1**	3	**RARRES2**	2
Apo-E	0	**IL 6**	4	**RETN**	1
BRAF	8	**Lep**	12	**RXRB**	1
CCK	5	**LLPH**	1	**SCD**	4
CEBPA	0	**LPL**	9	**SERPINE 1**	0
CFD	3	**MAPK1**	4	**SPP1**	2
DGAT 1	2	**MAPK3**	0	**TG**	72
DLK1	2	**MIF**	1	**TNF**	7
EGF	35	**MYC**	3	**TP53**	0
FABP3	15	**NAMPT**	9	**UCP - 1**	9
FABP4	3	**NPPA**	0	**UCP - 2**	5
FASN	0	**PCK1**	3	**UCP - 3**	5

Tabela 4. Descrição de Haplótipos (h) por Cromossomo (Crom), com o número de alelos e *SNPs* formadores de haplótipos e *SNPs* isolados (*SNPi*).

Crom 2	**Alelo**	**SNP**
h 02-1	3	2
h 02-2	4	11
h 02-3	3	2
h 02-4	4	3
h 02-5	3	2
h 02-6	3	2
h 02-7	2	2
h 02-8	3	2
SNPi		4
Crom 4	**Alelo**	**SNP**
h 04-1	4	4
h 04-2	7	10
h 04-3	4	9
h 04-4	3	4
h 04-5	4	7
SNPi		13
Crom 5	**Alelo**	**SNP**
h 05-1	3	2
h 05-2	3	5
h 05-3	4	5
h 05-4	2	4
h 05-5	2	2
SNPi		5

Crom 6	**Alelo**	**SNP**
h 06-1	4	3
h 06-2	4	4
h 06-3	4	3
h 06-4	3	2
h 06-5	5	4
h 06-6	3	2
h 06-7	4	3
h 06-8	4	4
h 06-9	5	6
h 06-10	7	13
h 06-11	4	7
h 06-12	4	4
h 06-13	3	2
h 06-14	4	4
h 06-15	6	8
h 06-16	3	4
h 06-17	6	8
h 06-18	3	2
h 06-19	4	5
h 06-20	8	11
h 06-21	3	2
SNPi		9

Crom 7	**Alelo**	**SNP**
h 07-1	3	2
h 07- 2	2	3
SNPi		1
Crom 8	**Alelo**	**SNP**
h 08-1	6	16
SNPi		1
Crom 13	**Alelo**	**SNP**
h 13-1	3	2
h 13-2	4	4
h 13-3	3	2
h 13-4	4	6
h 13-5	3	2
h 13-6	4	5
SNPi		1
Crom 14	**Alelo**	**SNP**
h 14-1	3	2
h 14-2	3	2
h 14-3	6	8
h 14-4	3	2
h 14-5	3	2
h 14-6	3	3
h 14-7	7	15

Crom 14	**Alelo**	**SNP**
h 14-8	3	2
h 14-9	5	8
h 14-10	9	10
h 14-11	3	2
h 14-12	7	11
h 14-13	2	2
h 14-14	3	2
SNPi		11
Crom 15	**Alelo**	**SNP**
h 15-1	6	6
h 15-2	5	4
SNPi		0
Crom 16	**Alelo**	**SNP**
h 16-1	4	6
h 16-2	6	9
SNPi		0
Crom 17	**Alelo**	**SNP**
h 17-1	3	3
h 17-2	4	4
h 17-3	3	2
SNPi		5

Crom 19	**Alelo**	**SNP**
h 19-1	3	2
h 19-2	3	2
h 19-3	2	2
h 19-4	3	2
h 19-5	4	7
h 19-6	3	6
SNPi		5
Crom 21	**Alelo**	**SNP**
h 21-1	3	2
SNPi		0
Crom 22	**Alelo**	**SNP**
h 22-1	6	5
h 22-2	2	2
h 22-3	2	2
SNPi		14
Crom 23	**Alelo**	**SNP**
h 23-1	4	3
h 23-2	4	3
SNPi		2
Crom 26	**Alelo**	**SNP**
h 26-1	2	4
SNPi		0
Crom 28	**Alelo**	**SNP**
h 28-1	3	2
SNPi		2

4.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas revelaram, após a correção pelo método de *Bonferroni*, que apenas dois haplótipos formados por dois e quatro *SNPs* localizados nos genes *FABP4* e *PPP3CA* e um *SNP* isolado no gene *PPP3CA* tiveram efeito significativo ao nível de $p<0,05$ para a característica de precocidade sexual em bovinos da raça Nelore. Os demais *SNPs* isolados e haplótipos estudados não tiveram efeito significativo sobre a característica avaliada, incluindo-se entre estes um terceiro *SNP* também localizado no gene *FABP4* e 68 *SNPs* localizados no gene *PPP3CA*. Destes 68 *SNPs,* 63 formaram 10 haplótipos e os outros 5 foram estudados isoladamente. As Tabelas 4 e 5 apresentam os alelos encontrados no rebanho estudado, seguindo as normas para determinação de alelos *"Top/Bot"* da *Illumina*® *(Illumina Technical Support, 2006).*

Os haplótipos significativos localizados nos genes *FABP4* e *PPP3CA* correspondem aos haplótipos localizados no cromossomo 14 e 6, os quais de denominam haplótipos h14-14 e h06-14 (Tabela 4). Os *SNPs* do h14-14, cromossomo 14 e gene *FABP4* estão localizados nas posições 46833778 e 46837361 com identificação HD 1400013256 e HD 1400013257. O *SNP* isolado no cromossomo 6 no gene *PPP3CA* está localizado antes do h06-14 com localização 24935878 e identificação HD 0600006865. Os *SNPs* do h06-14, cromossomo 6 e gene *PPP3CA* estão localizados nas posições 24944828, 24949691, 24955087 e 24960820 com identificação HD 0600006867, HD 0600006868, HD 0600006869 e HD 0600006870.

Tabela 5. Frequências e efeito médio do alelo e respectivo erro padrão, dos alelos do haplótipo localizado no gene *FABP4*

Alelo	***Bases dos SNPs***	***Frequência***	***Efeito Médio***	***Erro Padrão***
Alelo1	AA	0,547	0,0088	0,0616
Alelo2*	CA	0,343	0,3081	0,0662
Alelo3*	CG	0,110	- 0,3170	0,0902

* efeito médio significativamente diferente de zero (P<0,05).

Tabela 6. Frequências e efeito médio do alelo e respectivo erro padrão, dos alelos do haplótipo localizado no gene *PPP3CA*

Alelo	***Bases dos SNPs***	***Frequência***	***Efeito Médio***	***Erro Padrão***
Alelo1	AAAA	0,094	0,035	0,146
Alelo2*	GGGG	0,539	0,263	0,092
Alelo3*	GAGA	0,284	0,428	0,106
Alelo4*	GGGA	0,084	-0,727	0,152
SNP isolado				
Alelo1*	A	0,176	-0,164	0,037
Alelo2*	G	0,824	0,164	0,037

* efeito médio significativamente diferente de zero (P<0,05).

5. Discussão

O efeito do haplótipo formado por dois *SNPs*, localizados na região do gene *FABP4* foi significativo (P<0,05) indicando que este polimorfismo, pode ter efeito direto sobre a precocidade sexual. O haplótipo apresenta três alelos (Tabela 8), sendo um praticamente neutro e os dois outros com sinais opostos. Como o erro padrão das estimativas foi relativamente grande, a confiança no efeito médio é baixa. O alto valor do erro padrão se deve ao baixo número de animais utilizados no experimento. Um terceiro *SNP* deste mesmo gene, porém em equilíbrio de ligação com os dois *SNPs*,

não mostrou efeito significativo sobre a característica. Não foram encontrados relatos na literatura relacionando os efeitos de polimorfismos no *FABP4* diretamente sobre a precocidade sexual. Entretanto, Hoashi et al. (2008) encontraram efeito significativo de polimorfismos deste gene com a porcentagem de colesterol C16:1 que, segundo Lauber et al. (1993) e Nelson & Cox (2002) funciona como precursor de hormônios esteróides, que, por sua vez têm efeitos diretos sobre órgão reprodutivos.

Os ácidos graxos livres, transportados pelo *FABP4*, podem ser ativados e oxidados para produzir o acetil-CoA e NADH e parte deste acetil-CoA é utilizada para a biossíntese do colesterol. Os esteroides, produzidos a partir do colesterol são responsáveis por modular a diferenciação, o crescimento e a fisiologia dos órgãos reprodutivos (NELSON & COX, 2002; HAVLIKOVA et al., 2006; FERRETTI et al., 2008; KRESGE et al., 2009).

Outra via indireta pela qual os polimorfismos no gene *FABP4* podem estar associados à precocidade sexual é por meio da leptina. Há relatos de que esse gene (*FABP4*) foi localizado dentro de alguns *loci* de características quantitativas (QTL) da região que contribuem para os níveis séricos de leptina em ratos (OGINO et al., 2003). Há muitos estudos que relacionam a leptina com a precocidade sexual (MOORE et al., 2003; WU et al., 2005; LEW, 2006; SALMAN & COSTA 2006; BELTRAN, 2007 ; FURLAN et al., 2007; FERNYHOUGH et al., 2007; VAICIUNAS, 2007). Entretanto, é interessante notar que o gene da Leptina foi incluído neste estudo, com 12 *SNPs* polimórficos, que foram analisados como 9 *SNPs* isolados e um haplótipo formado por três *SNPs*, não sendo detectado efeito significativo sobre a característica de interesse.

O haplótipo localizado no cromossomo 6, na região do gene *PPP3CA*, formado a partir de quatro *SNPs* teve efeito significativo ($P<0,05$) sobre a característica de interesse. O haplótipo apresenta quatro alelos (Tabela 8), sendo um praticamente neutro, dois com sinal positivo e o último com maior valor possui sinal negativo. Como o erro padrão das estimativas foi relativamente grande, a confiança no efeito médio é baixa. Há um *SNP* estudado isoladamente com dois alelos que também apresentou efeito significativo. Como o erro padrão das estimativas foi relativamente grande, a confiança no efeito médio é baixa. Os outros 68 *SNPs* desse gene que foram

estudados isoladamente ou formadores de haplótipos não tiveram efeito significativo sobre a precocidade sexual.

Não há relatos na literatura correlacionando o gene PPP3CA com a precocidade sexual em machos ou fêmeas, porém Martin et al. (2007) ao analisarem ratos, constataram que quando este gene é inativadoproblemas de desenvolvimento testicular e redução das espermátides maduras ocorrem. Desse modo, os mesmos autores concluíram que esse gene é criticamente importante na espermatogênese e no desenvolvimento testicular. Silva et al. (1999) relataram em bovinos da raça Nelore que, animais que iniciam cedo a sua atividade sexual devem apresentar um desenvolvimento testicular adequado.

O gene PPP3CA está envolvido com a diferenciação de pré-adipócitos da gordura perimuscular em bovinos (TANIGUCHI et al., 2008). Os pré-adipócitos são capazes de diferenciar-se em adipócitos maduros, sendo que adipócitos são células responsáveis pelo armazenamento de gordura (FRAYN et al., 2003; COSTA & DUARTE, 2006; FONSECA-ALANIZ et al., 2006). Além disso, a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros está associada há um aumento dos níveis de IGF-I no organismo (WAJCHENBERG, 2000). Há relatos na literatura de que o gene responsável pela expressão do IGF-I está relacionado com a precocidade sexual (LEW, 2006; BELTRAN, 2007; ISLAM et al., 2009; MICKE et al., 2010). Neste estudo trabalhou-se com três *SNPs* neste gene, sendo que destes dois *SNPs* formam um haplótipo e o outro foi estudado isoladamente, porém não se detectou efeito significativo sobre a característica de interesse.

Não foram encontrados na literatura consultada relatos de polimorfismo de outros genes que estão ligados com o metabolismo do tecido adiposo e que tenham efeito sobre a precocidade sexual.

6. Conclusão

Os genes *FABP4* e *PPP3CA* influenciam a precocidade sexual e, podem desse modo, serem considerados em programas de seleção que visem melhorias na precocidade sexual de animais da raça Nelore.

7. Referências Bibliográficas

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. 2012.

ALENCAR, M.M.; COSTA, J.L.; CORREA, L.A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças canchim e nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 753-758, 1987.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira.** 19 ed. FNP Consultoria, Brasil, p.378, 2012.

BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v.21, n.2, p.263-265, 2005.

BELTRAN, M.P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmático sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*).** 2007. Dissertação (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2007.

CAMPOS, G.; GIANOLA, D.; ALLISON, D. B. Predicting genetics predisposition in humans: the promise of whole-genome markers. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p. 880-886, 2010.

CEZAR, I.M.; QUEIROZ, H.P.; THIAGO, L.R.L.S.; CASSALES, F.L.G.; COSTA, F.P. **Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate**. Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2005.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 19, p. 251-256, 2006.

ELER, J. P.; SILVA, J.A.II V.; EVANS, J.L.; FERRAZ, J.B.S; DIAS, F.; GOLDEN, B.L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nellore cattle. **Journal of Animal Science,** vol. 82, p. 2519–2527, 2004.

ESPIGOLAN, R.; BALDI, F.; SOUZA, F.R.P.; GORDO, D.G.M.; TONUSSI, R.L.; ALBUQUERQUE, L.G. Estudo do desequilíbrio de ligação entre marcadores no genoma de bovinos da raça Nelore. **IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, João Pessoa, PB, 2012.

FERNYHOUGH, M. E.; OKINE, E.; HAUSMAN, G.; VIERCK, J. L.; DODSON, M. V. PPARγ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiaton into an adipocyte. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p. 367-378, 2007.

FERRETTI, G.; FERRANTI, C.; CROVELLA, T.; FIORI, M.; CIVITAREALE, C.; MARCHIAFAVA, C.; QUADRI, F.; CAMMARATA, P.; PALLESCHI, L. Simultaneous analysis of 17 alpha-estradiol and 17 beta-estradiol in bovine serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 135-140, 2008.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p. 331-341, 2007.

FONSECA-ALANIS, M.H.; TAKADA,J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinal. Metab.**, vol.50, n.2, p 216-229. 2006.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biology of Reproduction**, v.
60, p. 205 - 215, 1999.

FRAYN, K.N.; KARPE, F.; FIELDING, B.A.; MACDONALD, I.A.; COPPACK, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v.27, p. 875-888, 2003.

GeneBank. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/. Acessado em: 10 de maio de 2012.

HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; et al Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, vol. 37, p. 583–585, 2006.

HAVLÍKOVA, L.; NOVAKOVA, L.; MATYSOVA, L.; SICHA, J.; SOLICH, P. Determination of estradiol and its degradation in products by liquid chromatograghy. **Journal of Chromatografy A**, v.1119, p. 216-233, 2006.

HILL, W.G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.38, n.6, p.226-231, 1968.

HOASHI, S.; HINENOYA, T.; TANAKA, A.; OHSAKI, H.; SASAZAKI, S.; TANIGUCHI, M.; OYAMA, K.; MUKAI, F.; MANNEN, H. Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXRα in Japanese Black cattle. **BMC Genetics**, 2008.

ILLUMINA ® SNP Genotuping. "TOP/BOT" Strand and "A/B" allele. Disponível em:http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_topbot.pdf . Acesso em 25 de Junho de 2012.

ISLAM, K.K.; VINSKY, M.; CREWS, R.E.; OKINE, E.; MOORE, S.S.; CREWS JR, D.H.; LI, C. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. **Animal Genetics**, vol. 40, n.5, pag. 766-769. 2009.

KAPLOWITZ, P.B. Link between body fat and the timing of puberty. **Pediatrics**, v. 121, p. 208 - 217, 2008.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. Biotin-dependent enzymes: the work of Feodor Lynen. **The Journal os Biological Chemistry**, v. 284, p. e6-e7, 2009.

LAUBER, M. E.; KAGAWA, N.; WATERMAN, M. R. et al. cAMP-dependent and tissue-specific expression of genes encoding steroidogenic enzymes in bovine lutealand granulosa cells in primary culture. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 93, n. 2, p. 227-233, 1993.

LENSTRA, J.A..; BRADLEY, D.G. Systematics and phylogeny of cattle. In: R. FRIES, R.; RUVINSKY, A. (ed) **Genetics of cattle**, p.15-32, New York, USA: Ed CABI Publishing, 1999.

LEW, B. J. Desenvolvimento mamário em novilhas leiteiras: aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no processo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.36-41, 2006.

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.** 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MARTIN, L.J.; CHEN,H.; LIAO, X.; ALLAYEE, H.; SHIH, D.M.; LEE, G.S.; HOVLAND Jr, D.N.; ROBBINS, W.A.; CARNES, K.; HESS, R.A.; LUSIS, A.J.; COLLINS, M.D. FK506, a calcineurin inhitor, prevents cadmiu,-induced testicular toxicity in mice. **Toxicological Sciences**, v. 100, p. 474-485, 2007.

MATUKUMALLI, L.K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; ALLAN, M.F.; HEATON, M.P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S.S.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS ONE**, v.4, n.4, e5350 doi:10.1371/journal.pone.0005350, 2009.

MICKE, G.C.; SULLIVAN, T.M.; GATFORD, K.L.; OWENS, J.A.; PERRY, V.E.A. Nutrient intake in the bovine during early and mid-gestation causes sex-specific changes in progeny plasma IGF-I, liveweight, height and carcass traits. **Anim. Repr. Sci.,** vol 121, pag. 208–217. 2010.

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

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger : Princípios Básicos da Bioquímica.** 3° São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2002.

OGINO, T.; MORALEJO, D. H.; KOSE, H.; YAMADA, T.; MATSUMOTO, K. Serum leptin concentration is linked to Chromosomes 2 and 6 in the OLETF rat, an animal model of type 2 diabetes with mild obesity. **Mammalian Genome**, v. 14, p. 239-244, 2003.

PHOCAS, F.; BLOCH, C.; CHAPELLE, P. Developing a breeding objective for a French purebred beef cattle selection programme. **Livestock Production Science.**, vol. 57, p. 49-65, 1998.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; BENDIXEN,C.; LUND, M.S. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Animal Genetics**, v. 41, p 579-588, 2010.

SALMAN, A.K.D.; COSTA, R.B. **Ação hormonal da leptina em ruminantes**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.

SANTOS, R. **O Zebu**. Uberaba, MG: Ed. Agropecuária Tropical, 1998.

SIITERI, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. **The American Journal of Clinical Nutricion**, v.45, p. 277-282, 1987.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; SILVA,A.R. Aspectos relacionados à precocidade sexual em bovinos machos da raça Nelore, PO. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.42, 1999.

SILVA, J. A. II V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** vol. 34, n.5, p.1568-1572. 2005.

SCHEET, P.; STEPHENS, M. A Fast and Flexible Statistical Model for Large-Scale Population Genotype Data: Applications to Inferring Missing Genotypes and Haplotypic Phase. **The American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 629-644, 2006

TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; ZHANG, B.; DODSON, M. V; OKINE, E.; MOORE, S. S. Gene expression patterns of bovine perimuscular preadipocytes during adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, p. 246-351, 2008.

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoce e não precoces.** Dissertação (mestrado) Faculdade de Medicina Veterinãria e Zootecnia – Universidade de São Paulo. Pirassununga- SP. 2007.

WAGNER, I.V.; SABIN, M.A.; PAFAFFLE, R.W.; HIEMISCH, A.; SERGEYEV, E.; KORNER, A.; KIESS, W. Effects of obesity on human sexual development. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 246-254, 2012.

WAJCHENBERG, B.L. Tecido adiposo como glândula endócrina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.44, p. 13-20, 2000.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Association, Inc; Sunderland, MA, USA: 1996.

WU, X.; McNEIL, M. D.; DE, S.; XIAO-JUN,Q. MICHAL, J. J.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; WRIGHT, R. W. JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects fo beef backfat via baysian model selection. **Genetica**, v. 125, p. 103-113 2005.

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

ZHANG, J.; ROWE, W. L.; CLARK, A. G.; BUETOW, K. H. Genomewide distribution of high-frequency, completely mismatching SNP haplotype pairs observed to be commom across human populations. **AJHG**, v.73, p. 1073-1081, 2001.