

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

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO
SOMATOTRÓPICO EM BOVINOS NELORE
SELECIONADOS PARA CRESCIMENTO**

Diércles Francisco Cardoso
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2012

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

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO
SOMATOTRÓPICO EM BOVINOS NELORE
SELECIONADOS PARA CRESCIMENTO**

Diércles Francisco Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Co-orientador: Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza

Co-orientadora: Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2012

Cardoso, Diercles Francisco
C268a Análise de polimorfismos em genes do eixo somatotrópico em
bovinos nelore selecionados para crescimento / Diercles Francisco
Cardoso. -- Jaboticabal, 2012
xi, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Humberto Tonhati
Banca examinadora: Fernando Sebastián Baldi Rey, Juliana Meola
Bibliografia

1.Frequência alélica. 2.GH. 3.GHR. 4.Genes candidatos.
5.POU1F1. 6.Seleção. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO SOMATOTRÓPICO EM BOVINOS NELORE SELECIONADOS PARA CRESCIMENTO

AUTOR: DIERCLES FRANCISCO CARDOSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA EUGENIA ZERLOTTI MERCADANTE

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

Prof. Dr. FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FERNANDO SEBASTIÁN BALDI REY

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Profa. Dra. JULIANA MEOLA

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Usp

Data da realização: 27 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DIÉRCLES FRANCISCO CARDOSO – nascido na cidade de Berilo – MG na data de 04 de junho de 1988, filho de Domingos Francisco das Virgens e Valdirene Cardoso Santos. Ingressou no curso de zootecnia no ano de 2006 na Faculdade de Ciência Agrárias, Universidade de Marília (UNIMAR) obtendo o título de Zootecnista em dezembro de 2009. Durante o primeiro semestre de 2010 integrou o projeto “Modelos de regressão aleatória aplicados em análise genética da produção de leite e seus constituintes em Bubalinos” coordenado pelo Prof. Dr. Humberto Tonhati na qualidade de bolsista de apoio técnico a pesquisa. Em agosto de 2010, 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 sob a orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati, obteve bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo em março de 2011 até julho de 2012. Na data de 27 de julho de 2012 obteve o título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

“Existem coisas que são conhecidas e coisas desconhecidas. E entre elas existem portas.”

Willian Blake (1757-1827)

Dedico:

**A meus pais, por tornarem possível e a meus
irmãos para que tenham inspiração.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Aos meus pais (Domingos e Valdirene), por buscarem sempre proporcionar aos filhos as oportunidades que eles não tiveram e por estabelecer em casa um laço de amizade e respeito que moldam valores essenciais à vida.

Ao meu irmão Diêime, por me ensinar que de uma discussão só se leva de bom a reconciliação, e por todas as experiências vividas desde a infância.

À minha irmã Beatriz e a minha Sobrinha Nicole, por serem crianças adoráveis e proporcionarem muitas alegrias a nossa família. Que sejam capazes de alcançar seus sonhos.

Aos meus amigos de longa data: Genival, Márcia, Jéssica, Índio, Vandete, Carlos e Railda, por tornar impossível a distinção entre amigos e família.

Ao professor Danísio Munari e aos seus orientados, por me acolherem durante o estágio de graduação, pelos ensinamentos, pelo café e pelos ótimos momentos que me proporcionaram.

Ao professor Humberto Tonhati, por sua orientação, por seus conselhos, por valores pessoais que se preocupa em transmitir a seus orientados e por manter-me sob sua orientação no doutorado. Dedicar-me-ei em corresponder à confiança ofertada.

À meus Co-orientadores: Professor Fábio e Dra. Maria Eugênia, pessoas pelas quais tenho grande admiração, pelos ensinamentos, contribuição e atenção.

À Arione, pela valiosa contribuição com as análises estatísticas e pelas risadas.

À minha Banca de Qualificação (Dr. Fábio, professor Jeffrey e Dra. Arione), também a minha banca de Defesa (Dr. Fábio, Professor Fernando Baldi e Dra. Juliana Meola), pelas interessantes sugestões e pela colaboração com o trabalho.

Aos amigos pós-graduandos e funcionários do laboratório: Fernanda, Patrícia, Camila, Larissa Zetouni, Larissa Fonseca, Marina, Ana Cláudia, Fabieli, Marcelo Cervini, Gabriela Fernanda, João e Paulo, pelos momentos compartilhados. Em especial agradeço ao Gregório por sua rotineira ajuda.

À todos os amigos do departamento de Zootecnia: Raul, Francisco, Naudin, Fábio Borba, Túlio, Dimas, Daniele, Daniel Gordo, Tiago Valente, Aline Santana, Mariana Franco e Natália Irano, pela agradável convivência.

Aos atuais e ex-moradores da Republica Kasa Verde (RKV): D. Tereza, Daniel Jordan (Meninão), Cláudio (Krusty), Rafael (Japonês), Thiago Bruno (Fiuquinho), Thiago (Tigrão), Marcos (Marcão), Guilherme (Gui), Edson (Mineiro), Douglas (Paraná), Ismael (Taioaba), André (Déga), Estevão (Carcaça), Oscar (Baiano) e a Nega (pretinha) por fazerem da vida em Jaboticabal muito mais divertida.

Aos Agregados e frequentadores assíduos da RKV: Marinão, Tiago Avancini, Luciana Rola, Ellen, Mariana Rettondini e Vanessa Freitas, por serem companhias sempre muito agradáveis.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pelas portas abertas.

À Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, pelo fornecimento de material biológico e registros fenotípicos que possibilitaram a condução de meu experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos, e pela colaboração com a minha formação.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Importância das raças zebuínas na pecuária nacional.....	3
2.2. Rebanho da EEZS (Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho).....	5
2.3. Marcadores genéticos	7
2.4. Genes candidatos na seleção assistida por marcadores (MAS)	12
2.5. Genes candidatos do eixo somatotrópico.....	13
3. OBJETIVO GERAL.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Animais.....	18
4.2. Características avaliadas	19
4.3. Análises laboratoriais	20
4.4. Frequências gênicas e genotípicas	24
4.5. Análises de associação	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Amplificação de DNA por PCR.....	27
5.2 Genotipagem de SNPs na população por PCR-RFLP	28
5.3. Frequências alélicas e genotípicas	32
5.4. Análises de associação dos marcadores com valores fenotípicos.....	36
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA POSIÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NOS GENES GH1, GHR E POU1F1.....	22
FIGURA 2. PRODUTO DE PCR VISUALIZADO POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2%.....	27
FIGURA 3: PADRÕES DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE GH APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>MspI</i>	28
FIGURA 4. PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE POU1F1 APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>StuI</i> E DE GHR COM A ENZIMA <i>AluI</i>	29
FIGURA 5. CROMATOGRAMA DO SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO DE GHR	30
FIGURA 6: PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO FRAGMENTO DE GHR APÓS DIGESTÃO COM <i>AluI</i>	31

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM GENES DO EIXO SOMATOTRÓPICO EM BOVINOS NELORE SELECIONADOS PARA CRESCIMENTO

RESUMO – Os marcadores genéticos podem auxiliar na seleção em características de importância econômica com a definição de regiões no DNA que expliquem proporções de sua variação. Este estudo teve como objetivo verificar a existência dos polimorfismos *GH1 g.1047T>C*, *POU1F1 c.577C>A*, *GHR g.229T>C* e *GHR g.257A>G* em bovinos Nelore pertencentes ao programa de seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho-SP, avaliar a influência da seleção para peso sobre estes polimorfismos, além de, analisar suas associações com o peso corporal em diferentes idades, altura na garupa ao ano e ao sobreano, espessura de gordura na carcaça e área de olho de lombo. Foram genotipados 645 animais por PCR-RFLP. As análises de associação foram realizadas com a técnica dos modelos mistos, considerando o efeito de dois marcadores e a interação entre os mesmos. Apenas os marcadores *GH1 g.1047T>C* e *GHR g.229T>C* foram polimórficos, no entanto não estão sobre efeito da seleção aplicada ao rebanho. Foi observada associação do marcador *GHR g.229T>C* com a área de olho de lombo ($p<0,03$) e efeito da interação entre os marcadores sobre o peso corporal de fêmeas aos 550 dias de idade ($p<0,04$). Assim, o marcador *GHR g.229T>C* caracteriza um potencial instrumento de auxílio para a seleção nesse rebanho e o efeito de interação deve ser considerado em situações em que seja conhecida a interatividade entre dois genes.

Palavras Chave: frequência alélica, *GH*, *GHR*, genes candidatos, *POU1F1*, seleção.

ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN GENES OF THE SOMATOTROPIC AXIS IN NELLORE CATTLE SELECTED FOR GROWTH

ABSTRACT – The genetic markers can assist the selection of economic important traits with the definition of DNA regions that explain part of the trait variation. This work has the aim to verify the presence of polymorphisms *GH1 g.1047T>C*, *POU1F1 c.577C>A*, *GHR g.229T>C* and *GHR g.257A>G* in Nellore cattle from the selection program of Animal Science Experimental Station, Sertãozinho-SP, evaluate the influence of the growth selection in these polymorphisms and analyze their association with body weight at different ages, hump height at 378 days and 550 days, carcass fat thickness and rib eye area. 645 animals were genotyped by PCR-RFLP. The association analyses were performed using the mixed model considering the two markers effect and the interaction among markers. Only the markers *GH1 g.1047T>C* and *GHR g.229T>C* were polymorphic, however they were no under effect of the selection. It was observed association between the marker *GHR g.229T>C* and the trait rib eye area ($p<0,03$) and effect the interaction among the two markers with the dam body weight at 550 days of age ($p<0,04$). Therefore, the marker *GHR g.229T>C* can be a potential tool to assist selection of females in this herd. The interaction effect may be considered in the cases that the interaction between the genes is known.

Keywords: Allelic frequencies, *GH*, *GHR*, candidate genes, *POU1F1*, selection

1. INTRODUÇÃO

Os métodos convencionais de seleção, aplicados em programas de avaliação genética de bovinos, buscam estimar o valor genético de cada animal baseado em informações fenotípicas do próprio indivíduo, de seus ancestrais e colaterais por meio do grau de parentesco entre eles. Embora o objetivo de cada programa de seleção seja identificar animais geneticamente superiores, as informações genotípicas não são usualmente incorporadas às metodologias de avaliação. Os recentes avanços em tecnologias moleculares possibilitam a identificação de variações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA que possam ser considerados como marcadores genéticos para características de importância econômica e venham a auxiliar o método convencional de avaliação genética em uma raça.

A seleção direcional aplicada a uma população animal tende a alterar as frequências alélicas e genotípicas em genes associados aos critérios de seleção, de forma definitiva e acumulativa, mesmo quando efetuada sem o conhecimento de quais sejam esses genes (HAYES et al., 2006). Portanto, a identificação de regiões no genoma que tenham suas frequências afetadas pela seleção, equivale a uma maneira de busca por QTL (*Quantitative trait loci* – loci de características quantitativas) para as características que estejam sendo selecionadas. A Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho (EEZS) mantém, desde 1980, um programa experimental de seleção para crescimento com a raça Nelore, o qual permite a comparação de frequências alélicas e genotípicas entre diferentes linhas de seleção, afim de, identificar regiões gênicas que estejam sob a influência da seleção.

A utilização dos genes candidatos equivale a uma maneira estratégica de identificar regiões genômicas que estejam sob efeito da seleção aplicada ao rebanho da EEZS. A escolha de um gene como candidato, para alguma característica, leva em consideração a importância do fator biológico codificado por este gene na característica em questão. O hormônio do crescimento (GH), e fatores codificados por outros genes

que junto a ele compõem o eixo somatotrópico são cruciais para o crescimento propriamente dito e desenvolvimento muscular animal. Sendo assim, as regiões que codificam tais fatores, correspondem a genes candidatos interessantes de serem analisados nos animais selecionados para características de crescimento da EEZS.

O gene *GH1* que codifica o hormônio do crescimento apresenta dentre os polimorfismos descritos na literatura, uma mutação no intron 3 denominada *g.1047T>C*, que caracteriza-se por frequências alélicas inversas entre raças taurinas e indianas, supostamente devido ao efeito adaptativo dos alelos as regiões geográficas na qual a população se estabeleceu (LAGZIEL et al., 2000). Este polimorfismo já foi associado com níveis de ganho de peso em idades tardias na raça Nelore (UNANIAM et al. 2000). O gene *POU1F1* que codifica o fator de transcrição específico do hormônio GH, também já foi descrito como polimórfico em bovinos. HUANG et al. (2008) encontrou o polimorfismo *c.577C>A* no exon 3 deste gene, que gera uma substituição de aminoácido na proteína e expressa efeito na produção de leite e longevidade em bovinos leiteiros. O gene *GHR*, codifica a proteína receptora do hormônio do crescimento, de localização transmembrânica nas células em que esse hormônio atua. O exon 10 que equivale a região deste gene que codifica a porção citoplasmática da proteína teve alguns polimorfismos descritos em sua sequência na raça Angus por GE et al. (2003). Dentre eles, os polimorfismos *g.229T>C* e *g.257A>G* relativamente próximos e capazes de serem analisados em um mesmo produto de PCR. Sendo o SNP *GHR g.229T>C* uma mutação silenciosa, enquanto o SNP *GHR g.257A>G* resulta em uma substituição de aminoácidos na proteína.

Diante do exposto, a genotipagem dos animais da EEZS para estes polimorfismos nos genes *GH1*, *POU1F1* e *GHR* torna-se interessante por tratar de um polimorfismo com propriedade de caracterização da conservação genotípica das raças indianas (*GH1 g.1047T>C*). Dois polimorfismos funcionais nunca antes estudados na raça Nelore (*POU1F1 c.577C>A* e *GHR g.257A>G*) e uma mutação que apesar de silenciosa já expressou segundo WATERS et al. (2010) associação com características de crescimento, inclusive altura, em bovinos da raça Holandesa (*GHR g.229T>C*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância das raças zebuínas na pecuária nacional.

A bovinocultura, especialmente a de corte, fez-se presente no Brasil desde o período colonial com raças taurinas (*Bos taurus taurus*) de origem portuguesa (Mértola, Alentejana, Arouquesa, Barrosã, Minhota e Mirandesa) que se tornaram às raças crioulas e, atualmente consideradas nativas (PRIMO, 2000). A introdução de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) ocorreu no mesmo período, devido ao domínio territorial de Portugal sobre regiões da África e Índia que tornava possível o intercâmbio entre produtos destes países com o Brasil (PARDI et al., 1996). As raças indianas encontraram aqui ambiente similar ao de seus países de origem, o que alavancou a multiplicação do plantel zebuino nas faixas tropicais brasileiras em um curto intervalo de tempo. Atualmente as raças zebuínas predominam no sistema de produção de corte, sendo que, sua adaptação ao clima tropical permitiu ao Brasil chegar ao maior rebanho comercial do mundo.

A localização da maior parte do território brasileiro em zona tropical e a predominância de sistemas de produção extensivos são fatores causadores de estresse que comprometem a adaptabilidade de muitas raças taurinas. CARVALHO et al. (1995) conduziram um experimento envolvendo zebuínos, taurinos da raça Simental importados e nativos oriundos de cruzamento absorvente com Nelore para avaliar o efeito fisiológico do estresse térmico em taurinos e zebuínos. Os animais foram submetidos a caminhadas de 7 km nas condições climáticas brasileiras, temperaturas entre 23 a 45°C e umidade relativa do ar de 60 a 65%. Os autores relataram a manifestação de sintomas de estresse térmico extremo nos animais importados, impossibilitando o término do percurso. Os taurinos nativos, embora capazes de completar o percurso, apresentaram taxas respiratórias e temperatura retal muito

superior às apresentadas por zebuínos, indicando a dificuldade de taurinos em dissipar calor corporal em ambiente tropical.

A utilização de raças não adaptadas a altas temperaturas torna-se inviável na zona climática tropical na qual está a maior parte do território brasileiro. Entre os principais efeitos do estresse térmico no metabolismo animal destaca-se a alteração na secreção hormonal. A redução da secreção de hormônios com funções biológicas associadas à produção de leite e carne consequentemente inibe a expressão do real potencial produtivo de um animal (MORAIS et al., 2008). As raças de origem indiana adaptam-se ao clima tropical por apresentarem epiderme altamente pigmentada combinada a pelos brancos ou claros na maioria das raças, combinação mais adequada para a resistência à radiação solar (SILVA et al., 2001).

Dentre as raças de origem indiana, a raça Nelore é a principal e mais numerosa na bovinocultura nacional, sendo a raça a qual se direciona a maioria dos programas de avaliação genética existentes no país. Essencialmente produtora de carne, a raça Nelore possui superioridades particulares em relação as demais raças zebuínas, como resistência natural a carrapatos (TEODORO et al, 2004), menor taxa de mortalidade pré desmame e vigor do bezerro (RILEY et al., 2001), além de baixa frequência de partos distócicos em situações de reprodução natural. Segundo ALENCAR et al. (1999) as fêmeas Nelore possivelmente possuam um mecanismo de expulsão do feto antes que esse se torne excessivamente grande e possa causar complicações no parto, hipótese esta levantada após constatarem períodos de gestação inversamente proporcionais ao peso dos bezerros.

Os principais objetivos de seleção adotados na bovinocultura de corte, sob o auxílio dos programas de avaliação genética, são os aumentos dos pesos e do ganho em peso, por sua ligação direta com o retorno financeiro. Segundo SAINZ et al. (2005), apesar da carcaça Nelore apresentar a composição dentro dos padrões de exigência considerados pelo mercado brasileiro, existem ainda grandes variações quantitativas e qualitativas nas carcaças produzidas por essa raça, mesmo dentro de rebanhos. Do ponto de vista do melhoramento genético, a existência de variabilidade para essas características evidencia a possibilidade de melhorias. O desafio em adequar a carcaça

bovina a padrões desejáveis pela indústria frigorífica caracteriza uma maneira, complementar aos ganhos em peso, de elevar a valorização da carcaça de bovinos Nelore através da seleção.

2.2. Rebanho da EEZS (Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho)

Em 1976 a Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho – (EEZS) teve a iniciativa de realizar um experimento de seleção com bovinos no Brasil, com o intuito de avaliar as respostas diretas à seleção para peso nas principais raças de interesse nos trópicos. Em 1980 foram estabelecidas no rebanho Nelore, as linhas Nelore seleção (NeS), Nelore Tradicional (NeT) nas quais seria realizado a seleção para maior peso corporal ao ano e sobreano, e a linha Nelore Controle (NeC) em que se aplicaria diferencial de seleção nulo para a mesma característica. As linhas NeS e NeT inicialmente diferiam pela idade das fêmeas utilizadas para a formação dos rebanhos, sendo que as do rebanho NeS eram mais jovens. Posteriormente somou-se às diferenças entre essas duas linhas o fato que eventualmente o rebanho NeT recebeu reprodutores pertencentes a outras linhas e também touros oriundos de rebanhos comerciais, enquanto a linha NeS, assim como a linha NeC, manteve-se fechada.

Os animais utilizados na formação dos rebanhos eram representativos do rebanho pertencente à EEZS registrados desde 1937 e das principais linhagens comerciais existentes na época. Maiores detalhes quanto a formação dos rebanhos estão descritos em RAZOOK et al. (1988). A preocupação com o coeficiente de endogamia, devido ao número limitado de animais por rebanho, levou ao cuidado de selecionar no máximo dois touros filhos de um mesmo reprodutor por estação de monta e manter touros em serviço por apenas duas estações (MERCADANTE et al., 2002). Segundo MERCADANTE & RAZOOK (2010), os coeficientes de endogamia apresentados nos rebanhos NeC e NeS, 4,0 e 4,3 respectivamente, não são considerados altos e evidenciam a eficiência do método de substituição de touros e definição de acasalamentos.

A estação de monta de três meses a qual os animais são submetidos visa à formação de grupos de contemporâneos que diminuam a interferência do ambiente. Os reprodutores a serem utilizados em cada linha de seleção são selecionados com base no peso padronizado para 378 dias de idade (P378), ao término da prova de ganho em peso, que se inicia após o desmame e termina depois de 168 dias, quando esses animais terão aproximadamente 12,5 meses de idade. As fêmeas são mantidas a pasto até a idade de 18 meses, quando são selecionadas pelo peso padronizado para 550 dias de idade (P550).

A manutenção do rebanho controle em um experimento de seleção melhora em precisão a análise de eficiência da seleção no melhoramento, uma vez que possibilita decompor melhor a mudança genética e as mudanças nas condições de ambiente (FALCONER & MACKAY, 1996). O experimento de seleção mantido até os dias atuais fornece oportunidade de monitoramento da resposta direta à seleção aplicada, assim como das respostas correlacionadas. Vários estudos realizados com animais da EEZS (RAZOOK et al., 1993; CYRILLO et al., 2000; MERCADANTE et al., 2004) usam as diferenças significativas ($P < 0,01$) das médias de P378 e P550 entre os rebanhos, como evidência da eficiência da seleção direta para peso e da diferença genética entre os rebanhos selecionados e o rebanho controle. A comparação entre as médias fenotípicas observadas no início do projeto de seleção e as médias fenotípicas observadas no ano de 2003 revelou a mudança fenotípica de -3Kg e 39Kg para o peso dos machos aos 378 dias no rebanho NeC e NeS respectivamente. Em fêmeas a mudança fenotípica observada para P550 na mesma ocasião foi de 21Kg e 71Kg nos rebanhos NeC e NeS (MERCADANTE & RAZOOK, 2010).

Embora o critério de seleção tenha se mantido o mesmo desde o início do programa, outras características, como peso em diferentes idades, eficiência reprodutiva e composição de carcaça têm sido mensuradas em todos os rebanhos desde 1985 para estudos de associação com as características de seleção direta. Existem estudos destacando como respostas correlacionadas positivas, os diferenciais secundários nas dimensões de várias regiões corporais e perímetro escrotal (CYRILLO et al., 2000); as taxas de crescimento durante o estágio de terminação, o peso dos

cortes no quarto traseiro e a força de cisalhamento (BONILHA et al., 2007); e o tamanho da carcaça, área de olho de lombo, peso de carcaça quente e fria (VITTORI et al., 2006; BONILHA et al., 2008). A seleção para maiores pesos não afetou as características reprodutivas das fêmeas, como dias para o parto, sucesso de parto e habilidade de permanência no rebanho até cinco anos de idade, indicando que a seleção para crescimento não teve como resposta correlacionada, efeitos deletérios no desempenho reprodutivo das fêmeas (MERCADANTE et al., 2003; MERCADANTE et al., 2004).

O efeito da seleção sobre a frequência alélica em um locus que afete uma característica é lento quando um número muito grande de loci influenciam o caráter e cada um deles tem pequeno efeito, tanto que, a estimação dos efeitos do locus sobre a característica pode ser negligenciado nesses casos, exceto para a seleção no longo prazo (RESENDE, 2008). O médio prazo ao qual o programa de seleção vem sendo mantido na EEZS, possibilita a avaliação das frequências destes polimorfismos em cada rebanho a análise de efeitos dos polimorfismos gênicos nas características selecionadas. Esta óptica tem motivado estudos de frequências alélicas e genotípicas entre os rebanhos na busca de marcadores moleculares para características de interesse econômico. AYRES et al. (2010) relataram diferenças significativas entre o rebanho NeT e os demais, quanto as frequências de um polimorfismo no gene *FABP4*, assim como diferenças nas frequências entre os rebanhos NeT e NeS para um polimorfismo no gene *TFAM*. SOUZA et al. (2010) descreveram diferenças significativas no NeC em relação aos rebanhos selecionados quanto a um polimorfismo no gene *DGAT1*. No entanto nenhum dos referidos autores encontrou associação destes polimorfismos com os pesos adotados como critério de seleção.

2.3. Marcadores genéticos

A utilização de marcadores genéticos em bovinos antecede a elucidação da estrutura da cadeia de DNA. Uma década antes de tal feito STORMONT & CUMLEY

(1943) já conseguiam identificar variações em antígenos eritrocitários por meio de reações de coagulação e estudar a segregação de cada fenótipo na população. Embora não fosse conhecido ainda o efeito dos genes sob tal variação, existia a inferência fundamentada em resultados científicos, quanto à molécula de DNA regendo a formação de proteínas e enzimas assim como as alterações em sua constituição. Ainda antes do desenvolvimento de técnicas de análise direta do DNA, as variações estruturais em proteínas analisadas por técnicas de eletroforese foram utilizadas como marcadores. A compreensão dos princípios de hereditariedade, aplicados aos estudos de herança das formas variantes de composição das proteínas, permitiu que estas fossem consideradas marcadores genéticos.

Desde a utilização das proteínas, até o uso de variações na própria cadeia de DNA como marcadores moleculares destacam-se, no contexto histórico, a elucidação da estrutura da cadeia de DNA feita por WATSON & CRICK (1953); o desenvolvimento de técnicas para identificar aminoácidos específicos na cadeia polipeptídica por volta de 1956; a identificação de três nucleotídeos compondo um códon e gerando um aminoácido (CRICK et al., 1961); e a decifra completa do código genético por volta de 1966. Tais descobertas tornaram possível associar os polimorfismos ao longo da molécula de DNA com variações nos produtos transcritos. Atualmente, existem vários métodos e tecnologias para a manipulação do DNA e identificação de mutações em sua extensão, sendo que a utilização de DNA confere vantagens em relação ao uso de proteínas, por serem mais informativos e estáveis.

As mutações existentes ao longo da molécula de DNA são oriundas de deleções, inserções ou substituições de bases que ocorreram em alguma fase na história evolutiva de uma população e passaram a segregar nesta população na forma de herança mendeliana, caracterizando-se como um marcador genético. É importante ressaltar essas mutações podem estar em uma região no DNA que não codifique uma proteína, ou ainda, estar em uma região codificante e não alterar o produto de transcrição devido à propriedade degenerada do código genético. Contudo, o levantamento destes polimorfismos em uma categoria animal, independente de sua localização, permite inferência quanto à variabilidade genética entre indivíduos ou raças

e tem aplicações úteis em muitos aspectos, como na caracterização populacional (OUBORG et al., 1999; FALEIRO, 2011).

Na pecuária, a utilização de marcadores possibilita além da caracterização populacional, a identificação de regiões gênicas com variantes deletérias ou associadas a enfermidades, teste de paternidade, rastreamento de produtos de origem animal e auxílio à seleção de progenitores com o método que recebe o nome de Seleção Assistida por Marcadores (MAS). Contudo, não existe até o momento um mapeamento preciso de quais são os pontos, do genoma bovino, associados a cada expressão fenotípica de interesse e que torne possível a utilização de informações moleculares como critério de seleção.

A seleção assistida por marcadores traz para os métodos convencionais de seleção, a possibilidade de ganhos genéticos com a identificação de animais geneticamente superiores em idades jovens, possibilidade de seleção em ambos os sexos em características limitadas a um sexo, antecipação na seleção para caracteres de difícil mensuração ou mensuração tardia, além de ser uma forma de elevar a acurácia de seleção. As características de baixa herdabilidade são mais susceptíveis ao aumento no ganho genético com introdução de informações moleculares que aquelas com herdabilidade alta, para as quais os métodos tradicionais já são altamente eficazes. A eficácia em aumentar o ganho genético com a utilização de marcadores moleculares é inversamente proporcional a dos métodos convencionais (DEKKERS, 2004).

A identificação de mutações que se associem a características cujos fenótipos observados apresentam segregação mendeliana caracteriza-se em um processo simples, uma vez que, a co-segregação entre fenótipo e marcador molecular pode ser analisada diretamente (FALEIRO et al., 2003). Esta abordagem pode ser utilizada para o mapeamento de mutações associadas à coloração da pelagem, diagnóstico e controle de doenças genéticas, presença ou ausência de chifres, ou seja, variáveis qualitativas. Em relação às variáveis quantitativas, os resultados do rastreamento genético serão proporções da variação fenotípica explicáveis pelo efeito de um marcador de forma isolada ou conjunta (FALEIRO et al., 2003). As regiões gênicas capazes de explicar

proporções na variação de características quantitativas recebem o nome de QTL. A dificuldade na identificação de um QTL reside no fato de que as características quantitativas são influenciadas por muitos loci de pequeno efeito e poucos locus de efeito pronunciado (HAYES & GODDARD, 2001).

O termo QTL equivale a uma associação estatística entre uma região do genoma e um caráter. A utilização de marcadores polimórficos nos cromossomos serve como uma forma de rastreamento dessas regiões baseado na ligação gênica entre o marcador e o QTL. A identificação de marcadores adjacentes permite estimar a posição e efeito de um QTL que esteja entre eles por análise da frequência de recombinação e é fundamental para a construção dos mapas de ligação (RESENDE, 2008). Segundo o mesmo autor, práticas mais modestas, com a utilização de apenas um marcador permitem a detecção de um QTL com métodos estatísticos simples, embora não possam determinar a posição do mesmo. Uma vez que um marcador esteja próximo o suficiente de um QTL para captar os seus efeitos sobre uma expressão e auxiliar na seleção, a sua utilização equivale em importância à utilização do próprio QTL.

A classificação de um marcador molecular quanto a sua forma de efeito sobre a variação de uma característica, discrimina os marcadores em duas categorias, marcadores diretos e marcadores indiretos. Um polimorfismo dentro de um gene e que sua mutação gere alteração no produto transcrito capaz de explicar diretamente uma mudança na expressão fenotípica, ou seja, um polimorfismo funcional seria o polimorfismo considerado como marcador direto. A utilização de marcadores diretos corresponderia ao estudo entre causa (QTL) e efeito (caráter). Os marcadores indiretos são aqueles para os quais é ignorada a possibilidade de serem eles causativos da variação fenotípica, mas que estejam em estreita associação com o QTL influente sobre tal variação (DEKKERS, 2004). Segundo DEKKERS & VAN DER WERF (2007) a utilização de um marcador direto confere vantagens em relação a marcadores indiretos pelo maior poder estatístico, ampla aplicabilidade e baixo custo. Porém, a comprovação de um polimorfismo como funcional não é tão comum para caracteres poligênicos como em caracteres influenciados por um único ou poucos genes (ANDERSSON, 2001).

Existem atualmente vários métodos para a identificação de mutações que acometem um locus, a escolha de qual deles utilizar é baseada, entre outros fatores, no objetivo de estudo, recursos financeiros e tecnológicos a disposição. Para a detecção de QTL, dois tipos de marcadores assumem especial importância, são os tipos microssatélites (*Short Tandem Repeats*) e os SNP (*Single-nucleotide polymorphism*), ambos codominantes e de aplicação simplificada.

Os microssatélites são sequências curtas e altamente repetitivas distribuídas por todo o genoma, onde o polimorfismo está no número de vezes que ocorre determinada repetição. Essa classe de marcador é multi-alélica, o que potencializa sua utilização em estudos de diversidade genética e testes de paternidade. Embora não corresponda a uma região codificante, essa classe de marcador foi por muito tempo a principal forma de detecção de QTL explorada no melhoramento animal, devido sua alta densidade e distribuição por todo o genoma.

Os SNPs equivalem à substituição de um único nucleotídeo em determinada posição na sequência de DNA, seja essa causada por uma transição ou transversão de pares de bases. Geralmente, um SNP é bi-alélico visto que a probabilidade de que uma segunda mutação ocorra em uma mesma posição é demasiadamente pequena, e mesmo sendo menos polimórfico que microssatélites, os SNPs são aplicáveis a mapeamento genético por serem extremamente frequentes. A utilização de SNPs confere a vantagem de que eles estão distribuídos por todo o genoma, inclusive dentro de genes com função biológica conhecida, os genes candidatos. De modo que os SNPs possam ser utilizados nas duas estratégias de mapeamento de QTL, genes candidatos e varreduras genômicas. Quando detectado dentro de um gene candidato, os SNPs podem ser causadores de uma mutação funcional ou, simplesmente, estarem próximos o suficiente destas para que sejam considerados indicadores fiéis do efeito do suposto QTL.

2.4. Genes candidatos na seleção assistida por marcadores (MAS)

A definição molecular de gene equivale a toda sequência de nucleotídeos transcrita a um DNA primário, incluindo exons, introns, regiões promotoras e de terminação (GUIMARÃES, 2012). A utilização de genes candidatos equivale a um polimorfismo em qualquer dessas regiões, independentes de ser codificante ou não. Os genes candidatos são genes já sequenciados, que codificam um produto de ação biológica conhecida e relacionada ao desenvolvimento e desempenho da característica objetivo de estudo. A amplificação de regiões dos genes candidatos permite a caracterização da sequência de nucleotídeos e a identificação de polimorfismos pontuais nesses segmentos.

A estratégia de utilização de genes candidatos pode deixar lacunas quanto a regiões gênicas a serem estudadas devido à incompreensão sobre a função metabólica de diversas substâncias no organismo animal. Todavia, enquanto permanece desconhecido o efeito de alguns genes sobre o desempenho animal, a utilização dos genes codificante de fatores biológicos de efeito importante no organismo equivale à forma mais provável de identificação de genes de efeito maior sobre características de interesse econômico.

Em bovinos os genes candidatos podem ser uma ferramenta de diagnóstico e, tentativa de mitigar, através da seleção, alelos associados a doenças hereditárias. A exemplo de doenças detectáveis com a utilização de genes candidatos podem ser citados a deficiência na adesão de leucócitos “BLAD”, resultante de um SNP no gene da *Beta Integrina-2 (ITGB2)*, que acomete a raça Holandesa (SHUSTER et al., 1992), e que hoje pode ser detectado por PCR-RFLP. Ainda na raça Holandesa a deficiência da uridina monofosfato sintetase (DUMPS) descrita por SCHWENGER et al. (1993). A glicogenólise generalizada “*Pompe’s disease*” descrita por JOLLY et al. (1977) e REICHMANN et al. (1994) nas raças Shorthorn e Brahman, respectivamente e que também pode ser identificada por PCR-RFLP no gene da *alfa-glicosidase ácida*.

Em bovinos voltados para a produção de leite, já foram descritos como genes supostamente portadores de QTL o *DGAT1*, que codifica uma enzima catalítica

responsável pela produção de triglicerídeos, em associação com a produção de leite e constituintes especialmente gordura (GRISART et al., 2002, KOMIZAREK et al., 2004); além dos genes que codificam as caseínas e globulinas, as principais proteínas do leite. Recentemente, o Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (PNMGL) passou a apresentar junto às DEPs de touros, os genótipos referentes à loci nos genes *Kappa-Caseína* e *Beta-lactoglobulina*, ambos associados à capacidade de coagulação do leite e rendimento queijeiro (VERNEQUE et al., 2010).

Quanto à bovinocultura de corte, podem ser destacados como marcadores em genes candidatos associados a características produtivas, os polimorfismos no gene da calpastatina que mostraram associação significativa com a maciez da carne medida pela força de cisalhamento (GREEN et al., 1994); polimorfismos no gene codificante da leptina que já foram associados com a deposição de músculos e espessura de gordura na carcaça de bovinos Nelore (FERRAZ et al., 2009); polimorfismos no gene que codifica a miostatina, uma proteína que controla o desenvolvimento muscular, sendo que mutações neste gene são responsáveis pelo desenvolvimento da dupla musculatura em bovinos Belgian Blue e Piemontês (GROBET et al., 1997). Genes que despertam o interesse pela sua possível funcionalidade como genes candidatos na produção de carne são os genes codificante de fatores relacionados ao eixo somatotrópico, como o hormônio do crescimento, o fator semelhante à insulina, o receptor do hormônio do crescimento, a própria somatostatina entre outros, devido a importante função desses fatores no crescimento e desenvolvimento do animal.

2.5. Genes candidatos do eixo somatotrópico

Os hormônios atuam no organismo como biossinalizadores, regulando ações biológicas que promovam o crescimento, desenvolvimento, reprodução e demais funções. Os hormônios hipofisários são sintetizados na glândula pituitária, sob a regulação de sinalizações neuroendócrinas que envolvem o hipotálamo (SAN & FROHMAN, 2008) e são reguladores da atividade de outras glândulas liberadoras de

hormônios associados ao metabolismo das células de um organismo, de certo modo os hormônios hipofisários são hormônios que estimulam a produção de outros hormônios em glândulas específicas.

O crescimento corporal em espécies animais ocorre pela hipertrofia e hiperplasia celular estimulada, entre outros fatores, pelo hormônio hipofisário somatotrópico, o GH. A regulação do crescimento pelo GH pode ocorrer pela ação direta deste hormônio sobre células primárias nas extremidades ósseas, gerando seu alongamento, ou por sua ação estimulante sobre glândulas secretoras da proteína IGF (*insulin-like growth factors* - fator de crescimento semelhante à insulina) que estimula o crescimento de células musculares. A secreção de IGF é regulada pelo efeito em cascata de sinalização ocasionada pela ligação do GH com o seu receptor GHR, na superfície celular.

O GH bovino é uma proteína composta de 190 ou 191 aminoácidos com a possível ausência de uma alanina em sua região N-terminal, devido ao processamento alternativo do precursor do GH (WALLIS, 1973). Sua expressão exerce influência sobre o crescimento propriamente dito, função galactopoiética, gliconeogênese, ativação da lipólise, incorporação de aminoácidos nas proteínas dos músculos e ainda, ativação de processos imunes envolvidos na resistência a doenças (UNANIAN et al., 2000).

Assim como qualquer proteína, o GH tem sua composição coordenada pela molécula de DNA que é transcrita a RNA e posteriormente traduzida à proteína. Existem algumas proteínas essenciais para a transcrição, denominadas fatores de transcrição, que se ligam ao DNA permitindo a atuação da enzima RNA polimerase em transcrever o DNA a mRNA. Os fatores de transcrição possuem homeodomínios que se ligam aos sítios específicos de DNA na região promotora dos genes alvo, controlando a transcrição. O fator de transcrição que atua no locus codificante do GH é o POU1F1, que atua também como fator de transcrição no gene da prolactina e tirotropina. Após sintetizado, o GH é liberado na corrente sanguínea e, para que expresse seus efeitos sobre as células alvo ele liga-se ao seu receptor específico na superfície de cada célula, o receptor do hormônio do crescimento (GHR). O GHR é uma proteína que apresenta

domínio citoplasmático, porção transmembrânica e domínio extracelular com sítio de ligação exclusivo ao hormônio do crescimento.

A proteína *POU1F1*, assim como a proteína *GHR* são tão importantes como o próprio GH no funcionamento correto das funções de crescimento no organismo, pois a deficiência ou falha em um desses componentes pode levar a redução nos níveis séricos de GH, afetar as funções por ele desempenhadas e comprometer o desenvolvimento animal, caracterizando três regiões interessantes de se explorar a existência de polimorfismos influentes sobre características produtivas.

O gene do hormônio do crescimento bovino *GH1* é composto por cinco exons e esta localizado no cromossomo 19 (HEDIGER et al., 1990), sua sequência completa de nucleotídeos foi publicada por GORDON et al. (1983) e desde então tem sido utilizada como base para a busca por polimorfismos. Dois dos polimorfismos do *GH1* destacam-se como os mais explorados em pesquisas de caracterização genética e estudos de associação, são eles, um polimorfismo no exon 5 que representa uma mutação funcional com a substituição de uma leucina por uma valina na proteína (ZHANG et al., 1992) e o polimorfismo *g.1047T>C* dentro do intron 3 (ZHANG et al., 1993) que caracteriza-se por sua proporção alélica oposta nas sub-espécies zebuína e taurina.

O polimorfismo *g.1047T>C* no intron 3 do gene *GH1* ocorre devido a inversão de uma timina por uma citosina, criando um sítio de restrição específico da enzima *MspI* (LAGZIEL et al., 2000) e tem sido amplamente estudado, principalmente em raças taurinas, quanto a seus efeitos sobre a produção de leite e constituintes (YAO et al., 1996; ZHOU et al., 2005; KATOH et al., 2008) e, em frequências mais modestas este marcador tem sido utilizado também em estudos de associação com característica importantes para a bovinocultura de corte (UNANIAN et al., 2000; DI STASIO et al., 2003).

Da mesma maneira que *GH1*, o gene *POU1F1* também tem sido foco de pesquisa na busca por polimorfismos em bovinos. Este gene é considerado um locus altamente conservado entre espécies como humanos, chimpanzés, bovinos, ovinos e cães, e encontra-se no cromossomo 1 em bovinos (WOOLLARD et al., 2000). Embora seja um gene conservado entre espécies, existem alguns polimorfismos particularmente

descritos em espécies bovinas que representem potenciais marcadores. CARRIJO et al. (2008) observaram o efeito de uma mutação silenciosa no exon 6 de *POU1F1* em uma linhagem Canchim sobre os ganhos de peso do nascimento ao desmame e no peso ao desmame. SILVA et al. (2006) também descreveram esse mesmo polimorfismo como influente sobre o crescimento, peso em diferentes idades e ganho de peso do nascimento aos 60 dias em cruzamentos de Gir e Holandês. HUANG et al. (2008) sequenciaram os 6 exons do gene *POU1F1* em bovinos da raça Holandesa integrantes do programa de melhoramento da raça vinculado ao USDA, embora não tenham encontrado nenhum polimorfismo no exon 6, esses autores detectaram um polimorfismo no exon 2 e três polimorfismos no exon 3, sendo que um dos polimorfismos no exon 3, o *c.577C>A* era causador da substituição de uma prolina por uma histidina, enquanto todos os outros eram silenciosos e estavam em desequilíbrio de ligação completo. A mutação funcional *c.577C>A* descrita por HUANG et al. (2008), no exon 3 mostrou-se associada com rendimento de leite e longevidade das fêmeas.

O receptor específico do GH, codificado pelo gene *GHR*, tem importância equivalente ao próprio GH no desempenho de suas funções biológicas, por permitir a conexão entre o hormônio do crescimento e suas células alvo, assim uma mutação em sua sequência pode afetar a produção de leite e carne em bovinos (DI STASIO et al., 2005). O gene *GHR* apresenta algumas variações descritas em raças bovinas na sua região promotora (GE et al., 1999), e no exon 10 (GE et al., 2000; DI STASIO et al., 2005). Ge et al. (2000) identificaram, em bovinos da raça Angus, quatro polimorfismos no exon 10, codificante do domínio citoplasmático da proteína, nas posições 76, 200, 229 e 257, sendo que os polimorfismos *g.200A>G* e *g.257A>G*, geravam a substituição de aminoácidos na proteína. DI STASIO et al. (2005) desenvolveram um par de *primers* baseando-se na sequência descrita pelos primeiros autores que abrangesse os dois polimorfismos funcionais, no entanto só encontraram o polimorfismo na posição 257 em bovinos Piemontês, e assim mesmo, sem grandes associações com características de crescimento e carcaça. O fato de ser um polimorfismo funcional já detectado em duas raças diferentes intriga a busca por esse polimorfismo em outras raças.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar a existência dos polimorfismos *GH1 g.1047T>C*, *POU1F1 c.577C>A*, *GHR g.229T>C* e *GHR g.257A>G* em bovinos Nelore e avaliar a associação destes polimorfismos com características de crescimento e características de carcaça obtidas por ultrassonografia, no intuito de obter marcadores moleculares úteis na seleção de animais geneticamente superiores.

3.1. Objetivos específicos

Verificar a existência dos polimorfismos *GH1 g.1047T>C*, *POU1F1 c.577C>A*, *GHR g.229T>C* e *GHR g.257A>G* com a técnica PCR-RFLP nos bovinos Nelore pertencentes ao programa de seleção da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho-SP;

Comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os rebanhos selecionados para maiores pesos e o rebanho controle, para avaliar os efeitos da seleção sobre as frequências alélicas e genotípicas atuais;

Analisar a associação dos polimorfismos com as características peso corporal ao nascimento (PN), peso corporal ao desmame (P210) padronizada para 210 dias, peso corporal de machos ao ano (P378) padronizado para 378 dias, peso corporal de fêmeas ao sobreano (P550) padronizado para 550 dias, altura na garupa na idade de seleção de machos (A378), altura na garupa na idade de seleção de fêmeas (A550), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e espessura de gordura da garupa (EGG).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para o presente trabalho foram utilizadas amostras de sangue periférico e registros fenotípicos de 645 bovinos da raça Nelore, integrantes do programa de seleção mantido desde 1980 pela Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho (EEZS) unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizada ao norte do estado de São Paulo, Brasil. A utilização dos animais nesse estudo atendeu as diretrizes quanto aos cuidados animais na condução de um experimento, proposta na constituição do Estado de São Paulo (Brasil), na forma da lei número 11.977.

Os animais incluídos neste experimento correspondem a 156 machos e 489 fêmeas, nascidos entre 2003 e 2009 e criados sob as mesmas condições de manejo na EEZS. Estes animais são pertencentes a dois rebanhos selecionados para maior peso corporal, Nelore Seleção (NeS) e Nelore Tradicional (NeT), e um rebanho no qual se aplica diferencial de seleção nulo para a mesma característica, Nelore Controle (NeC). O critério de seleção aplicado aos reprodutores desde o estabelecimento do experimento foi sempre o peso corporal ao ano, padronizado para 378 dias de idade (P378), sendo as pesagens realizadas logo ao término da prova de ganho em peso, da qual todos os machos participam, enquanto o critério de seleção de fêmeas são os pesos corporais padronizados para 550 dias de idade (P550), idade até as quais elas são mantidas a pasto.

Entre os 645 animais genotipados neste estudo para os polimorfismos *GH g.1047T>C*, *POU1F1 c.577C>A*, *GHR g.257A>G*, 105 pertencem ao rebanho NeC, 192 ao rebanho NeS e 348 ao rebanho NeT. A genotipagem para o marcador *GHR g.229T>C* foi feita com apenas 322 animais, 68 pertencentes ao NeC, 116 ao NeS e 138 ao rebanho NeT, sendo 105 machos e 217 fêmeas.

4.2. Características avaliadas

As características sobre as quais, o efeito dos marcadores moleculares foi avaliado, foram pesos corporais em diferentes idades, altura na garupa nas datas de pesagem para seleção e algumas características de composição de carcaça medidas por ultrassonografia. Todas as aferições fenotípicas, assim como a colheita de sangue, foram realizadas pela equipe de apoio e funcionários da própria EEZS.

Os pesos corporais utilizados neste estudo foram o peso corporal ao nascimento (PN) e o peso corporal ao desmame, padronizado para 210 dias de idade (P210), medidos em ambos os sexos; os pesos nas datas de seleção, sendo P378 medido apenas em machos e P550 medido apenas em fêmeas. A altura na garupa foi medida na mesma data da pesagem de seleção em ambos os sexos sendo o banco de dados constituído por altura de machos ao ano (A378) e altura de fêmeas ao sobreano (A550). As características, espessura de gordura subcutânea (EGS), espessura de gordura na garupa (EGG) e área de olho de lombo (AOL), constituem as características de composição de carcaça e foram medidas em idades entre 500 e 600 dias em machos e fêmeas.

Para aferição das características AOL e EGS foram utilizadas imagens de ultrassonografia tomadas entre a 12^o e a 13^o costelas, transversalmente sobre o músculo *Longissimus dorsi*. Enquanto para medir EGG foram obtidas imagens tomadas na intersecção dos músculos *Gluteus medius* e *Biceps femoris*, localizados entre o ílio e ísquio. Dois tipos de equipamentos foram circunstancialmente utilizados: Aloka 500V com sonda linear de 17,5cm de 3,5 MHz (transducer – Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan) e Pie Medical 401347 com sonda linear de 18cm de 3,5 MHz. Para colheita das imagens, foi utilizado óleo vegetal e um acoplante (standoff) para garantir o contato acústico entre a sonda linear e o corpo do animal. As imagens foram gravadas e, posteriormente, interpretadas em *software* Echo Image Viewer 1.0 (Pie Medical Equipament B.V.,1996).

4.3. Análises laboratoriais

4.3.1. *Extração de DNA genômico*

Para a extração do DNA foram colhidos 5 ml de sangue de cada animal por punção da veia jugular em tubos de vacutainer contendo 7,5 mg de EDTA, os quais foram armazenados sob refrigeração até o momento da extração. A extração de DNA genômico, assim como a maior parte das análises laboratoriais, foi realizada no Laboratório de Genética e Citogenética “Marcos Antonio Giannoni”, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

O DNA genômico foi extraído seguindo-se o protocolo descrito por ZADWORNY & KUHNLEIN (1990) (Apêndice A). Após a extração, foi realizada análise da concentração e pureza do DNA por amostra, a partir da leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, EUA, 2008). A espectrofotometria baseia-se na densidade óptica para a quantificação de DNA e proteína, o DNA tem picos de absorbância no comprimento de onda de 260 nm e a proteína 280 nm, sendo as ultimas possíveis contaminantes. As amostras com concentrações acima de 100ng/μL e relação DO260/DO280 entre 1,8 e 2,0 foram consideradas adequadas ao uso para PCR. Para as amostras que não atendiam a esses critérios realizaram-se novo processo de extração de DNA. Depois de quantificado o DNA de cada amostra foi diluído em solução TBE 1X (10 mM de Tris-HCl pH 7,6, 1 mM de EDTA pH 8,0 e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) para a concentração de 100ng/μL.

4.3.2. *Amplificação do DNA por reações de PCR*

Os fragmentos analisados neste estudo estão localizados no intron 3, exon 3 e exon 10 dos genes *GH*, *POU1F1* e *GHR*, respectivamente. O comprimento dos fragmentos amplificados de cada gene está apresentado na Tabela 1, junto à sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) utilizados na PCR. A temperatura ótima de

pareamento para cada par de *primers*, neste estudo, foi identificada com a realização de uma PCR gradiente incluindo oito diferentes temperaturas próximas às especificações de T-melting de cada *primer*.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do *GH*, *POU1F1* e *GHR*.

Genes	Comprimento do Fragmento	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>)	Temperatura de pareamento (° C)
<i>GH1</i> ¹	329pb	F 5'-CCCACGGGCAAGAATGAGGC-3' R 5'-TGAGGAACTGCAGGGGCCCA-3'	62,5
<i>POU1F1</i> ²	234pb	F 5'-CAAATGGTCCTTTTCTTGTTGTTACAGGGAGCTTAAGGC-3' R 5'-CTTTAACTCATTGGCAAACCTTTC-3'	57,2
<i>GHR</i> ³	342pb	F 5'-GCTAACTTCATCGTGGACAAC-3' R 5'-CTATGGCATGATTTTGTTTCAG-3'	52,2

F: *Foward*, R: *Reverse*, ¹ MITRA et al. (1995), ² HUANG et al. (2008) ³ DI STASIO et al. (2005)

O *primer forward* utilizado para amplificar o fragmento de *POU1F1* não equivale a uma fita completamente complementar ao segmento gênico, devido à utilização de dois Gs, quando deveriam ser dois Cs, no segundo e terceiro nucleotídeo 3' para que fosse criado o sítio específico a enzima de restrição *StuI* (5'...AGG↓CCT...3'). A Figura 1 apresenta esquematicamente a posição nos genes em que ocorreu o pareamento de cada par de *primer* e o perfil esperado nos fragmentos amplificados.

As reações de PCR foram realizadas utilizando 100ng de DNA genômico (1µL), 1,5 µL de cada *primer* (15 pM), 7,5µL de GoTaq Green Master Mix (Promega) e água (*nuclease free*) para volume final de 15 µL. Utilizou-se para a execução dos ciclos da PCR o termociclador de gradiente C-1000 (Biorad, Hercules, CA, USA), sendo que a reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minuto, seguida por 30 ciclos consecutivos de, desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento com temperatura específica de cada *primer* por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 5 minutos.

Uma alíquota de 2 µL de cada produto de PCR foi misturada a 2 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) com gelred (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, em cubas com tampão TBE 1X a

100V por 65 minutos, a fim de checar o sucesso na amplificação do fragmento desejado. A visualização dos amplicons foi feita em luz UV e o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad).

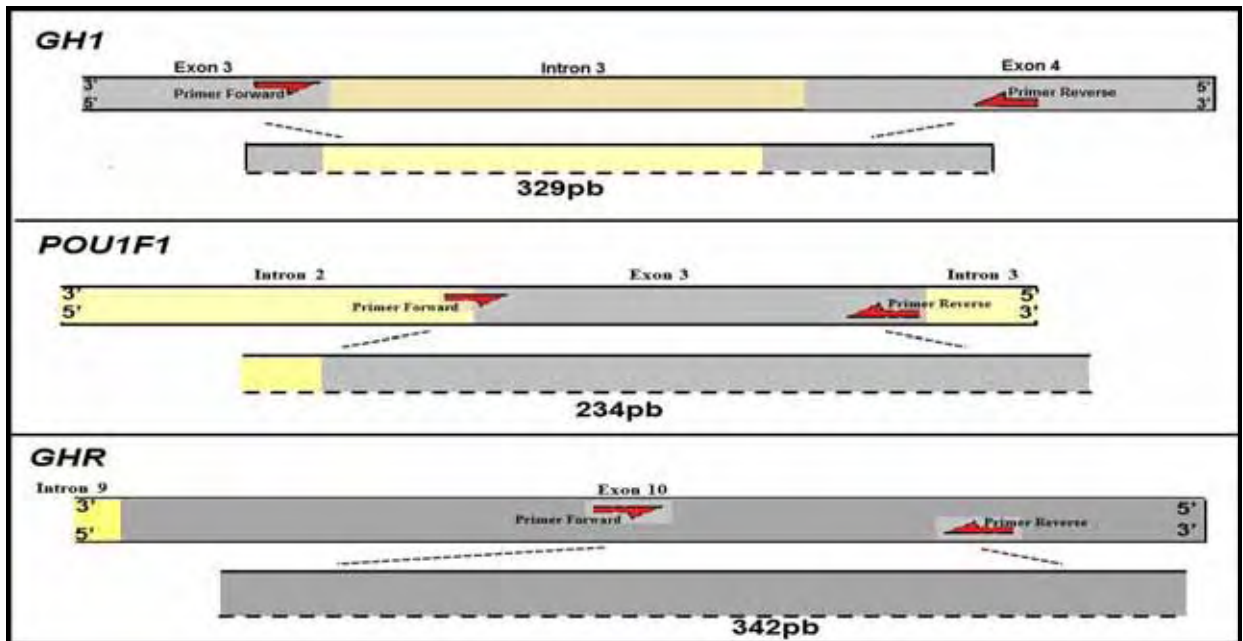


Figura 1. Representação esquemática da posição dos fragmentos amplificados nos genes GH1, GHR e POU1F1.

4.3.2. Genotipagem

Inicialmente foram genotipados o polimorfismo *GH1* *g.1047T>C* descrito por MITRA et al. (1995), o polimorfismo *POU1F1* *c.577C>A* descrito por HUANG et al. (2008) e o polimorfismo *GHR* *g.257A>G* descrito por GE et al. (2003). A genotipagem foi feita pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismos de Comprimento de Fragmento). A endonuclease *MspI* foi utilizada para a genotipagem do SNP *GH1* *g.1047T>C*, *StuI* para a genotipagem do SNP *POU1F1* *c.577C>A* e *AluI* para o SNP *GHR* *g.257A>G*. Após sequenciamento e identificação do polimorfismo *GHR* *g.229T>C*, utilizou-se a ferramenta NEBcutter 2.0 disponível no site da BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) para a escolha da enzima *BmgBI*, capaz

de identificar este polimorfismo. A Tabela 2 apresenta a nomenclatura e posicionamento dos SNPs detectados por cada enzima de restrição.

Para os ensaios de PCR-RFLP fez-se uso de 5 µL do produto de PCR, tampão de reação na concentração de 1X, 5U de enzima de restrição, e água miliQ para um volume final de 15 µL. A solução foi incubada à 37°C por duas horas. Os produtos da digestão com a enzima de restrição foram misturados ao tampão de corrida com Gel Red e separados por eletroforese em géis de agarose a 3%, utilizando como padrão paramétrico o DNA ladder 100pb (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada). Após a corrida, os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados para identificação dos genótipos.

Tabela 2. Nomenclatura sistemática dos SNPs nos genes *GH1*, *GHR* e *POU1F1* e seus respectivos efeitos.

Nome do SNP	Enzima de restrição	Gene (localização)	Sequência de referência (Genbank)	Efeito
<i>g.1047T>C</i>	<i>MspI</i>	<i>GH1</i> (intron 3)	EF592534	-
<i>c.577C>A</i>	<i>StuI</i>	<i>POU1F1</i> (exon 3)	NM174579	p.Pro76His
<i>g.229T>C</i> <i>g.257A>G</i>	<i>BmgBI</i> <i>AluI</i>	<i>GHR</i> (exon 10)	AF140284	p.His545 p.Ser555Gly

g. - Sequência de referência - DNA genômico; c. - sequência de referência - região codificante do DNA ; p.Pro76his: substituição de uma prolina por uma histidina na proteína; p.His545: mutação silenciosa; p.Ser555Gly: substituição de uma serina por uma glicina na proteína

4.3.3. Sequenciamento

Para os genes que apresentaram diferentes padrões de migração em géis de agarose 3%, duas amostras de cada padrão genotípico encontrado foram enviadas para sequenciamento, a fim de confirmar os resultados de genotipagem obtidos por RFLP, confirmar o tamanho exato dos fragmentos e avaliar qual seria a substituição de base recorrente. Para os fragmentos que apresentaram monomorfismo, quatorze amostras escolhidas aleatoriamente entre os rebanhos NeC e NeS foram enviadas para o sequenciamento, a fim de avaliar se existiam dentro dos fragmentos amplificados qualquer outro polimorfismo. O sequenciamento foi um serviço terceirizado ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) no departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP.

As amostras de DNA a serem sequenciadas, foram submetidas a uma nova amplificação por PCR para volume final de 45 µL, mantendo-se as mesmas proporções de enzima, água, *primers* e DNA da primeira PCR, no entanto desta vez fez-se o uso de uma enzima GoTaq Colorless Master Mix. Depois da PCR os produtos amplificados foram purificados, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA.

O produto de PCR foi sequenciado a partir dos dois *primers* (*forward* e *reverse*) utilizando a técnica de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977) com o ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram visualizadas com o programa CodonCode Aligner, disponível no site (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>).

4.4. Frequências gênicas e genotípicas

Com os genótipos identificados por ensaio de PCR-RFLP, as frequências alélicas e genotípicas em cada rebanho foram verificadas por contagem simples conforme o procedimento descrito por WEIR (1990). Segundo as equações descritas abaixo:

Frequências gênicas

$$p = \frac{2N_{TT} + N_{CT}}{2N}$$

$$q = \frac{2N_{CC} + N_{CT}}{2N}$$

Frequências genotípicas

$$f(CC) = \frac{N_{CC}}{N}$$

$$f(CT) = \frac{N_{CT}}{N}$$

$$f(TT) = \frac{N_{TT}}{N}$$

Em que:

N = Número total de animais da amostra

N_{CC} = Número de animais de genótipo CC

N_{TT} = Número de animais de genótipo TT

N_{CT} = Número de animais de genótipo CT

p = Frequência do alelo T

q = Frequência do alelo C

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada sítio foi avaliado por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 5% ($P < 0,05$). O teste de Fisher foi aplicado para comparar as frequências gênicas entre as três linhas de seleção, usando o módulo de diferenciação entre populações do programa Genepop, versão 3.4, disponível em (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

4.5. Análises de associação

As análises de associação entre polimorfismo e registros fenotípicos foram feitas utilizando modelos mistos através do método REML disponível no procedimento “PROC MIXED”, do SAS 9.1.3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Inicialmente foi considerado um modelo com o efeito de apenas um marcador. Que pode ser descrito como:

$$Y_{ijklmno} = \mu + G_i + M_j + S_k + N_l + T_m + V_n + I_o + e_{ijklmno}$$

em que $Y_{ijklmno}$ é a informação fenotípica do $ijklmn^{\text{ésimo}}$ animal; μ é a média da característica, G_i é o efeito fixo associado ao $i^{\text{ésimo}}$ grupo de contemporâneo; M_j é o efeito fixo associado ao $j^{\text{ésimo}}$ genótipo de cada marcador; S_k é o efeito fixo do sexo do animal; N_l é o efeito fixo associado ao $l^{\text{ésimo}}$ mês de nascimento (setembro, outubro, novembro, dezembro); T_m é o efeito aleatório do $m^{\text{ésimo}}$ touro; V_n é o efeito linear da covariável idade da vaca ao parto; I_o é o efeito linear da covariável idade do animal na data da medida; e $e_{ijklmno}$ é o erro aleatório associado com a $ijklmno^{\text{ésima}}$ observação.

Posteriormente foram incluídos em um segundo modelo, similar ao primeiro, o efeito fixo dos dois marcadores simultaneamente e o efeito da interação entre eles. Para o segundo modelo foram eliminados da análise os animais de genótipos desconhecidos para qualquer um dos dois marcadores estudados.

Os marcadores avaliados quanto ao efeito sobre expressão fenotípica foram o *GH1 g.1047T>C* e *GHR g.229T>C*. A formação dos grupos de contemporâneos levou em conta o ano de nascimento e rebanho. Como existiam animais que não apresentavam registros fenotípicos para algumas das características ou o genótipo era desconhecido para um dos marcadores, houve redução no número de grupos de contemporâneos e de touros relacionados nas análises de associação em algumas situações (Apêndice B). A idade do animal como covariável (efeito linear) não foi considerado no modelo para as características de crescimento. O sexo do animal como efeito fixo não foi considerado no modelo para as características P378, P550, A378 e A550.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação de DNA por PCR

A extração de DNA resultou em material de boa qualidade e quantidade, possibilitando a utilização com sucesso das 645 amostras na continuação do experimento. Os ensaios de PCR amplificaram fragmentos dos genes *GH1*, *POU1F1* e *GHR* que puderam ser visualizados em gel de agarose a 2 % (Figura 2). O tamanho das bandas visualizadas em gel, medido pelo padrão DNA marcador ladder 100pb apresentam-se em conformidade com os comprimentos esperados em relação aos *primers* escolhidos.

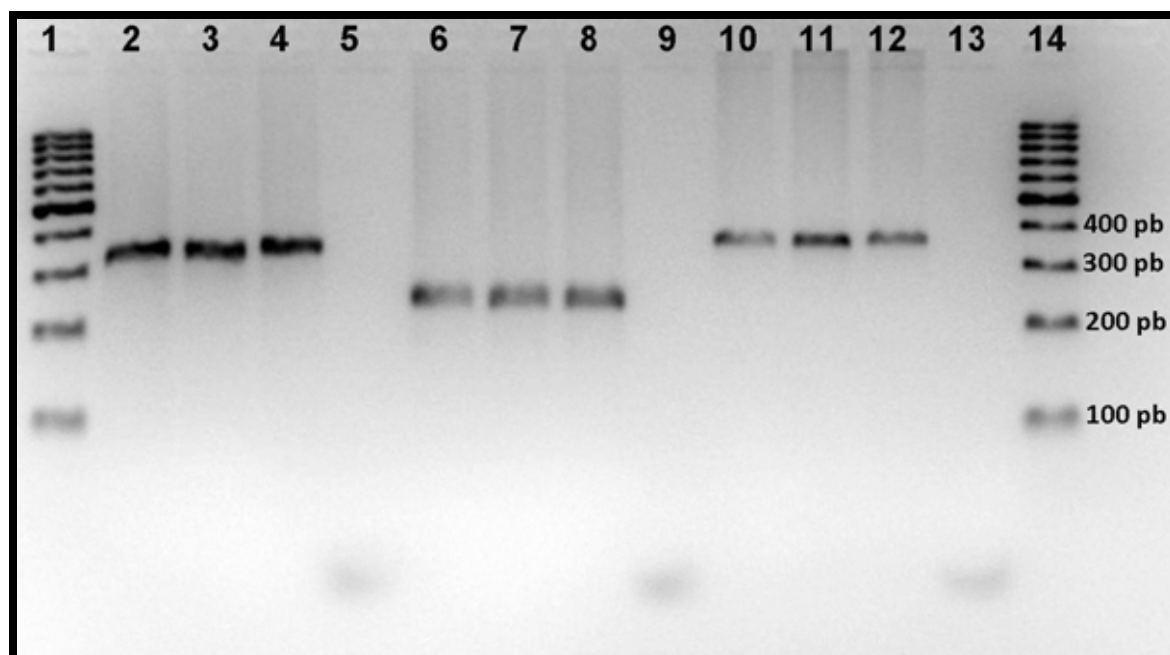


Figura 2. Produto de PCR visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2%. Canaletas 1 e 14 - DNA marcador Ladder 100pb; 2-3-4 - Amplicon do *GH1*; 6-7-8 - Amplicon do *POU1F1*; 10-11-12 - Amplicon do *GHR*; 5-9-13 - Controle negativo.

5.2 Genotipagem de SNPs na população por PCR-RFLP

A digestão do produto de PCR de *GH1* com a enzima *MspI* revelou três diferentes padrões de migração no gel de agarose e tornou possível a identificação de três genótipos. O tamanho dos fragmentos após a digestão, mensurados com o parâmetro do DNA marcador ladder de 100pb, apresentou-se em conformidade com os comprimentos citados na literatura que descrevem uma banda de 329pb equivalente ao produto original da PCR, uma banda com 224pb e outra com 105pb. Sendo que um homozigoto, CC, apresenta as bandas com 224pb e 105pb, o outro homozigoto, TT, apresenta somente a banda com 329pb, enquanto o heterozigoto combina as três bandas (Figura 3).

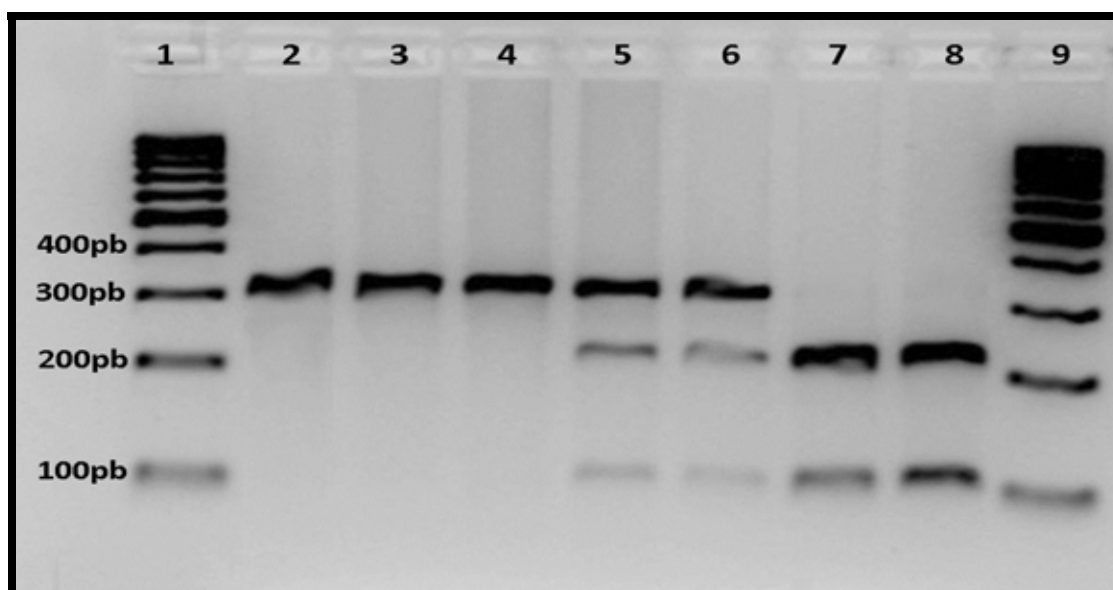


Figura 3. Padrões de migração do fragmento de *GH1* digerido com *MspI*. Canaletas 1 e 9 - DNA marcador Ladder 100pb; 2, 3 e 4 - genótipo TT; 5 e 6 - genótipo TC; 7 e 8 genótipo CC.

O fragmento do gene *POU1F1* não apresentou diferentes padrões de migração em gel, após a digestão com a enzima *StuI*. O único padrão de migração observado nos animais desta população representa o genótipo CC do marcador *POU1F1*.

c.577C>A. A fixação do alelo C fez que todas as amostras digeridas fossem clivadas pela enzima *StuI* neste sítio. O tamanho da banda observada em gel encontra-se próximo ao esperado para o alelo C que seria uma banda de tamanho 197pb e uma de 37pb, de modo que a banda com 37pb não pode ser visualizada no gel de agarose a 3%. O fragmento do gene *GHR* também não apresentou variação no padrão de migração em gel após digestão com a enzima *AluI*, sendo que todas as amostras submetidas a digestão apresentaram um padrão de migração com três bandas no gel de agarose correspondente ao genótipo AA do marcador *GHR g.257A>G*. As bandas visualizadas após digestão deste fragmento com a enzima *AluI* apresentam os tamanhos correspondentes aos descritos na literatura com uma banda de 191pb, uma banda com 101pb e outra com 50pb. Os padrões de migração pós digestão dos fragmentos nos genes *POU1F1* e *GHR* estão apresentados na Figura 4.

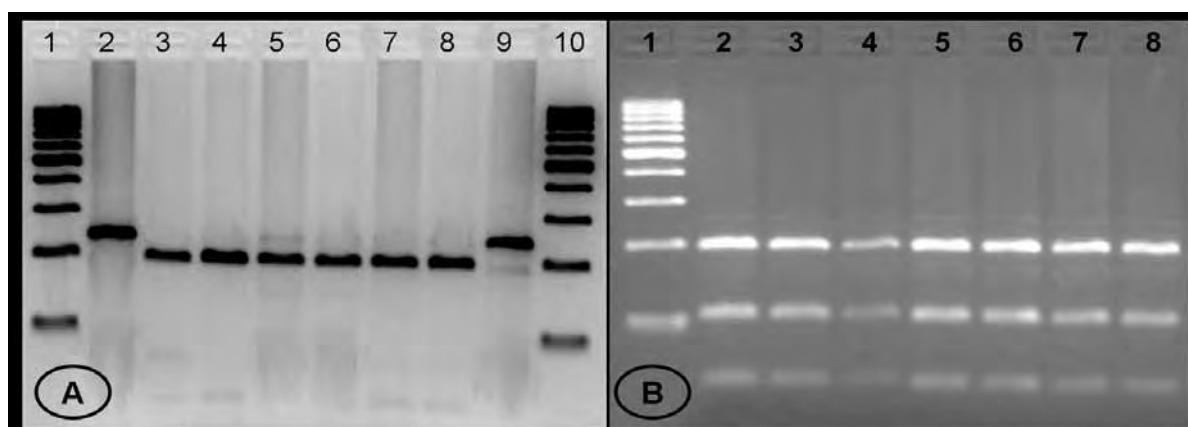


Figura 4. Lado A: Padrão de migração de *POU1F1* após digestão com *StuI*. Canaletas 1 e 10 marcador ladder 100pb; 2 e 9 Produto de PCR original; 3 a 8 genótipo CC. Lado B: Padrão de migração encontrado para *GHR* após digestão com *AluI*, genótipo AA.

O resultado do sequenciamento revelou que todos os fragmentos amplificados por PCR, assim como as bandas geradas após a digestão tinham tamanhos concordantes com os comprimentos descritos nos trabalhos de onde foram retirados os *primers*, demonstrando a inexistência de inserções ou deleções nesta população. No fragmento do gene *GH1* observou-se com o resultado do sequenciamento, que a

sequência de nucleotídeos intron 3 é similar em toda a sua extensão, com sequências previamente depositadas no GenBank, correspondente a outras raças. O SNP *g.1047T>C* foi a única mutação detectada dentro do fragmento de *GH1* nesta população. O fragmento do gene *POU1F1* além de apresentar similaridade com sequências previamente depositadas no GenBank, mostrou-se integralmente monomórfico na amostra sequenciadas. Em contrapartida, o gene *GHR* que não apresentou o SNP *g.257A>G* quando digerido com a enzima *AluI*, revelou com o sequenciamento um polimorfismo em outro sítio, denominado *GHRg.229T>C* (Figura 5).

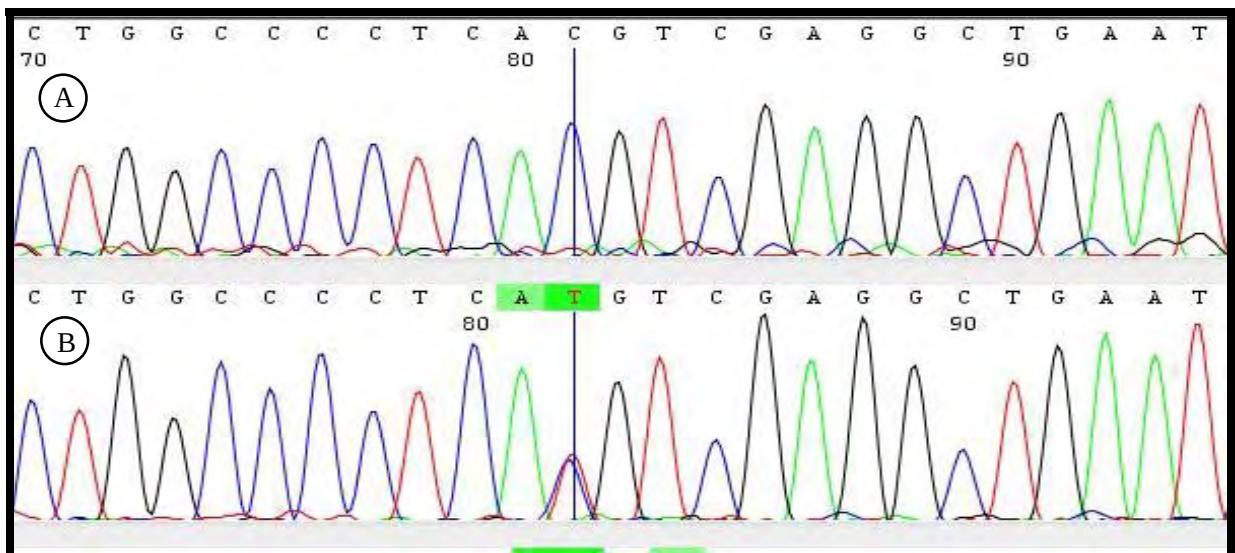


Figura 5: Cromatograma do sequenciamento do fragmento de GHR visualizado com o programa CodonCode Aligner. A- indivíduo CC; B - indivíduo CT (dois picos).

O SNP *g.229T>C* encontra-se dentro do sítio de restrição da enzima *BmgBI*. A digestão do fragmento de *GHR* com esta enzima permitiu a identificar o genótipo TT que corresponde a uma banda de 342pb, equivalente ao produto de PCR original e, o genótipo CT que corresponde à banda com 342pb e outras duas bandas, uma com 270pb e uma com 72pb (Figura 6). O genótipo CC correspondente ao padrão de migração com as bandas de 270pb e com 72pb não foi encontrado na população.

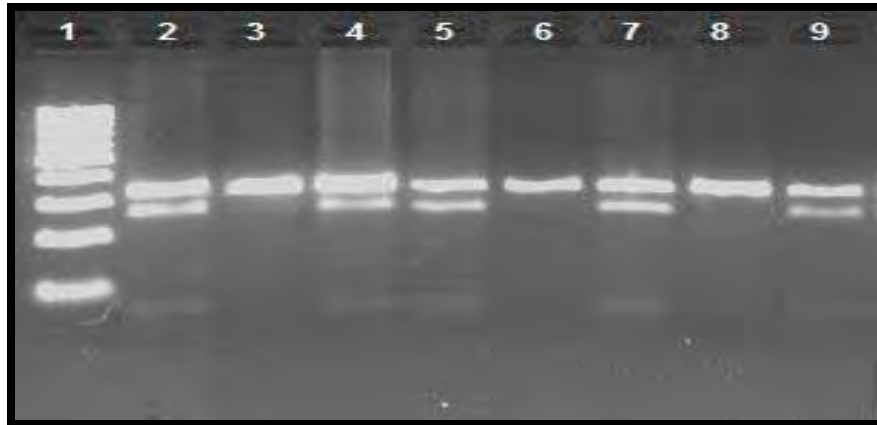


Figura 6. Padrão de migração do fragmento *GHR* após digestão com *BmgBI*. Canaletas 1- marcador ladder 100pb; 2,4,7 e 9 – genótipo CT; 3, 6 e 8 genótipos TT.

Os diferentes padrões de migração observados com a digestão do fragmento do gene *GH1* ocorrem devido ao SNP *GH g.1047T>C* dentro do sítio de restrição da enzima *MspI* (...C↓CGG...) nos animais desta população. Embora MITRA et al. (1995) tenham descrito duas possíveis formas de variação próximas ao sítio de restrição *MspI*, entre os animais utilizados para o sequenciamento no presente estudo foi encontrado apenas a substituição de uma timina por uma citosina no nucleotídeo de posição 73 do intron 3. Sendo assim, tratou-se aqui por T e C os alelos originalmente nomeados, pelos referidos autores, como *Msp(-)* e *Msp(+)*, respectivamente.

Em relação ao exon 3 do gene *POU1F1*, o SNP *c.577C>A* foi relatado por HUANG et al. (2008) dentro do sítio de restrição específico da enzima *StuI* (...AGG↓CCT...). O alelo A, que não foi encontrado no presente estudo, corresponde a um fragmento que perderia este sítio de restrição de *StuI*, devido a substituição de uma citosina por uma adenina, e apresentaria o tamanho original do produto de PCR após ser digerido com esta enzima. Embora os mesmos autores tenham relatado a existência de outros dois polimorfismos no mesmo fragmento, assim como o SNP *c.577C>T*, nenhum deles foi encontrado entre os animais sequenciados.

O fragmento do exon 10 do gene *GHR*, não apresentou o SNP *g.257A>G* descrito por DI STASIO (2005), sendo que a enzima *AluI* encontrou por duas vezes o seu sítio de restrição (...AG↓CT...) neste fragmento, a mutação descrita por estes

autores ocasionaria a perda de um dos sítios de restrição e identificação do alelo G com uma banda de 191pb e outra com 151pb. O SNP *g.229T>C* encontrado no mesmo fragmento de *GHR* não determina uma substituição de aminoácido na proteína, nos dois casos o aminoácido transcrito é uma histidina. Apesar deste polimorfismo não ter sido encontrado nos estudos de onde foram copiados os *primers*, GE et al. (2000) já havia o descrito em bovinos da raça Angus, sendo que a enzima de restrição utilizada para PCR-RFLP por esses autores foi a *NlaIII*. Por questões de disponibilidade do produto no mercado fez-se no presente estudo a escolha da enzima *BmgBI*, capaz de detectar a mesma mutação. O SNP *GHR g.229T>C* ocasiona a perda do sítio de restrição da enzima *BmgBI* (...CAC↓GTC...), de modo que animais que apresentam a substituição de uma citosina em sua sequência não são clivados durante a digestão com *BmgBI*.

As sequências de nucleotídeos nos genes *GH*, *GHR* e *POU1F1* reveladas por sequenciamento, assim como os polimorfismos aqui descritos, foram submetidos ao NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov) e catalogadas com os números de acesso JQ966993, JX112702 e JQ944796, respectivamente.

5.3. Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas para os marcadores polimórficos estão descritas por rebanho na Tabela 3.

O marcador *GH1 g.1047T>C* apesar de aparentemente não ter uma boa distribuição, com baixas frequências para o genótipo CC, mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três rebanhos pelo teste de exato de probabilidade em nível de 5%. O genótipo TT foi o que apresentou maior frequência na população e em cada rebanho. O teste exato de Fisher mostrou diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas entre os rebanhos NeS e NeT em nível de 5%. O rebanho NeC não apresentou diferenças de frequências com nenhum dos demais rebanhos, que fossem significativas no mesmo nível de significância.

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas dos marcadores estudados na raça Nelore nas três linhas de seleção para crescimento.

Marcador / linha	Frequências Genotípicas			Frequências alélicas	
<i>GH1 g.1047T>C</i>	CC	TC	TT	C	T
NeC	0,06	0,43	0,51	0,28	0,72
NeS	0,06	0,41	0,53	0,26	0,74
NeT	0,10	0,46	0,44	0,33	0,67
<i>GHR g.229T>C</i>	CC	CT	TT	C	T
NeC	0,00	0,40	0,60	0,20	0,80
NeS	0,00	0,47	0,53	0,24	0,76
NeT	0,00	0,29	0,71	0,14	0,86

NeC = Linha Controle; NeS = Linha Seleção; NeT = Linha Tradicional

O marcador *GHR g.229T>C* apresentou-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, no rebanho NeS, em nível de significância do teste exato de Fisher de 5%, devido ao excesso de heterozigotos observado neste rebanho. Mesmo sem animais com o genótipo CC, os outros rebanhos apresentaram frequências em equilíbrio Hardy-Weinberg. Diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas dos rebanhos NeS e NeT também foram detectadas pelo teste exato de Fisher em nível de 5% para este marcador.

A diferença entre frequências alélicas e genotípicas entre os rebanhos NeS e NeT nos dois marcadores, provavelmente tenha sido causada pelo fato do rebanho NeT eventualmente ter recebido animais oriundos de rebanhos comerciais e não por efeito da seleção, uma vez que ambos, NeS e NeT, são selecionados para maiores pesos. O tamanho reduzido da população genotipada exige uma visão cautelosa a respeito do efeito da seleção, identificado pelo teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sobre o marcador *GHR g.229T>C*. O verdadeiro efeito de seleção sobre um marcador seria evidenciado com diferenças de frequência entre os rebanhos selecionados e o controle, o que não foi observado nesse caso, assim como também não foi observado no marcador *GH1 g.1047T>C*.

As maiores frequências do alelo T em relação ao alelo C eram esperadas para o marcador *GH1 g.1047T>C* neste estudo, pois, de acordo com LAGZIEL et al., (2000) este é o alelo típico de raças zebuínas, enquanto o alelo C é mais frequente em raças

taurinas. Os mesmos autores levantam a hipótese de que o alelo T seja o alelo ancestral que deu origem a variante mutante C e que a frequência deste alelo aumenta à medida que afasta-se geograficamente da Índia, onde os zebuínos mantêm a alta frequência do alelo original T. SODHI et al. (2007), observaram frequências do alelo T notoriamente maiores que o alelo C para o marcador *GH1 g.1047T>C*, em 17 raças de bovinos indianos distribuídos em diferentes regiões da Índia, dentre as quais estava a raça Ongole que deu origem ao Nelore. O genótipo CC não foi observado em nenhuma das raças. Os resultados obtidos por esses autores amparam a hipótese estabelecida por LAGZIEL et al. (2000), demonstrando que os rebanhos indianos mantiveram as características originais neste locus.

No presente estudo, a frequência do alelo T mostrou-se maior que o alelo C, mas aquém daquelas apresentadas em raças indianas como de 0,86 na raça Sahiwal (MITRA et al., 1995); 0,90 em Ongole (SODHI et al., 2007); 0,85 em Nelore (UNANIAM et al., 2000). Esta variação possivelmente pode ter sido conduzida pela utilização de fêmeas taurinas em cruzamentos durante a introdução do zebuíno no Brasil, ocasionando uma miscigenação gênica das duas sub-espécies para este locus. As frequências genotípicas encontradas no presente estudo são semelhantes às relatadas por BEAUCHEMIN et al. (2006) em bovinos da raça Brahman, da qual se conhece o alto grau de material genético taurino envolvido na formação.

As frequências encontradas na raça Nelore por UNANIAM et al. (2000) mostraram frequências gênicas próximas as descritas em rebanhos da Índia, porém as fêmeas genotipadas por esses autores são filhas de apenas 22 touros, todos eles P.O.(Puros de Origem). Não se pode descartar a possibilidade de que a baixa proporção de C em comparação aos registros de outros rebanhos zebuínos, seja uma particularidade do rebanho utilizado neste estudo, por efeito do tamanho reduzido da população e deriva genética, porém o rebanho que apresentou a menor frequência deste alelo foi justamente aquele onde ocorreu a introdução de reprodutores comerciais, fosse a deriva genética o fator atuante na frequência do alelo C, o oposto deveria ser observado.

O sítio *POU1F1* c.577C>A mostrou-se monomórfico na população utilizada no presente estudo, sendo C o alelo fixado. HUANG et al. (2008) definiram o genótipo CC como a forma conservada do gene *POU1F1* entre espécies, após alinharem a proteína POU1F1 de bovinos, ratos, humanos, chimpanzés e cães no programa *ClustalW* disponível em ([HTTP://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/)). Possivelmente a mutação *POU1F1* c.577C>A tenha acometido apenas a população de bovinos norte americana utilizada por HUANG et al. (2008), uma vez que nunca foi descrita em outras raças. Entretanto, para afirmações precisas quanto a essa hipótese torna-se essencial, estudos com esse marcador em outras populações. Considerando que foram utilizados, como fundadores na formação dos rebanhos da EEZS, animais representantes das principais linhagens existentes no Brasil e que atualmente este rebanho mantenha-se representativo do rebanho nacional, o fato de não ter sido encontrado nesse estudo a mutação *POU1F1* c.577C>A permite a dedução que essa não seja uma mutação presente na raça Nelore existente no Brasil.

A região parcial do exon 10 do gene *GHR* utilizada neste estudo mostrou a fixação do alelo A no *GHR* g.257A>G. O motivo desta fixação, não pode ser discutido com minúcia, uma vez que não existe material demonstrativo das frequências genóticas nos animais fundadores dos rebanhos para analisar se esses genes já eram fixados antes do início do programa de seleção. Descarta-se a possibilidade de que essa fixação tenha sido causada pela seleção uma vez que ela ocorre também no NeC. Frequências muito próximas de zero para o genótipo GG para este mesmo marcador foram registradas em raças taurinas por GE et al. (2000) e WATERS et al. (2010), e em zebuínos da raça Bali por ZULKHARNAIM et al. (2010), mas com quantidades razoáveis de animais heterozigotos. Nenhum dos autores encontrou efeito favorável do alelo A sobre alguma característica, que justificasse sua maior frequência.

Finalmente, o polimorfismo no sítio *GHR* g.229T>C, apresentou proporções genóticas próximas as descritas por WATERS et al. (2010) de 0,03 CC, 0,27 CT e 0,69 TT. Este polimorfismo foi revelado por GE et al. (2000) na raça Angus, com uma boa distribuição de frequências nas três categorias genóticas, 0,34 CC, 0,50 CT e 0,16 TT.

O fragmento do exon 10 de GHR, no presente estudo mostrou-se monomórfico no sítio *GHR g.257A>G* e polimórfico no sítio *GHR g.229T>C*, exatamente o oposto aos resultados obtidos por DI STASIO et al. (2005) na raça Piemontês. WATERS et al. (2010) registraram os dois polimorfismos na raça Holandesa, além disso constataram equilíbrio de ligação entre esses dois marcadores, mesmo estando eles bastante próximos. O presente estudo colabora com a observação de equilíbrio de ligação, uma vez que em um locus ocorre a fixação de um alelo enquanto o outro locus apresenta polimorfismo.

5.4. Análises de associação dos marcadores com valores fenotípicos

As médias fenotípicas e o número de animais de cada rebanho utilizado nas análises de associação com cada característica neste estudo estão na Tabela 4. A observação das médias, torna claro a diferença fenotípica entre o rebanho NeC e os rebanhos selecionados relatada em estudos prévios e que evidencia a eficiência de 3 décadas de seleção.

Tabela 4. Número de observações (N), médias fenotípicas e desvios padrão (DP).

Características	Rebanho					
	NeC		NeS		NeT	
	N	Média (DP)	N	Média (DP)	N	Média (DP)
PN (kg)	104	25,12 (3,57)	192	32,08 (5,28)	348	32,29 (4,89)
P210 (kg)	104	158,55 (23,98)	189	190,60 (31,26)	343	198,14 (30,22)
P378 (kg)	20	253,85 (25,22)	31	349,88 (37,55)	104	357,93 (37,48)
P550 (kg)	83	280,15 (23,82)	159	312,79 (33,18)	240	315,01 (42,27)
A378 (cm)	20	125,05 (2,78)	32	132,88 (5,05)	104	133,19 (4,16)
A550 (cm)	83	127,42 (3,99)	160	134,83 (3,89)	240	134,17 (4,62)
AOL (cm²)	82	45,41(5,51)	137	46,74 (7,33)	207	49,54 (7,09)
EGS (cm)	71	1,68 (0,58)	126	1,74 (0,67)	184	1,78 (0,77)
EGG (cm)	81	3,99 (1,92)	137	4,36 (1,94)	206	4,49 (1,91)

NeC: Nelore Controle, NeS: Nelore Seleção, NeT: Nelore Tradicional

O presente estudo não pode colaborar com a estimação do efeito dos marcadores *POU1F1 c.577C>A* e *GHR g.257A>G* sobre características de crescimento

em bovinos de corte, pois estes locus apresentam a fixação de um alelo. As análises de associação realizadas com o primeiro modelo que considerava um marcador de cada vez, revelaram não existir associação, em nível de 5%, dos marcadores *GH1 g.1047T>C* e *GHR g.229T>C* com as características de crescimento e carcaça envolvidas neste estudo. A Tabela 5 apresenta os níveis de significância da associação entre os marcadores e as expressões fenotípicas obtidos com o modelo em que foram considerados os dois marcadores simultaneamente e o efeito de interação. Descrição dos níveis de significância de cada variável considerada no modelo (Apêndice C).

TABELA 5. Valores de *P* obtidos nas análises de associação entre marcadores e fenótipos.

Marcador	Características de carcaça			Características de crescimento					
	AOL	EGS	EGG	PN	P210	P378	P550	A378	A550
<i>GH1 g.1047T>C</i>	0,8108	0,6448	0,3212	0,3309	0,8160	0,4272	0,4087	0,7558	0,3464
<i>GHR g.229T>C</i>	0,0281*	0,5499	0,6594	0,6559	0,7360	0,8938	0,0954	0,1447	0,6134
<i>GH*GHR</i>	0,0646	0,5329	0,6687	0,1873	0,2729	0,9165	0,0448*	0,6263	0,8755

*GH*GHR*- Interação entre os dois marcadores; * significativo em nível de 5%

O marcador *GH1 g.1047T>C* mesmo com o modelo considerando os dois marcadores e a interação, não demonstrou associação com as características avaliadas. No entanto o marcador *GHR g.229T>C* apresentou-se associado com a característica AOL no segundo modelo, sendo as médias ajustadas de AOL superiores em animais com o genótipo CT. Apesar de os dois marcadores manterem no segundo modelo a condição de não associados a característica P550, houve um efeito da interação dos dois marcadores sobre esta característica. Fêmeas com o genótipo CT para o marcador *GHR g.229T>C* apresentaram médias de P550 superiores as fêmeas com o genótipo TT. Porém quando em combinação com genótipo TT do marcador *GH1 g.1047T>C* a situação foi inversa, sendo que esta foi a categoria de genótipos combinados que apresentou a pior média para a característica (Tabela 6).

TABELA 6. Médias ajustadas de P550 para o efeito de interação entre os marcadores (p=0,0448)

Marcadores		N	P550 (kg)
<i>GH1 g.1047T>C</i>	<i>GHR g.229T>C</i>		Médias (DP)
CC	CT	07	319,33 (11,99) a
CC	TT	05	290,72 (14,00) ab
TC	CT	38	300,47 (6,51) ab
TC	TT	53	290,29 (6,19) b
TT	TT	62	296,64 (6,03) ab
TT	CT	47	289,76 (6,60) b

Medias seguida de letra minúscula diferente na mesma coluna diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Embora o hormônio do crescimento tenha um papel fundamental no desenvolvimento de tecidos e crescimento animal, a mutação existente no intron 3 do gene *GH1* não é capaz de explicar variações nas funções exercidas por esse hormônio, que altere o seu efeito sobre as características de desenvolvimento muscular e crescimento, conforme verificado pela ausência de associação deste polimorfismo com as características avaliadas nos dois modelos testados. DI STASIO et al. (2003) também não encontraram associação deste marcador com características de crescimento, em bovinos Piemontês com um modelo considerando apenas um marcador. Embora UNANIAM et al. (2000) tenham descrito efeito polimorfismo sobre os ganhos de peso a partir da idade de 14 meses em bovinos Nelore, no presente estudo o mesmo não foi observado no peso corporal em idades mais elevadas.

Em relação ao marcador *GHR g.229T>C*, o número de animais relacionados na análise de associação foi o mesmo nos dois modelos, visto que o critério de eliminação não afetou nenhum animal genotipado para este polimorfismo. A diferença entre os resultados de associação obtidos nos dois modelos foi causada exatamente pela inclusão do fator interação. A inclusão deste fator ao modelo gerou um novo ajuste das médias fenotípicas no qual foi possível detectar o efeito do marcador *GHR g.229T>C*, oculto no primeiro modelo. A inclusão do efeito de interações intergênicas ainda é uma prática delicada devido à possibilidade de associações espúrias. No entanto, sob o ponto de vista que a combinação de genótipos ocorre em um animal e que neste caso

existe uma correspondência biológica entre os fatores transcritos por cada gene, a inclusão do efeito de interação no modelo é contundente. MACKAY (2001) considera que a inclusão deste efeito, quando existe a relação biológica entre os dois marcadores, revela a existência de fontes de variância genética que não são detectados com a utilização de apenas um marcador.

Resultados de interação entre locus foram relatados em estudos com marcadores moleculares utilizando modelos similares ao segundo modelo utilizado neste estudo (CASAS et al., 2000; TAMBASCO et al., 2003; PAZ et al., 2004). O efeito de epistasia, determinado pela interação entre locus, não é comumente considerado em análise com genes candidatos, pela falta de evidências que essa interação entre dois sítios polimórficos exista e pela dificuldade em delinear um experimento capaz a detectar essa interação com precisão. A premissa de que o efeito de epistasia não pode ser transmitido à progênie também justifica a sua não inclusão em análises com marcadores moleculares. Apesar de considerar importante a inclusão do fator interação nos modelos, MACKAY (2001) classifica o poder de detecção do efeito de epistasia entre marcadores como baixo, considerando que, a classe contendo os genótipos menos frequentes de cada marcador terá sempre um pequeno número de indivíduos; existem outros QTL para uma característica segregando na população, além do par considerado; e somente interações epistáticas extremamente fortes continuam a ser significativas após o ajuste dos limites de significância para análises estatísticas múltiplas.

Os recentes avanços em métodos de identificação de polimorfismos em larga escala podem fazer da estimação de efeitos de interação entre loci uma técnica mais precisa, por permitir que um número maior de marcadores seja considerado em um mesmo modelo. Apesar de ter sido observado neste estudo um número reduzido de animais em algumas classes, assim como em um dos pontos levantados por MACKAY et al. (2001), vale ressaltar que o rebanho da EEZS equivale a um material genético único da raça e mesmo com uma população pequena estudos com informações moleculares nesse rebanho assumem especial importância na busca por marcadores específicos a raça Nelore. As divergências nos resultados obtidos com os dois modelos

chamam atenção à importância de novos efeitos a serem incluídos nas análises com modernas condições de genotipagem em larga escala.

6. CONCLUSÕES

As regiões *GH g.1047T>C* e *GHR g.229T>C* são polimórficas no rebanho Nelore pertencente a EEZS, caracterizando possíveis marcadores para alguma características de interesse econômico.

A seleção para crescimento a qual os rebanhos estão expostos não influenciou as frequências alélicas e genótípicas nos marcadores *GH g.1047T>C* e *GHR g.229C>T*.

O terceiro exon do gene *POU1F1* não condiz a um potencial marcador na população avaliada por não apresentar variação em sua sequência.

O marcador *GHR g.229T>C*, equivale a uma ferramenta interessante a ser considerada na seleção para peso corporal de fêmeas aos 550 dias de idade.

Em situações que seja conhecida a interatividade entre duas regiões gênicas, faz-se necessário a inclusão do efeito de interação entre marcadores nos modelos de análise de associação.

7. REFERÊNCIAS

ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; NOVAES, A. P. Características produtivas e reprodutivas de fêmeas da raça nelore e cruzadas 1/2 Canchim + 1/2 Nelore. **Revista brasileira de zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 960-967, 1999.

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

AYRES, D. R.; SOUZA, F. R. P.; MERCADANTE, M. E. Z.; FONSECA, L. F. S.; TONHATI, H.; CYRILLO, J. N. S. G.; BONILHA, S. F. M.; ALBUQUERQUE, L. G. Evaluation of *TFAM* and *FABP4* gene polymorphisms in three lines of Nellore cattle selected for growth. **Genetics Molecular Research**, Ribeirao Preto, v. 9, n. 4, p. 2050-2059, 2010.

BEAUCHEMIN V. R.; THOMAS M. G.; FRANKE D. E.; SILVER G. A. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 3, p. 438-447, 2006.

BONILHA, S. F. M.; PACKER, I. U.; FIGUEIREDO, L. A.; ALLEONI, G. F.; RESENDE, F. D.; RAZOOK, A. G. Efeitos da seleção para peso pós-desmame sobre características de carcaça e rendimento de cortes cárneos comerciais de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1275-1281, 2007.

BONILHA, S. F. M.; TEDESCHI, L. O.; PACKER, I. U.; RAZOOK, A. G.; ALLEONI, G. F.; NARDON, R. F.; RESENDE, F. D. Evaluation of carcass characteristics of *Bos indicus* and tropically adapted *Bos taurus* breeds selected for postweaning weight. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 1770-1780, 2008.

CARRIJO, S. M.; ALENCAR, M. M.; TORAL, F. L. B.; REGITANO, L. C. A. Association of PIT1 genotypes with growth traits in Canchim cattle. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 2, p. 116-121, 2008.

CARVALHO, F. A.; LAMMOGLIA, M. A.; SIMOES, M. J.; RANDEL, R. D. Breed effects thermoregulation and epithelial morphology in imported and native cattle subjected to heat stress. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3570-3573, 1995.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE S. M. K.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, , Champaign, v. 78, p. 560-569, 2000.

CRICK, F. H. C.; LESLIE BARNETT, F. R. S.; BRENNER S.; WATTS-TOBIN, R. J. General nature of the genetic code for proteins. **Nature**, Londres, v. 192, n. 4809, p. 1227-1332, 1961.

CYRILLO, J. N. S.; RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BONILHA NETO, L. M.; RUGGIERI, A. C.; TONHATI, H. Efeitos da seleção para peso pós-desmame sobre medidas corporais e perímetro escrotal de machos Nelore de Sertãozinho (SP). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 444-453, 2000.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker ad gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 124, suppl. 13, p. 313-328, 2004.

DEKKERS, J. C. M; VAN DER WERF, J. H. G. Strategies, limitations and opportunities for marker-assisted selection in livestock. In: GUIMARÃES, E. P.; RUANE, J.; SHEARF, B. D.; SONNINO, A.; DARGIE, J. D. **Marker-assisted selection: current status and**

future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Roma: FAO, 2007, cap. 10, p. 167-184.

DI STASIO, L.; BRUGIAPAGLIA, A.; DESTEFANIS, G.; ALBERA, A.; SARTORE, S. GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v. 120, n. 5, p. 358-361, 2003.

DI STASIO, L.; DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; ALBERA, A.; ROLANDO A. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. **Animal Genetics**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 138-140, 2005.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics.** Essex: Longman Group 1996

FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. **Biotecnologia estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011, p. 55-120.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SHUSTER, I.; CORREA, R. X.; GOOD-GOD P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2003.

FERRAZ, J. B. S.; PINTO, L. F. B.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M.; OLIVEIRA, E. C. M.; ALMEIDA, H. B.; WOODWARD, B.; NKRUMAH, D. Association of single nucleotide polymorphisms with carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1360-1366, 2009.

GE W., DAVIS M.E., HINES H.C. & IRVIN K.M. Two-allelic DGGE polymorphism detected in the promoter region of the bovine GHR gene. **Animal Genetics**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 71, 1999.

GE, W.; DAVIS, M. E.; HINES, H. C.; IRVIN K. M. Rapid communication: single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 12, p. 2229-2230, 2000.

GE, W. DAVIS, M. E.; HINES, H. C.; IRVIN K. M.; SIMMEN R. C. M. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 641-648, 2003.

GREEN, R. D.; COCKET, N. E.; MILLER, M. F.; HANCOCK, D. L.; BIDWELL, C.; BARRET, L. S.; MORGAN, J. B.; TATUM, J. D. Characterization of taq I polymorphisms in the bovine calpastatin gene, In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph - Canadá. **Proccedings...** p. 450-453.

GRISART, B.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; KARIM, L.; FORD, C.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; MNI, M.; REID, S.; SIMON, P.; SPELMAN, R.; GEORGES, M.; SNELL, R. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, Long Island, v. 12, n. 2, p. 222-231, 2002.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the Double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 1, p. 71-74, 1997.

GORDON D. F.; QUICK D. P.; EWIN C. R.; DONELSON J. E.; MAURER R. A. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Co. Clare, v. 33, n. 1, p. 81-95, 1983.

GUIMARÃES, S. E. F. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e Genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado a produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012, cap. 26, p. 614-647.

HAYES B. J.; GODDARD, M. E. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. **Genetics Selection Evolution**, Londres v. 33, n. 3, p. 209-229, 2001.

HAYES, B. J.; LIEN, S.; NILSEN, H.; OLSEN, H. G.; BERG, P.; MACEACHERN, S.; POTTER, S.; MEUWISWSEN, T. E. The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 105-110, 2006.

HEDIGER, R.; JOHNSON, S. E.; BARENDSE, W.; DRINKWATER, R. D.; MOORE, S. S.; HETZEL, J. Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. **Genomics**, Maryland Heights, v. 8, n. 1, p. 171-174, 1990.

HUANG, W.; MALTECCA, C.; KHATIB, H. A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 554-557, 2008.

JOLLY R. D.; VAN DER WATER, N. S.; RICHARDS, R. B.; DORLING, P.R. Generalised glycogenesis in beef shortorn cattle-heterozygose detection. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 227-229, 1977.

KATOH, K.; KOUNO, S.; OKAZAKI, A.; SUZUKI, K.; OBARA Y. Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2008.

KOMIZAREK, J.; WA KOWICS, K.; MICHALAK, A.; DORYNEK, Z. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in jersey cattle. **Animal Science Papers and Reports**, Mrokov , v. 22, n. 3, p. 307-313, 2004.

LAGZIEL, A.; DENISE, S.; HANOTTE, O.; DHARA, S.; GLAZKO, V.; BROADHEAD, A.; DAVOLI, R.; RUSSO, V.; SOLLER, M. Geographic and breed distribution of an MspI PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. **Animal Genetics**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 210-213, 2000.

MACKAY, T. F. C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 35, n.1, p. 303-339, 2001.

MERCADANTE, M. E. Z.; RAZOOK, A. G. Programa de melhoramento genético do Instituto de Zootecnia. Sertãozinho, SP. In: PIRES, V. A. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010, cap 44, p. 847-860.

MERCADANTE, M. E. Z.; PACKER, I. U.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; FIGUEIREDO, L. A. Dias ao Parto de Fêmeas Nelore de um Experimento de Seleção para Crescimento. I - Modelo de Repetibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1715-1725, 2002.

MERCADANTE, M. E. Z.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO J. N. S. G.; FIGUEIREDO, L. A. Efeito da Seleção para Crescimento na Permanência de Vacas Nelore no Rebanho até Cinco Anos de Idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 344-349, 2004.

MERCADANTE, M. E. Z.; PACKER, I. U.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO J. N. S. G.; FIGUEIREDO, L.A. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 376-384, 2003.

MITRA, A.; SCHLEE, P.; BALAKRISHNAN, C. R.; PIRCHNER, F. Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. **Journal Animal Breeding and Genetics**, Malden, v. 112, n. 1, p. 71-74, 1995.

MORAIS, D. A. E. F.; MAIA, A. S. C.; SILVA, R. G.; VASCONCELOS, A. M.; LIMA, P. O.; GUILHERMINO, M. M. Variação anual de hormônios tireoideanos e características termorreguladoras de vacas leiteiras em ambiente quente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 538-545, 2008.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Oxon, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.

PARDI, M. C.; SOUZA, E. R.; SANTOS, I. F.; SANTOS, J. C. **A epopéia do zebu: um estudo zootécnico econômico**. Goiânia: Editora da UFG, 1996, 126p.

PAZ, C. C. P.; PACKER, I. U.; FREITAS, A. R.; TAMBASCO-TALHARI, D.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; RODRIGUES, A. A. Influência de polimorfismos genéticos sobre os parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa v. 33, n. 4, p. 858-869, 2004.

PRIMO, A. T. The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals. In: GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCE, 5, 2000, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

RAZOOK, A. G.; BONILHA NETO, L. M.; FIGUEIREDO, L. A.; PACKER, I. U.; TROVO, J.B. F.; NASCIMENTO, J.; PACOLA, L. J. Seleção para peso pós-desmame em bovinos nelore e guzerá. I. Diferenciais e intensidades de seleção. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, SP, v. 45, n. 2, p. 241-271, 1988.

RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; BONILHA NETO, L. M.; TROVO, J. B. F.; PACKER, I. U.; PACOLA, L. J. ; CÂNDIDO, J. G. Intensidades de seleção e respostas direta e correlacionadas em 10 anos de prole de bovinos das raças Nelore e Guzerá selecionadas para peso pós-desmame. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, SP, v. 50, n. 2, p. 147-163, 1993.

REICHMANN K. G.; DRINKWATER, R. D.; HETZEL, D. J. S. HEISHER, R. W.; HEALY, P. J. Generalised glycogenosis (Pompe's disease) in Brahman cattle. A review of the Syndrome and its control in Australia. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Productions**, 5., 1994, Guelph, Canada. **Proceedings...** p. 165-168.

RESENDE, M. D. V. **Genômica quantitativa e seleção no melhoramento de plantas perenes e animais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 330 p.

RILEY, D. G.; SANDERS, J. O.; KNUTSON, R. E.; LUNT, D. K. Comparison of F1 Bos indicus x Hereford cows in central Texas: I. Reproductive, maternal, and size traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1431-1438, 2001.

SAINZ, R.D. et al. Projeto OB Choice. Genética para melhorar a qualidade da carne brasileira. In: SEMINÁRIO DA MARCA OB, 3., 2005, Cuiabá, MT. **Anais...** p. 1-17.

SAN S.; FROHMAN L. A.; Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. **Endocrinology Metabolism Clinical of North America**, v. 37, n. 3, p. 1-22, 2008.

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

SCHWENGER, B.; SCHÓBER, S.; SIMON, D. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. **Genomics**, Maryland Heights, v. 16, p. 241-244, 1993.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI JR., M. E.; ACKERMANN, M. R. GILBERT, R. O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, n. 19, p. 9225-9229, 1992.

SILVA, R. G.; SCALA, N.; POYAY, P. L. B. Transmissão de radiação ultravioleta através do pelame e da epiderme de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1939-1947, 2001.

SILVA, M. V. G. B.; MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; CAMPOS, A. L.; GUIMARÃES, M. F. M.; AZEVEDO, A. L. S.; MOITA, A. K. F.; LUI, J. F. Genes do eixo somatotrófico e características de crescimento numa população F2 de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 981-986, 2006.

SODHI, M.; MUKESH, M.; PRAKASH, B.; MISHRA, B. P.; SOBTI, R. C.; SINGH, K. P.; SINGH, S.; AHLAWAT, S.P.S. *MspI* Allelic Pattern of Bovine Growth Hormone Gene in Indian Zebu Cattle (*Bos indicus*) Breeds. **Biochemical Genetics**, v. 45, n. 1, p. 145-153, 2007.

SOUZA, F. R. P.; MERCADANTE, M. E. Z.; FONSECA, L. F. S.; FERREIRA, L. M. S.; REGATIERI, I. C.; AYRES, D. R.; TONHATI, H.; SILVA, S. L.; RAZOOK, A. G.; ALBUQUERQUE, L. G. Assessment of DGAT1 and LEP gene polymorphisms in three

Nelore (*Bos indicus*) lines selected for growth and their relationship with growth and carcass traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 435–441, 2010.

STORMONT, C.; CUMLEY, R. W. Cellular antigens in cattle blood. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 35-41, 1943.

TAMBASCO, D. D.; PAZ, C. C. P.; TAMBASCO-STUDART, M.; PEREIRA, A. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R.; COUTINHO, L. L.; PACKER, I. U.; REGITANO, L. C. A. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v.120, n.1, p.51-56, 2003.

TEODORO, R. L. MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; VERNEQUE, R. S. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5,,2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004.

UNANIAN, M.M.; BARRETO, C.C.; FREITAS A.R.; CORDEIRO, C.M.T.; JOSAHKIAN, L.A. Associação do Polimorfismo do Gene do Hormônio de Crescimento com a Característica Peso em Bovinos da Raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 1380-1386, 2000.

VERNEQUE, R. S.; PEIXOTO, M. G. C. D.; VERCESI FILHO, A. E.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V. G. B. MACHADO, C. H. C.; GERALDO, C. C.; PEREIRA, M. C.; FERNANDES, A. R. **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro Sumário Brasileiro de Touros-Resultado do Teste de Progênie – Maio 2010**. Embrapa gado de Leite: Juiz de Fora, 2010, 17p.

VITTORI, A.; QUEIROZ, A. C.; RESENDE, F. D.; GESUALDI JÚNIOR, A.; ALLEONI, G. F.; RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; GESUALDI, A. C. L. S. Características de carcaça de bovinos de diferentes grupos genéticos, castrados e não-castrados, em fase

de terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2085-2092, 2006.

WALLIS, M. The primary structure of bovine growth hormone. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 11-14, 1973.

WATERS, S. M.; McCABE, M. S.; HOWARD, D. J.; GIBLIN, L.; MAGEE, D. A.; MACHUGH, D. E.; BERRY, D. P. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Houstein-Friesian dairy cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 39-49, 2010.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, Londres, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

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

WOOLLARD, J.; TUGGLE, C. K.; PONCE DE LEON F. A. Rapid communication: localization of POU1F1 to bovine, ovine, and caprine 1q21–22. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 1, p. 242–243, 2000.

YAO, J.; AGGREY, S.; ZADWORNÝ, D.; FLAN, H. J.; KIIHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics**, Bethesda, v. 144, n. 4, p. 1809-1816, 1996.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.80, n. 5, p.631-634, 1990.

ZHANG, H. M.; BROWN, D. R.; DENISE, S. K.; AX R. L. Nucleotide sequence determination of a bovine somatotropin allele. **Animal Genetics**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 578, 1992.

ZHANG, H. M.; BROWN, D. R.; DENISE, S. K.; AX R. L. Rapid communication: PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, n. v. 71, n. 8, p. 2276, 1993.

ZHOU, G.L.; JIN, H.J.; LIU, C.; GUO,S.L.; ZHU Q.; WU, Y.H. Association of genetic polymorphism in *GH* gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. **Journal Bioscience**, Uberlândia, v. 30, n. 5 p. 595-598, 2005.

ZULKHARNAIM, JAKARIA, NOOR, R. R.; Identification of Genetic Diversity of Growth Hormone Receptor (*GHR/AluI*) Gene in Bali Cattle. **Media Peternakan**, Bogor, v. 33, n. 2, p. 81-87, 2010.

[Digite texto]

APÊNDICES

Apêndice A

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE

- Descongelar as amostras;
- Aliquotar 1000 µL de sangue homogeneizado em novo eppendorf;
- Adicionar 120 µL de SDS 0,5 ou Nonidet P-40 (12,5) às amostras;
- Completar o volume para 2 ml com Tampão TKM-1. Homogeneizar no vórtex;
- Centrifugar por 15 minutos a 10000 r.p.m. a T° ambiente (27~30°C). Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 800 µL de tampão TKM-1, dissolver o pellet em vórtex, e depois completar o volume para 2 ml;
- Centrifugar por 10 minutos à 10.000 r.p.m. à temperatura ambiente até obter coloração clara;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar 1.000 µL de tampão TKM-2 e 100 µL de SDS (20%) e agitar no vórtex;
- Incubar em banho-maria a 55-62°C por 1 hora;
- Adicionar 400 µL de NaCl (6M) e agitar no vórtex;
- Centrifugar por 20 minutos à 14.000 r.p.m. à temperatura ambiente;
- Transferir 1.000 µL do sobrenadante para um novo *eppendorf*;
- Adicionar 700 µL de etanol absoluto gelado, e em seguida agitar vagarosamente para que ocorra a precipitação do DNA;
- Centrifugar por 15 minutos à 14.000 r.p.m. à 4°C;
- Descartar o sobrenadante e em seguida adicionar 700 µL de etanol (70%) misturando por inversão;
- Centrifugar por 5 minutos à 14.000 r.p.m. a 4°C, descartar o sobrenadante em seguida. Secar o pellet por inversão (~ 6 horas);
- Adicionar 100 µL de tampão TE e armazenar em freezer a 4°C, para posterior utilização.

[Digite texto]

Apêndice B

Tabela. Numero de animais, Grupos de Contemporâneos e touros envolvidos em cada análise de associação.

MARCADOR	Fator	Característica								
		PN	P210	P378	P550	A378	A550	AOL	EGG	EGS
<i>H1 g.1047T>C</i>	N	645	636	155	482	482	155	428	427	425
	GC	20	20	20	20	20	20	16	16	16
	Touro	83	83	83	83	83	83	59	59	59
<i>GHR g.229T>C</i>	N	322	317	105	212	105	212	304	304	303
	GC	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Touro	48	47	48	48	48	48	47	47	47

[Digite texto]

Apêndice C

Tabela 1. Valores de P de cada fator considerado nas análises de associação entre marcadores e fenótipos, obtidos com o primeiro modelo.

MARCADOR	CARACTERÍSTICA	FATORES				
		Grupo de Contemporâneos	Mês de Nascimento	Idade da vaca ao parto	Sexo	Idade do animal
GH1 g.1047T>C	PN	0,0001	0,0001	0,0077	0,0001	--
	P210	0,0001	0,3263	0,0001	0,0001	--
	P378	0,0001	0,8206	0,8519	--	--
	P550	0,0001	0,0684	0,8375	--	--
	A378	0,0001	0,2684	0,1964	--	--
	A550	0,0001	0,4182	0,0030	--	--
	AOL	0,0018	0,0026	0,1004	0,7993	0,0032
	EGG	0,0001	0,0842	0,0901	0,0001	0,0018
	EGS	0,0001	0,0060	0,2187	0,0188	0,3833
GHR g.229T>C	PN	0,0001	0,0128	0,0267	0,0001	--
	P210	0,0001	0,3457	0,0001	0,0024	--
	P378	0,0001	0,6446	0,6923	--	--
	P550	0,0001	0,4468	0,9592	--	--
	A378	0,0001	0,5778	0,2651	--	--
	A550	0,0001	0,4025	0,0938	--	--
	AOL	0,0017	0,0117	0,1154	0,1553	0,0397
	EGG	0,0001	0,1995	0,0075	0,0001	0,0001
	EGS	0,0204	0,0326	0,0099	0,0016	0,0272

[Digite texto]

Tabela 2. Valores de *P* de cada fator considerado nas análises de associação entre marcadores e fenótipos, obtidos com o segundo modelo.

CARACTERÍSTICA	FATORES				
	Grupo de	Mês de	Idade da vaca	Sexo	Idade do
	Contemporâneos	Nascimento	ao parto		animai
PN	0,0001	0,0143	0,0411	0,0001	--
P210	0,0001	0,9773	0,0001	0,0027	--
P378	0,0001	0,7733	0,0493	--	--
P550	0,0001	0,2763	0,1898	--	--
A378	0,0001	0,1266	0,0696	--	--
A550	0,0001	0,0001	0,1170	--	--
AOL	0,0081	0,0196	0,2101	0,0001	0,0131
EGG	0,0001	0,0670	0,0078	0,0043	0,0013
EGS	0,0004	0,0149	0,0170	0,0023	0,2213