

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Identificação de regiões genômicas e genes candidatos associados com
qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo em bovinos da raça
Nelore.**

**São Carlos
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

Polyana Cristine Tizioto

**Identificação de regiões genômicas e genes candidatos associados com
qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo em bovinos da raça
Nelore.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular do Centro de Ciências Biológicas e
da Saúde da Universidade Federal de São
Carlos para obtenção do título de doutor em
Genética Evolutiva e Biologia Molecular.**

**Orientação: Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano
Co-Orientação: Dr. Maurício de Alvarenga Mudadu**

**São Carlos
2014**

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

T625ir

Tizioto, Polyana Cristine.

Identificação de regiões genômicas e genes candidatos associados com qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo em bovinos da raça Nelore / Polyana Cristine Tizioto. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Genética molecular. 2. Zebu. 3. Carne bovina - maciez. 4. QTL. 5. Minerais de ferro. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

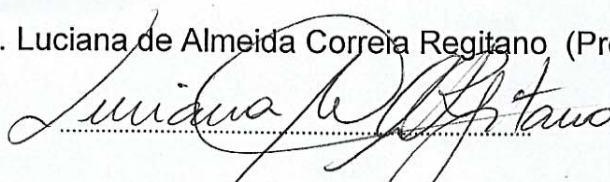
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“Identificação de regiões genômicas e genes candidatos
associados com qualidade de carne e conteúdo de minerais no
músculo em bovinos da raça Nelore”

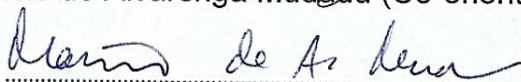
Tese de Doutorado de
POLYANA CRISTINE TIZIOTO

Banca Examinadora:

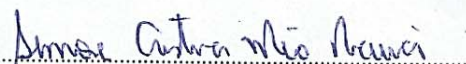
Profa. Dra. Luciana de Almeida Correia Regitano (Presidente)



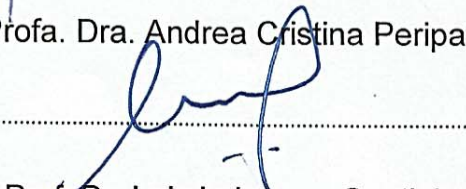
Dr. Mauricio de Alvarenga Mudada (Co-orientador)



Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura



Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato



Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho



Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro



**Dedico este trabalho aos meus pais
Antônio Celso e Rosemary Tizioto
pelo enorme esforço, apoio, incentivo,
compreensão e amor.**

***“Valeu a Pena? -Tudo vale a
pena se a alma não é pequena”
Fernando Pessoa.***

Agradecimentos

À Deus, por me dar força e amparo em todos os momentos de dificuldades.

Aos meus pais Antônio Celso Tizioto e Rosemary Ravagnoli Tizioto pelo enorme esforço, apoio, incentivo e amor incondicional durante toda minha vida. Com certeza vocês são os maiores responsáveis por esta conquista. Nunca me esquecerei das renúncias que vocês fizeram para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha irmã Pamela, por ser minha melhor amiga e meu exemplo. Obrigada por todo apoio e ajuda durante toda a minha vida.

À toda a minha família, em especial aos meus avós Antônio Luiz Tizioto e Candida Medeiros Tizioto, que sempre estiverem presentes em minha vida.

Agradeço especialmente à minha orientadora Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pela oportunidade, orientação, paciência, confiança, incentivo e ensinamentos. Devo todo meu crescimento científico e até mesmo parte do pessoal a ela. Obrigada por acreditar em mim e me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço ainda pelos momentos de descontração e amizade durante essa longa caminhada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro (2010/06515-4).

Aos professores Dr. Luiz Lehmann Coutinho e Dr. Gerson Barreto Mourão e ao pesquisador Dr. Maurício de Alvarenga Mudadu (co – orientador) pelas inúmeras contribuições, ensinamentos e estímulos. Além das contribuições científicas, me ensinaram as vantagens do trabalho em equipe.

Ao professor Dr. Jeremy Taylor que me permitiu desenvolver parte deste projeto em seu laboratório na University of Missouri at Columbia nos Estados Unidos. Sem dúvidas, esta oportunidade foi uma das melhores experiências profissionais e pessoais que eu já vivi, a qual contribuiu significativamente para o meu crescimento como cientista e pessoa.

Aos meus amigos, principalmente aqueles que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Em especial à Marcela Maria de Souza, Flávia Aline Bressani e Gustavo Gasparin pela amizade, ajuda e apoio durante toda realização deste projeto, vocês foram essenciais. Ao Wilson Malagó Jr por compartilhar todo seu conhecimento e experiência. Sou igualmente grata aos amigos Priscila Neubern de Oliveira, Adriana Somavilla, Andressa Lima, Fabiana Barichello Mokry, Daniela Moré, Kamila Oliveira, Suelen Mello, Marina Ibelli, Alexandre Lima Oliveira, Karine Minari, Wellison Diniz e Vitor Catoia, pelas inúmeras ajudas e companheirismo. Todos vocês foram importantes e essenciais nesta conquista.

Aos líderes e componentes da rede “Bife de qualidade”, na qual este projeto está inserido, pela participação e contribuição neste trabalho.

À Embrapa pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários da Embrapa, pela convivência, paciência, dedicação e atenção.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, pela excelência da formação prestada e conhecimentos transmitidos.

Resumo

A presente tese encontra-se dividida em três capítulos com o intuito de facilitar o entendimento dos experimentos apresentados. O primeiro capítulo refere-se a uma concisa revisão bibliográfica, a qual aborda os principais embasamentos teóricos e as justificativas dos experimentos desenvolvidos que serão apresentados nos demais capítulos. O segundo capítulo apresenta dois estudos de associação genômica ampla na raça Nelore, sendo o primeiro para características de qualidade de carne e o segundo para o conteúdo de minerais no músculo *Longissimus dorsi*. Considerando a importância da maciez da carne para a pecuária de corte nacional, o terceiro capítulo aborda a estratégia de genes candidatos utilizada para identificar genes que explicam a variação dessa característica em bovinos da raça Nelore. Os resultados dos experimentos realizados indicaram que as características de qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo esquelético são pelo menos parcialmente determinadas geneticamente. A maioria dos loci para características quantitativas (QTLs) identificados são de efeitos pequenos, revelando a natureza poligênica das características avaliadas e a importância da aplicação de avaliações que considerem a variação de polimorfismos em nível genômico. No entanto, alguns QTLs de efeitos maiores foram identificados, como por exemplo, para pH muscular, conteúdo de ferro, selênio, cálcio e zinco no músculo, os quais explicaram 4,01, 6,53, 3,53, 2,59 e 2,55 % da variância genética aditiva, respectivamente. Por meio destes estudos, produzimos uma ampla lista de genes candidatos relacionados com características de interesse econômico para pecuária de corte, os quais devem contribuir para o entendimento dos mecanismos genéticos subjacentes às essas características. A estratégia de associação genômica ampla ainda não é economicamente viável para os produtores de gado de corte, sendo assim a estratégia de genes candidatos ainda é interessante devido sua maior acessibilidade e menor custo. Os genes candidatos *KCNJ11*, *MyoD1* e *ASAPI* foram identificados como explicando parte da variação da maciez de carne de animais raça Nelore. A validação das regiões genômicas e genes candidatos identificados neste estudo e o futuro mapeamento de mutações causais devem contribuir para implementação da seleção assistida por marcadores e ainda para a seleção genômica de características de interesse econômico na raça Nelore.

Palavras-chaves: Zebu. Maciez. Carne. QTL.

Abstract

This thesis is divided into three chapters in order to facilitate the understanding of the experiments that will be presented. The first chapter refers to a concise literature review, which covers the main theoretical themes and justifications regarding the developed experiments presented in the following chapters. The second chapter presents two genome-wide association studies in Nellore cattle, being the first for meat quality traits and the second for the mineral content of the Longissimus dorsi muscle. Considering the importance of beef tenderness for producer, the third chapter deals with the strategy used to identify candidate genes that explain the variation in this trait in Nellore breed. The experimental results suggested that meat quality traits and mineral content of skeletal muscle is at least partially genetically determined. Most quantitative trait loci (QTLs) identified is of small effects, revealing the polygenic background of those traits and the importance of applications that consider variation at the genomic level. However, some major effect QTLs were found for muscle pH , iron, selenium , zinc and calcium content in muscle, which accounted for 4.01 , 6.53 , 3.53 , 2.59 and 2.55% of the additive genetic variance , respectively. Through these studies, we produced an extensive list of candidates genes and metabolic pathways related to economic interest traits in beef cattle, which should contribute to the understanding of the their underlying genetic mechanisms. A genome-wide association approach still not economically feasible for beef producers, therefore candidate genes strategy is interesting because of its major accessibility. *KCNJ11*, *MyoD1* and *ASAPI* candidate genes were identified as explaining part of the variation in meat tenderness of Nellore breed. The validation of genomic regions and candidate genes identified in this study and future mapping of causal mutations should contribute to the implementation of marker-assisted selection and for the genomic selection of traits of economic interest in Nellore cattle.

Key-Words: Zebu. Tenderness. Beef. QTL.

Lista de Figuras

Figura 1. Animais da raça Nelore, componentes deste projeto, confinados na Embrapa CPPSE.	18
Figura 2. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC0.	40
Figura 3. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC7.	41
Figura 4. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC14.	42
Figura 5. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para EGS.	45
Figura 6. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para AOL.	46
Figura 7. Gráficos representando a variância genética aditiva explicada por SNPs localizados no cromossomo 8 para ferro (A), zinco (B) e fósforo (C).	58
Figura 8. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de ferro no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	60
Figura 9. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de selenio no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	61
Figura 10. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de cálcio no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	61
Figura 11. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de zinco no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	62
Figura 12. Árvore de haplótipo das variações detectadas pelo sequenciamento do gene <i>MYOD1</i> .	94
Figura 13. Regressão linear entre os níveis de expressão ajustados (Cta) do gene <i>KCNJ11</i> e as medidas de força de cisalhamento após 7 dias de maturação da carne.	112

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média, desvio padrão, herdabilidade e parâmetro π estimado para cada característica.	37
Tabela 2. QTL de maior efeito para cada característica.	40
Tabela 3. Média, estimativas de componentes de variância e herdabilidade para o teor de cada mineral no músculo Longissimus dorsi de 373 novilhos Nelore.	54
Tabela 4. Correlações fenotípicas entre os minerais no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	55
Tabela 5. Correlações entre os valores genéticos genômicos estimados pelo programa Gensel para o teor de cada mineral no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.	56
Tabela 6. Cromossomo, localização, número de SNPs e variação genética explicada pelos QTLs mais importantes associadas com concentração de minerais do músculo Longissimus dorsi na raça Nelore.	62
Tabela 7. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>KCNJ11</i> localizado no cromossomo 15 de 35650715 a 35653365 pares de base (GenBank ID: 532060).	75
Tabela 8. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>MyoDI</i> localizado no cromossomo 15 de 35331399 a 35334046 pares de base (GenBank ID: 281938).	76
Tabela 9. Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>CALCA</i> localizado no cromossomo 15 de 38160931 a 38166439 pares de base pelo método de Sanger (GenBank ID: 614663).	76
Tabela 10. Descrição dos primers utilizados para amplificação e sequenciamento no equipamento Miseq do gene <i>CALCA</i> (Gene ID: 614663).	80
Tabela 11. Descrição dos primers Forward (F); Reverse (R); sonda alelo específica marcada com VIC e alelo específica marcada com FAM, disponibilizados pela Applied Biosystems, utilizados para genotipagem dos SNPs por Taqman.	82
Tabela 12. Primers utilizados nas análises de expressão gênica.	84
Tabela 13. Estrutura dos dados (estatísticas descritivas) das características estudadas.	87
Tabela 14. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida 24 horas <i>post-mortem</i>	88
Tabela 15. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida após 7 dias de maturação da carne.	88
Tabela 16. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida após 14 dias de maturação da carne.	88
Tabela 17. Descrição dos SNPs identificados no gene <i>KCNJ11</i> em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h <i>post-mortem</i> , P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comuns (MAF)	90
Tabela 18. Descrição dos SNPs identificados no gene <i>MyoDI</i> em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h <i>post-mortem</i> , P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comuns (MAF)	92
Tabela 19. Descrição dos SNPs identificados no gene <i>CALCA</i> em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h <i>post-mortem</i> , P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comum (MAF)	95

Tabela 20. Descrição dos SNPs localizados no gene <i>ASAPI</i> presentes no <i>Illumina BovineHD BeadChip</i>	96
Tabela 21. SNPs incluídos em cada um dos haplótipos formados com os SNPs no gene <i>ASAPI</i> representados na plataforma <i>Illumina BovineHD BeadChip</i>	100
Tabela 22. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs 1526C>T e 2342T>C do gene <i>KCNJ11</i> em animais Nelore, incluindo animais que não possuem fenótipos.	101
Tabela 23. Resumo dos resultados da análise de associação entre as medidas de força de cisalhamento e dois polimorfismos no gene <i>KCNJ11</i> em animais da raça Nelore.....	102
Tabela 24. Frequência genotípica para os haplótipos do gene <i>ASAPI</i>	105
Tabela 25. Estimativa dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 8 do gene <i>ASAPI</i> que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.	107
Tabela 26. Estimativa dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 8 do gene <i>ASAPI</i> que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 7 dias após o abate.	108
Tabela 27. Estimativa dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 9 do gene <i>ASAPI</i> que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.	109
Tabela 28. Estimativa dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 9 do gene <i>ASAPI</i> que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.	109
Tabela 29. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene <i>KCNJ11</i> nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.	112
Tabela 30. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene <i>MyoDI</i> nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.	114
Tabela 31. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene <i>ASAPI</i> nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.	114

Sumário

1. Enunciado do problema e revisão bibliográfica	13
1.1.Considerações Iniciais	13
1.2. Revisão de literatura	16
1.2.1. <i>Bovinocultura no Brasil</i>	16
1.2.2. <i>Raça Nelore</i>	17
1.2.3. <i>Características que afetam a qualidade da carne</i>	18
1.2.4. <i>Fatores que afetam o amaciamento da carne bovina</i>	19
1.2.5. <i>Marcadores moleculares e seleção assistida por marcadores</i>	20
1.2.6. <i>Estudo de associação genômica ampla</i>	21
1.2.7. <i>Sequenciamento de DNA</i>	21
1.2.8. <i>Genes candidatos</i>	22
1.2.8.1. <i>Gene candidato KCNJ11</i>	23
1.2.8.2. <i>Gene candidato MYOD1</i>	23
1.2.8.3. <i>Gene Candidato CALCA</i>	24
1.2.8.4. <i>Gene candidato ASAP1</i>	24
1.3. <i>Objetivos</i>	25
1.4. Referências	26
2. Associação genômica ampla para características de qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo	31
2.1. Associação genômica para características de qualidade de carne em bovinos de corte da raça Nelore	31
2.1.1. Resumo	31
2.1.2. Introdução	32
2.1.3. Materiais e Métodos	33
2.1.4. Resultados e Discussão	37
2.1.5. Conclusão	48
2.2. Efeitos de loci de características quantitativas no conteúdo mineral do músculo Longissimus dorsi em bovinos.	49
2.2.1. Resumo	49
2.2.2. Introdução	50
2.2.3. Material e Métodos	51
2.2.4. Resultados e discussão	53
2.2.5. Conclusão	64
2.3. Referências	65
3. Capítulo 3. Identificação de genes Candidatos para maciez de carne na raça Nelore.	71
3.1. Resumo	71
3.2. Introdução	72
3.3. Material e Métodos	74
3.3.1. <i>Animais e Coleta de dados fenotípicos</i>	74
3.3.2. <i>Extração de DNA</i>	74
3.3.3. <i>Seleção de animais extremos fenotípicos</i>	74
3.3.4. <i>Sequenciamento dos genes KCNJ11, CALCA e MyoD1 pela metodologia de Sanger</i>	75
3.3.6. <i>Sequenciamento de próxima geração de fragmentos do gene CALCA</i>	78
3.3.7. <i>Análise do sequenciamento de próxima geração e descrição de SNPs</i>	80

3.3.8 Avaliação dos efeitos dos SNPs selecionados nos genes candidatos.	81
3.3.8. Reconstrução da fase de ligação e blocos haplotípicos dos SNPs localizados no gene ASAP1	82
3.3.9. Extração de RNA e dados de expressão gênica	83
3.3.10. Análises estatísticas	85
3.4. Resultados e discussão	86
3.4.1. Estatística descritiva das características de produção de carne.....	86
3.4.2. Análises de variância para força de cisalhamento nos diferentes tempos de maturação da carne	87
3.4.3. Identificação de SNPs nos genes candidatos sequenciados e escolha de SNPs para avaliação na população	89
3.4.4. Descrição dos SNPs presentes na plataforma Illumina BovineHD BeadChip localizados no gene ASAP1 e construção de haplótipos	96
3.4.5. Estudo dos efeitos das associações entre os marcadores e as medidas de força de cisalhamento em nível populacional.....	101
3.4.6. Estudo dos efeitos das associações entre os níveis de expressão dos genes KCNJ11, MyoD1 e ASAP1 e as medidas de força de cisalhamento	111
3.5. Conclusão	114
3.6. Referências	116

1. Enunciado do problema e revisão bibliográfica

1.1.Considerações Iniciais

No cenário mundial, o Brasil figura com o principal rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 211.279 milhões de cabeças em 2012, segundo os dados da pesquisa de produção pecuária municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Nos últimos anos os países da União Européia (UE) passaram a ser os maiores importadores da carne bovina brasileira, atingindo um total de 21% das exportações (ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA, 2010). Os gados zebuínos (*Bos indicus*), originários da Ásia, são predominantes no rebanho nacional devido a sua maior adaptabilidade e resiliência em ambientes tropicais, pois quando comparados com os de origem européia, apresentam maior tolerância ao calor, resistência a parasitas e fertilidade.

Considerando toda extensão do território brasileiro, a raça Nelore destaca-se em número de animais e em seu desempenho reprodutivo e produtivo, devido a sua adaptação tanto ao ambiente quanto ao sistema de produção brasileiro, além de ser importante em cruzamentos com as raças de origem européia, visando usufruir do ganho de heterose (RESTLE *et al.*, 2000).

A importância da pecuária de corte para o agronegócio brasileiro aumenta à medida que cresce o consumo de carne, o que é acompanhado por aumento no nível de exigência do mercado consumidor (COSTA *et al.*, 2007). Sendo o Brasil o maior exportador de carne bovina do mundo, é necessário preocupar-se com as características que influenciam a qualidade da carcaça e da carne bovina, visando assim atender às exigências tanto dos frigoríficos que compram carcaças bovinas como do mercado externo.

Por décadas, os programas de melhoramento de gado de corte têm se concentrado em melhorar características de crescimento (ARTHUR *et al.*, 2001; DECKER *et al.*, 2012), apesar da importância da qualidade da carne e do rendimento de carcaça, que impactam sobre a satisfação dos consumidores e o preço do produto. Menos atenção tem sido dada para o melhoramento genético de características como espessura de gordura subcutânea (EGS), maciez de carne e área de olho de lombo (AOL), uma vez que essas possuem mensuração mais cara, laboriosa e tardia.

A maciez da carne tem sido identificada como um grande problema da indústria de carne bovina, especialmente em animais de origem Zebuína (JOHNSON *et al.*, 1990). A seleção

para maciez e outros atributos de qualidade da carne não tem sido efetiva em programas de melhoramento de gado de corte no Brasil. A quantificação da variação genética existente e a prospecção de genes ou segmentos genômicos que influenciam características de qualidade de carne na população de interesse são fundamentais para o estabelecimento de critérios quantitativos e moleculares para a seleção (PAGE *et al.*, 2002).

Em 2009, o genoma de uma fêmea da raça Hereford, conhecida como *Dominette*, foi sequenciado pelo consórcio de análise e sequenciamento do genoma bovino, em inglês: “*Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium* ou *Bovine HapMap Consortium*”. Os resultados publicados (*The Bovine HapMap Consortium*, 2009) apresentaram um grande impacto e revolucionaram as pesquisas na área de pecuária. As análises do genoma bovino, incluindo mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e, mais recentemente, a genotipagem em larga escala e o sequenciamento de nova geração, poderão contribuir para a seleção precoce de bovinos e para o melhor entendimento de mecanismos que controlam características complexas. Com o uso dos marcadores moleculares pretende-se aumentar a eficiência da seleção, antecipando e aumentando a acurácia da seleção (DAVIS; DENISE, 1998). A seleção assistida por marcadores pode auxiliar a seleção tradicional, sendo que o máximo benefício poderá ser obtido quando as duas estratégias forem utilizadas simultaneamente.

Pesquisas principalmente em bovinos *Bos taurus* identificaram QTLs nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 18, 20, 25 e 29 para características de qualidade de carne (ALEXANDER *et al.*, 2007; CASAS *et al.*, 1998, 2000, 2001, 2003; DAVIS *et al.*, 2009; GILL *et al.*, 2009, 2010; GUTIERREZ *et al.*, 2008; IMUMORIN *et al.*, 2011; KEELE *et al.*, 1999; REARDON *et al.*, 2010; REXROAD *et al.*, 2001; STONE *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2009). Entretanto, não está claro se essas regiões também contribuem para variação das mesmas características em bovinos *Bos indicus*.

O desenvolvimento das novas tecnologias de genotipagem permitiu a análise de milhares de marcadores simultaneamente. Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association studies* - GWAS) têm sido utilizados para estimar valores genéticos genômicos para seleção genômica e também na identificação de QTL associado com características complexas. Esta abordagem requer que milhares de marcadores moleculares, abrangendo todo o genoma, sejam genotipados em uma população de indivíduos fenotipados, em que o número de

marcadores é calibrado em relação à medida de desequilíbrio de ligação (DL) dentro da população para assegurar que QTL de grandes efeitos não sejam perdidos, simplesmente porque eles estão além do alcance do DL dos marcadores mais próximos (TIZIOTO *et al.*, 2013).

A mineração de regiões associadas com características complexas em estudos de associação genômica ampla e o mapeamento de genes candidatos devem ser úteis para identificação de genes e mutações causais. Antes mesmo do advento do GWAS, estudos vinham sendo realizados a fim de identificar marcadores moleculares e desenvolver testes comerciais de genotipagem constituídos de polimorfismos em genes específicos, localizados em regiões de QTL ou que apresentam funcionalidade relacionada às características de interesse comercial em bovinos. A frequência desses marcadores muda consideravelmente entre raças e populações, de tal forma que estudos com diferentes populações são necessários para caracterizar adequadamente o efeito e a significância estatística das associações entre esses polimorfismos e características economicamente importantes, antes que essas informações possam ser utilizadas eficientemente pelos produtores (SCHENKEL *et al.*, 2005).

Genes candidatos posicionais e funcionais para maciez da carne têm sido identificados. Pesquisas demonstram que proteases neutras dependentes de íons de cálcio denominadas Calpaínas, que existem em pelo menos duas formas, μ -Calpaínas e m-Calpaínas, estão associadas com o amaciamento *post-mortem* do músculo esquelético (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999). A Calpastatina, enzima que inibe a ação das Calpaínas, é a principal responsável pela regulação da atividade proteolítica *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1988). Estudos têm investigado a associação entre polimorfismos localizados nos genes da Calpaína (μ -Calpaínas e m-Calpaínas) e da Calpastatina e maciez da carne em diferentes populações de bovinos (PAGE *et al.*, 2002; SCHENKEL *et al.*, 2006). Marcadores moleculares nestes genes já têm sido utilizados comercialmente em bovinos, porém não explicam completamente a variação genética da maciez da carne (SNELLING *et al.*, 2009). A identificação de novos segmentos genômicos, genes candidatos e seus polimorfismos pode contribuir para a explicação da variação genética e para o estabelecimento de critérios de seleção para essa característica.

Grande parte dos estudos que envolvem a avaliação das associações entre polimorfismos e características de interesse comercial para bovinos de corte é realizada com bovinos de raças taurinas, provavelmente por sua extensa produção em países europeus e na América do Norte, que lideram as pesquisas na área, havendo escassez de informações

específicas para animais *Bos indicus*. Os resultados apresentados nesta tese, de identificação de QTL, genes e polimorfismos especificamente para a raça Nelore deverá contribuir para a aplicação da genética molecular ao melhoramento dessa raça no Brasil.

1.2. Revisão de literatura

1.2.1. Bovinocultura no Brasil

O Brasil é o principal exportador de carne bovina mundial. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), o Brasil atingiu um novo recorde de exportações do agronegócio em 2011, alcançando US\$ 79,8 bilhões, o que representa um crescimento de 19,7%, entre abril de 2010 e março de 2011. A vantagem competitiva do Brasil no cenário mundial deve-se principalmente ao custo de produção do bovino brasileiro, que é um dos mais baixos do mundo.

Por outro lado, para manter e ampliar a posição do Brasil como um dos países que mais produz e exporta carne bovina, é necessário adequar a produção brasileira de carne aos padrões e exigências estabelecidos pelos importadores (PEROTTO *et al.*, 1999). Transformar a carne brasileira em produto destacado, com valor agregado, é um desafio do agronegócio brasileiro. Para isso, há alternativas disponíveis ao produtor rural, como por exemplo, o uso do confinamento e consequente aumento do ganho de peso, melhor aproveitamento da terra e melhoria da qualidade de carcaça e da carne dos animais (ARBOITTE *et al.*, 2004).

A pecuária de corte no Brasil, segundo Cezar *et al.*, 2005, apresenta desde uma pecuária extensiva, suportada por pastagens nativas e cultivadas de produtividade reduzida e pouco uso de insumos, até uma pecuária considerada intensiva, com pastagens de alta produtividade, suplementação alimentar em pasto e sistemas de confinamento. Entretanto, a atividade agropecuária, independente do sistema de produção, é caracterizada pelo predominante uso de pastagens.

Independente do grau de intensidade dos sistemas, os rebanhos apresentam uma predominância do gado zebuino, em especial da raça Nelore. As raças zebuínas (*Bos indicus*), originárias da Ásia, representam cerca de 80% do rebanho nacional, isto se deve ao fato de que, no contexto ambiental brasileiro, quando comparados com as raças de origem européia (*Bos*

taurus), apresentam maior tolerância ao calor, resistência a parasitas e fertilidade, o que reflete em maior produtividade.

1.2.2. Raça Nelore

No território brasileiro, a raça Nelore se destaca em número de animais e em seu desempenho reprodutivo e produtivo, além de ser importante em cruzamentos com as raças de origem européia, visando usufruir do ganho através da heterose (RESTLE *et al.*, 2000).

O germoplasma do Nelore brasileiro consiste principalmente de animais importados para o Brasil entre 1920 e 1963 da Índia, onde eles eram conhecidos como Ongole (VOZZI *et al.*, 2006). A raça Nelore (Figura 1) constitui um grande patrimônio genético para a bovinocultura brasileira como produtora de carne em função dos índices de desempenho econômicos notáveis (COSTA *et al.*, 2007).

De acordo com Magnabosco *et al.*, (1997), seis touros importados (Goliasimp, Godhavariimp, Karvadiimp, Kurupathyimp, Mahalimp, Tajimp e Rastãimp) contribuíram significativamente para a formação do rebanho Nelore brasileiro, representando quase 20% dos genes presentes no rebanho atual, sendo então considerados a base genética da raça Nelore no Brasil. Estima-se que o número de touros importados não foi superior a 7.000. As linhagens dentro da raça Nelore podem ser divididas em importada e nacional. A linhagem importada é constituída por animais trazidos para o Brasil, que se destacaram pelas características fenotípicas que possuíam. As linhagens predominantes da raça Nelore são: Karvardi, Taj Mahal, Golias, Godhavari e Rastan (MAGNABOSCO *et al.*, 1997).

A maior parte da produção de bovinos mundial é centrada na utilização de raças de de origem taurina. No entanto, raças Zebuínas, como por exemplo a raça Nelore, têm sido utilizadas em cruzamentos. Por exemplo, a raça Brahman é predominantemente usada nos EUA para formar animais cruzados com raças taurinas. A maioria das ferramentas genômicas disponíveis foram desenvolvidas em bovinos *Bos taurus*, o que leva a um atraso na transferência de tecnologia para rebanhos Zebuínos. O desenvolvimento de estratégias genéticas na raça Nelore, além de contribuir para programas de melhoramento da raça no Brasil, poderá contribuir para transferência de tecnologia para países que se beneficiam da heterose utilizando raças Zebuínas em cruzamentos.



Figura 1. Animais da raça Nelore, componentes deste projeto, confinados na Embrapa CPPSE.
Fonte: autoria própria

1.2.3. Características que afetam a qualidade da carne

A qualidade da carne bovina deve corresponder às expectativas dos consumidores no que diz respeito à qualidade sanitária, nutritiva e organoléptica. A cor, a quantidade e a distribuição de gordura subcutânea e intramuscular, a maciez, a suculência e o sabor da carne são alguns dos atributos requeridos pelos consumidores (FELÍCIO, 1999).

A cor da carne, relacionada ao frescor do produto, é influenciada por fatores como a raça e a idade do animal, a capacidade de retenção de água, o grau de deterioração da carne e a quantidade de gordura. A suculência, que aumenta o sabor e contribui para a maciez da carne, é influenciada pela quantidade de água retida no produto acabado e quantidade de gordura. A gordura subcutânea, além de ser um componente notável no sabor da carne bovina, atua como isolante térmico, sendo assim, um fator importante na conservação da carne. A maciez da carne está relacionada a diferentes fatores, como a genética, a idade do animal, a raça, o sexo e a maturidade (FELÍCIO, 1999). Segundo Restle *et al.*, (1999) a maciez da carne diminui com o aumento da proporção de Zebu nos animais. A maciez da carne é a maior característica de patabilidade que influencia a aceitabilidade do consumidor (WHIPPLE *et al.*, 1990).

A mensuração da maciez de carne, realizada por meio da medição da força de cisalhamento exige coleta de amostras após o abate, sendo de difícil operacionalização, além de comprometerem a comercialização do corte amostrado. Além disso, essa medida só pode ser realizada no final do ciclo produtivo, o que dificulta o processo de seleção, tornando a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) atraente, como um recurso adicional em programas de seleção e melhoramento de bovinos de corte.

1.2.4. Fatores que afetam o amaciamento da carne bovina

O processo de amaciamento da carne após o abate é complexo, envolvendo várias alterações enzimáticas. Das diferentes alterações bioquímicas e ultra-estruturais que ocorrem na carne, um papel-chave de ruptura fibrilar tem sido atribuído à ação de enzimas, especialmente catepsinas lisossomais B e L. No entanto, todas as mudanças até agora identificadas só podem ser explicadas por uma ação sinérgica de proteinases lisossomais e cálcio-dependentes, que agem além ou em conjunto com enzimas proteolíticas. O enfraquecimento das miofibrilas pode também ser mediado pela elevada força iônica alcançada nos músculos pós - morte (QUALI, 2007).

Estudos demonstram que há evidências de que o comprimento do sarcômero é determinante da resistência em músculo *Longissimus dorsi*, e que a proteólise pós-morte, resultante da atividade da μ -calpaína regulada pela calpastatina, é o principal determinante de amaciamento do músculo durante o envelhecimento (VEISETH *et al.*, 2004). No entanto, dados experimentais sugerem que a proteólise de proteínas miofibrilares é a principal razão para a melhoria na maciez da carne durante o armazenamento pós-morte (KOOHMARAIE, 2003). Assim, o amaciamento do músculo *Longissimus dorsi* após o armazenamento refrigerado após o abate é influenciado pela proteólise pós-morte e sua interação com comprimento de sarcômero (VEISETH *et al.*, 2004).

Especulativamente, o enfraquecimento e / ou degradação dos discos Z e da desmina (e provavelmente a degradação de titina) são responsáveis pelo aumento da fragilidade das miofibrilas durante o amaciamento pós- morte. A Calpaína é o sistema proteolítico que tem todas as características que são necessárias para provocar alterações pós- morte que resultam no amaciamento da carne. Sem dúvida, outros fatores como pH, taxa de declínio da temperatura durante o desenvolvimento do rigor e força iônica também influenciam o processo. No entanto,

acredita-se que a taxa e a extensão da proteólise pós-morte explicam melhor a variação observada na maciez a uma idade constante (KOOHMARAIE, 2003).

1.2.5. Marcadores moleculares e seleção assistida por marcadores

Marcadores moleculares são variantes na sequência de DNA e podem ser utilizados para acompanhar a dinâmica dos genes em populações. Estes podem estar ligados a locos que determinam características de interesse, situação adequada para realizar a seleção assistida por marcadores (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005). Sua principal aplicação em programas de melhoramento genético animal tem sido em análises de paternidade, que fornecem informações exatas de pedigree e auxiliam na correta estimativa do valor genético, e para o diagnóstico de doenças monogênicas. Um exemplo dessa abordagem é a utilização de polimorfismos de única base (SNPs) como marcadores moleculares. Estes polimorfismos são variações abundantes no genoma, presentes em indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies próximas (JORDAN *et al.*, 2002), e se diferenciam de mutações raras pelo fato do alelo menos abundante estar presente em uma frequência de pelo menos 1% na população.

Assim, a genética molecular pode ser integrada aos métodos tradicionais de seleção artificial de fenótipos, através da aplicação da seleção assistida por marcadores (SAM), o que pode propiciar um aumento na eficiência da seleção artificial. Para isso, é necessário obter os genótipos dos locos marcadores moleculares, bem como os valores fenotípicos, em algumas centenas a milhares de indivíduos. Quanto maior o número de marcadores associados, maior proporção da variância genética poderá ser explicada (LANDE; THOMPSON, 1989).

Poucas mutações causais subjacentes à variação de características quantitativas foram identificadas, como por exemplo, a do gene “halotano” (*ryanodine receptor gene -RYR1*), que afeta qualidade de carne suína por causar a síndrome estresse, conhecida como PSE, pálida, dura e exudativa (FUJII *et al.*, 1991). Consequentemente, a maioria dos testes utilizados para predição de valores genéticos moleculares, por não serem constituídos de mutações causais, dependem de estabelecer a relação de fase entre SNP e/ou alelos do QTL (ou haplótipos que podem conter vários QTL), que em grande parte, faz com que o teste seja raça-específico (ROLF *et al.*, 2014). Sendo assim, é importante realizar estudos em cada raça ou até mesmo populações específicas antes de aplicar tecnologias moleculares em programas de melhoramento animal.

1.2.6. Estudo de associação genômica ampla

Enquanto os programas de melhoramento genético animal têm utilizado registros de desempenho e dados de pedigree na indústria de carne bovina por mais de quatro décadas, a incorporação de informação genômica em avaliações genéticas, e a possibilidade de implementação de ferramentas genômicas na indústria é relativamente nova (ROLF *et al.*, 2014).

As características de importância econômica são características quantitativas, influenciadas por vários genes em diferentes loci dentro do genoma, que geralmente têm efeito pequeno. Atualmente através da genotipagem em larga escala há a possibilidade de analisar milhares de marcadores simultaneamente. Esta análise em larga escala pode ser aplicada, por exemplo, na seleção genômica. A seleção genômica, segundo Resende *et al.* (2008), pode ser definida como a seleção simultânea para centenas ou milhares de marcadores, os quais cobrem o genoma densamente, de forma que todos os genes que controlam um determinado caráter quantitativo estejam em desequilíbrio de ligação com pelo menos parte dos marcadores, sendo que esses marcadores podem explicar quase a totalidade da variação genética de um caráter quantitativo.

O principal interesse em estudos de associação genômica ampla (GWAS) é encontrar marcadores para melhorar a acurácia dos valores genéticos e o entendimento do controle genético de características economicamente importantes. Identificar os genes que afetam essas características também irá fornecer embasamento sobre o provável efeito da seleção sobre estas mutações (PRYCE *et al.*, 2010).

A aplicação da genômica na pecuária já tem sido efetiva, por exemplo, para doenças monogênicas ou testes de paternidades. No entanto, o custo de genotipagem de ensaios de alta densidade tem limitado a transferência dessa tecnologia ao produtor. Usuários dessa tecnologia dentro da indústria de carne têm cobijado soluções genômicas simples, como é o caso de traços monogênicos ou de verificação de parentesco. Para características quantitativas, as soluções são geralmente complexas e sofrem de limitações, incluindo o custo e especificidade da população (ROLF *et al.*, 2014).

1.2.7. Sequenciamento de DNA

Sequenciamento de DNA é o processo de determinação da ordem de nucleotídeos dentro de uma molécula de DNA. Esta técnica tem sido utilizada para determinar a sequência de genes,

grandes regiões genômicas, cromossomos inteiros ou até mesmo genomas completos. A metodologia de *Sanger* de sequenciamento de DNA, que utiliza nucleotídeos terminadores (didesoxinucleotídeos terminadores - ddNTPs), lançada em 1977 (SANGER *et al.*, 1977) proporcionou primeiramente uma ferramenta para decifrar genes e posteriormente genomas completos. Essa metodologia tornou-se o método de sequenciamento de DNA utilizado nas últimas décadas (SCHUSTER, 2005). No entanto, o sequenciamento de Sanger é caro e trabalhoso, não sendo adequado para aplicações a níveis genômicos e para o sequenciamento de genomas ainda não anotados.

Impulsionado pelos avanços tecnológicos, os últimos anos têm testemunhado o surgimento de novos métodos para análise do genoma em larga escala. Cada método oferece uma maneira única, entretanto complementar, de visualização da organização do genoma e função celular (HAWKINS *et al.*, 2010).

Muitas tecnologias de alta capacidade foram desenvolvidas para interrogar vários aspectos dos processos celulares, incluindo a sequência e variação estrutural em nível genômico, transcriptômico, epigenômico, proteômico e interatômico (HAWKINS *et al.*, 2010). As plataformas de sequenciamento massivo de DNA têm se tornado amplamente disponíveis, reduzindo o custo e possibilitando o sequenciamento de um grande genoma em um curto tempo, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma alvo. Além de possibilitar a reunião de informações de sequência do genoma mais rapidamente, fornece mais informações do genoma em nível funcional (MARDIS, 2008).

1.2.8. Genes candidatos

A abordagem de genes candidatos tem sido aplicada a estudos de uma série de características-alvo em várias espécies, na tentativa de elucidar a sua base genética (BROWN *et al.*, 2013). Genes podem ser candidatos posicionais, quando estão localizados em uma região cromossômica associada com a característica de interesse e/ou candidatos funcionais, quando estão envolvidos na via metabólica de interesse e codificam uma proteína que está relacionada com a característica fenotípica em estudo.

Apesar do conhecimento sobre a função biológica de um gene ser um indicativo do possível envolvimento do mesmo nas características fenotípicas que envolvem esses processos biológicos, isso não implica necessariamente no envolvimento de variantes genéticas desse gene

na variação fenotípica. A variação fenotípica pode ser causada, por exemplo, por variantes em genes que regulam o gene que foi considerado inicialmente como potencial candidato para associação em função de seu papel biológico, ou até mesmo por variantes em elementos regulatórios, tais como *enhancers* e promotores.

1.2.8.1. Gene candidato *KCNJ11*

O Gene *KCNJ11* (do inglês *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11*), está localizado no cromossomo 15 de bovinos, próximo a um QTL para maciez de carne (REXROAD *et al.*, 2001). Por inferência computacional, segundo dados do Reactome (<http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html>) o gene *KCNJ11* está envolvido na via metabólica de diabetes, integração do metabolismo energético e regulação da secreção de insulina em bovinos.

Estudo conduzido por Alekseev *et al.*, 2010 em camundongos, demonstrou que a inativação do gene *KCNJ11* causou a redução de depósitos de glicogênio e gordura corporal, produzindo um fenótipo magro, porém a restrição à obesidade foi alcançada ao custo de comprometer a resistência física através da fraqueza muscular.

1.2.8.2. Gene candidato *MYOD1*

O gene *MyoD1* (*Myogenic Differentiation 1*) também está localizado no cromossomo 15 aonde há relatos de QTL para maciez de carne (REXROAD *et al.*, 2001), próximo ao gene *KCNJ11*. O *MyoD1* é um membro da família de proteínas MYOD, que apresentam uma *Helix-loop-helix* (HLH) que são fatores determinantes de linhagens miogênicas e agem como reguladores transcricionais para todos os genes específicos do músculo esquelético (RUDNICKI *et al.*, 1993). O gene *MyoD1* está envolvido no desenvolvimento muscular, na regulação positiva do músculo esquelético, na regeneração do tecido, na diferenciação de mioblastos, na regulação positiva de diferenciação da célula muscular, no desenvolvimento de tecido do músculo esquelético, na adaptação da fibra muscular esquelética e desenvolvimento, entre outros processos e, portanto é um candidato a influenciar características de produção (BHUIYAN *et al.*, 2009).

O gene *MyoD1* tem sido identificado como um regulador chave da diferenciação muscular esquelética através da regulação da expressão gênica. Recentemente foi elucidado o

papel desse gene como potenciadores (“enhancers”) que aumentam a transcrição de genes essenciais para o desenvolvimento muscular e especificação das linhagens celulares (BLUM; DYNLACHT, 2013).

Este gene apresenta uma região altamente conservada que desempenha um importante papel na iniciação, manutenção e regulação de características fenotípicas (UJAN *et al.*, 2011), apesar disso, poucos estudos como o de Curi *et al.* (2012), têm avaliado o papel desse gene em características de produção em bovinos.

1.2.8.3. Gene Candidato *CALCA*

O gene calcitonin-related polypeptide alpha (*CALCA*) também está localizado no cromossomo 15, na mesma região que estão localizados os genes *KCNJ11* e *MyoD1*.

Este gene codifica um hormônio que tem função relacionada com a regulação do cálcio e atua para regular o metabolismo de fósforo. Esse hormônio provoca uma queda rápida, mas de curta duração no nível de cálcio e fosfato no sangue, promovendo a incorporação desses íons nos ossos.

O gene *CALCA*, por sua função na regulação de níveis de Cálcio, fator-chave no amaciamento *post-mortem*, foi apontado por Rexroad *et al.* (2001) como um gene candidato mapeado dentro do intervalo do QTL descrito para maciez no cromossomo 15.

Apesar do função intuitiva do gene *CALCA* no amaciamento *post-mortem*, devido a importância dos níveis de Cálcio para o sistema proteolítico da Calpaína e Calpastatina que é o principal componente do mecanismo de proteólise da carne (PAGE *et al.*, 2002; CASAS *et al.*, 2006; SCHENKEL *et al.*, 2006), nenhuma pesquisa tem testado o real papel desse gene na maciez da carne até o momento.

1.2.8.4. Gene candidato *ASAP1*

O gene *ASAP1* (ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1) codifica uma proteína ligante de SH3 Src (Src homology 3) e está localizado no cromossomo 14 de bovinos, no qual há inúmeros relatos de QTL para deposição de gordura e características de crescimento. Proteínas que interagem com domínios SH3 tipicamente têm uma sequência consenso PXXP (P: prolina e X: qualquer outro amino ácido). Resíduos adjacentes de prolina

formam contatos com a estrutura SH3 e essa interação determina a especificidade entre a proteína e um domínio SH3 encontrado em numerosas proteínas de transdução de sinal, envolvidas no crescimento e diferenciação celular. A proteína codificada pelo gene *ASAPI* é ativadora do fator de GTPases ou Guanosina trifosfatases (domínio Arf-GAP) que ribosila ADP. Várias proteínas de transdução de sinal envolvidas na diferenciação de fibroblastos em adipócitos têm sido avaliadas utilizando culturas de tecidos de diversas linhagens celulares como sistema modelo. Estudo conduzido por KING *et al.*, (1999) indica que *ASAPI*, é uma importante proteína de transdução de sinal envolvida na diferenciação de fibroblastos em adipócitos e possivelmente de outros tipos celulares, sendo assim esse gene está envolvido no processo de adipogênese.

A expressão ectópica do *ASAPI* em fibroblastos resultou na diferenciação de uma fração significativa da cultura em adipócitos. Este fenótipo parece estar relacionado à indução do fator de transcrição PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), uma vez que células “DDEF-1 NIH 3T3” que apresentaram expressão ectópica (uma linhagem celular contínua de alta inibição de contato estabelecida a partir de culturas de embriões de camundongo NIH Swiss) demonstraram nível aumentado de RNAm PPAR γ quando tratadas com ativadores de ligantes PPAR γ e induziram a diferenciação celular (KING *et al.*, 1999).

Veneroni *et al.* (2010) identificaram um polimorfismo localizado no íntron 13 do gene *ASAPI* associado com espessura de gordura na raça Canchim. Posteriormente, Tizioto *et al.* (2012) demonstraram que esse mesmo SNP está associado com força de cisalhamento em uma amostra da população Nelore utilizada nesse estudo. Mais recentemente, um estudo de associação genômica ampla também identificou o gene *ASAPI*, localizado em uma região de QTL identificada, como um potencial candidato a influenciar a maciez de carne nessa população Nelore (TIZIOTO *et al.*, 2013)

1.3. Objetivos

O presente estudo objetivou identificar regiões e genes candidatos associados com características de qualidade de carne e teor de minerais no músculo *Longissimus dorsi* utilizando tanto a estratégia de associação genômica ampla, quanto a de resequenciamento e perfil de expressão de genes-alvo.

1.4. Referências

ALEKSEEV, A.E. et al. Sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels control energy expenditure determining body weight. **Cell Metabolism**, v.11, p. 58–69, 2010.

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

ALZATE-MARIN, A.L. et al. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, 2005.

Anuário da Pecuária Brasileira – ANUALPEC. São Paulo: FNP, 2010.

ARBOITTE, M. Z. Et al. Composição Física da Carcaça, Qualidade da Carne e Conteúdo de Colesterol no Músculo Longissimus dorsi de Novilhos 5/8 Nelore - 3/8 Charolês Terminados em Confinamento e Abatidos em Diferentes Estádios de Maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.959-968, 2004.

ARTHUR, P.F.; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science** v. 68, p.131-139, 2001.

BHUIYAN, M.S.A. et al. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle. **Livestock Science**, v.126, p.292-297, 2009.

BLUM, R.; DYNLACHT, B.D. The role of *MyoD1* and histone modifications in the activation of muscle enhancers. **Epigenetics**, v.8, n.8, p.778–784, 2013.

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.324, n.5926, p522-8, 2009.

BROWN, E.A. et al. Detecting genes for variation in parasite burden and immunological traits in a wild population: testing the candidate gene approach. **Molecular Ecology**, v.22, n.3, p. 757–773, 2013.

CASAS, E. et al. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 468–473, 1998.

CASAS, E. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2976–2983, 2003.

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

- CASAS, E. et al. Comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the Myostatin gene. **Journal of Animal Science**, v.79, p.854–860, 2001.
- CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520-525, 2006.
- CEZAR, I.M. et al. **Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate**, 2005. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte.
- COSTA, D. Et al. Características de carcaça de novilhos inteiros Nelore e F1 Nelore X Holandês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 687-696, 2007.
- CURI. Et al. Candidate SNPs for carcass and meat traits in Nelore animals and in their crosses with Bos Taurus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 294-301, fev. 2012.
- DAVIS, G.P. et al. QTL for meat tenderness in the M. Longissimus dorsi lumborum of cattle. **Animal Genetics**, v.39, p.40–45, 2008.
- DAVIS, G. P; DANISE S. K. The Impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, v. 76 p. 2331–2339, 1998.
- DECKER, J.E. et al. A novel analytical method, Birth Date Selection Mapping, detects response of the Angus (Bos taurus) genome to selection on complex traits. **BMC Genomics**, v.13, p.606, 2012.
- FELÍCIO, P. E. Qualidade da carne bovina: características físicas e organolépticas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.89-97.
- FUJII, J. Et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, 253, 448-451, 1991.
- GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2685-2692, 1999.
- GILL, J.L. et al. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.41, p 36, 2009
- GILL, J.L. et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. **Meat Science**, v.86, p. 985–993, 2010.

- GUTIERREZ-GIL, et al. Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. **Animal Genetics**, v.39, p. 51–61, 2008.
- IMUMORIN, I.G. et al. Genome scan for parent-of-origin QTL effects on bovine growth and carcass traits. **Frontiers in Genetics**, v.2, p.44, 2011.
- HAWKINS, R.D.; HON, G.C.; REN, B. Next-generation genomics: an integrative approach. **Nature Reviews**, v.11, p.476-486, 2010.
- JOHNSON, D.D.; HUFFMAN, R.D.; WILLIAMS, S.E. effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1980-1986, 1990.
- JORDAN, B. et al. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 99, n.5, p. 2942-2947, 2002.
- KEELE, J.W. et al. A region on bovine chromosome 15 influences beef Longissimus dorsi tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 1364–1371, 1999.
- KING, F.J. et al. DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.3, p.2330-7, 2009.
- KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. In: 1.RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1988, Laramie. **Proceedings...** p.89-100, 1988.
- KOOHMARAIE, M. et al. Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Proceedings...** Santa Maria: UFSM, 2003.
- LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. **Genetics**, v. 124, p.743-756, 1990.
- MAGNABOSCO, C. et al. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1997.
- MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.9, p.387–402. 2008.
- PAGE, B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.3077-3085, 2002.
- PEROTTO, D.; MOLETTA, J. L.; CUBAS, A. C. Características da carcaça de bovinos Canchim e Aberdeen Angus e de seus cruzamentos recíprocos terminados em confinamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 331-338, 1999.

- PRYCE, J.E. et al. A validated genome-wide association study in 2 dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3331–3345, 2010.
- QUALI, A. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A review. **Journal of Muscle Foods**, v.1, n.2, p.129-165, 2007.
- REARDON, W. et al. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. Longissimus dorsi* and *M. semimembranosus*. **Meat Science**, v.86, p. 270-275, 2010.
- RESENDE, M.D.V. et al. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.56, p.63-77, 2008.
- RESTLE, J.; BRONDANI, I.L.; BERNARDES, R.A.C. O novilho superprecoce. In: RESTLE, J. (Ed.). **Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte**. Santa Maria: Imprensa Universitária, 1999. p. 215 - 231.
- RESTLE, J. et al. Características de Carcaça de Bovinos de Corte Inteiros ou *CASTR*ados de Diferentes Composições Raciais Charolês X Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p.1371-1379, 2000.
- REXROAD, C.E. et al. Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. **Mammalian Genome**, v.12, p.561–565, 2001.
- ROLF, M.M.. et al. Genomics and the Beef Industry. **Livestock Science**, 2014. In press. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.06.005
- RUDNICKI, M.A. et al. Myod or myf-5 is required for the formation of skeletal-muscle. **Cell**, v.75, p. 1351–1359, 1993.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, n.12, p.5463-7, 1977.
- SCHENKEL, F. S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.9, n.83, p. 2009 - 2020, 2005.
- SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, n.2, p. 291-299, 2006.
- SCHUSTER, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, v.5, n.1, p.16-18, 2005.

- SNELLING, W.M. et al. Whole genome analysis for beef tenderness. In: BOVINE GENOME CONSORTIUM. New York, 2009. **Proceedings...** Cold Spring Harbor, 2009.
- STONE, R.T. et al. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. **Journal of Animal Science**, v.83, p.2280-2288, 2005.
- TIZIOTO, P.C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, p. 1012-1020, 2013.
- TIZIOTO, P.C. et al. A SNP in *ASAP1* gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, v.92, n.4, p.855-7, 2012.
- UJAN, J.A. et al. Back fat thickness and meat tenderness are associated with a 526 T→A mutation in the exon 1 promoter region of the MyF-5 gene in Chinese Bos taurus. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.4, p. 3070-3079, 2011.
- VEISETH, E. et al. Factors regulating lamb Longissimus dorsi tenderness are affected by age at slaughter. **Meat Science**, v.68, n.4, p.634-640, 2004.
- VENERONI, G.B. et al. Prospecting candidate SNPs for backfat in Canchim beef cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.4, p.1997-2003, 2010.
- VOZZI, A.P. et al. Structure and genetic variability in Nelore (*Bos indicus*) cattle by pedigree analysis. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 3, p.482-485, 2006.
- WHIPPLE, G. et al. Evaluation of attributes that affect Longissimus dorsi muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 2716-2728, 1990.
- ZHOU, G et al. Molecular cloning of the HGD gene and association of SNPs with meat quality traits in Chinese red cattle. **Molecular Biology Reports**, v.37, p.603-611, 2009.

2. Associação genômica ampla para características de qualidade de carne e conteúdo de minerais no músculo

2.1. Associação genômica para características de qualidade de carne em bovinos de corte da raça Nelore¹

2.1.1. Resumo

Características de qualidade de carne são economicamente importantes porque elas impactam a aceitação dos consumidores, que, por sua vez, influenciam a demanda por carne bovina. No entanto, a seleção para melhorar a qualidade da carne é limitada pelo pequeno número de animais em que a maciez pode ser avaliada em função do custo de realização das medidas de força de cisalhamento e o dano resultante para o corte de carne comercial. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) para força de cisalhamento (FC) medida em diferentes tempos de maturação da carne (24 horas, 7 dias e 14 dias), espessura de gordura subcutânea (EGS), área de olho de lombo (AOL), parâmetros de determinação de cor da carne e da gordura: luminosidade (L*), intensidade da cor vermelha (a*) e intensidade da cor amarela (b*)), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cocção (PC) e pH muscular, foram realizados utilizando os dados dos genótipos provindos da plataforma *Illumina BovineHD BeadChip* para identificar loci de características quantitativas (QTL) em animais da raça Nelore. A avaliação fenotípica foi realizada entre 430 e 536 animais, dependendo da característica. As características de qualidade de carne em animais da raça Nelore são controladas por numerosos QTLs de pequenos efeitos, com exceção de um pequeno número de QTLs de maior efeito identificado para o parâmetro a* de intensidade de cor da gordura e pH muscular. Regiões genômicas que abrigam os QTLs e as vias metabólicas nas quais os genes destas regiões atuam parecem diferir das relatadas em bovinos taurinos para características de qualidade de carne. Estes resultados permitem orientar futuros estudos de mapeamento de QTLs e o desenvolvimento de modelos para a predição do mérito genético para implementação da seleção genômica para a qualidade da carne em bovinos da raça Nelore.

¹ Tizioto, P.C. et al. A genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. *Physiological Genomics*, v. 45, n. 21, p. 1012-20, 2013.

2.1.2. Introdução

Por décadas, os programas de melhoramento de gado de corte têm se concentrado em melhorar características de crescimento (ARTHUR *et al.*, 2001; DECKER *et al.*, 2012). Apesar da importância das características de qualidade de carne devido ao seu impacto sobre a satisfação dos consumidores e o preço do produto, menos atenção tem sido dada para o melhoramento genético dessas características, porque elas são caras e difíceis de mensurar, além de serem observadas somente após o abate do animal. A maciez da carne tem sido identificada como um grande problema da indústria de carne bovina, especialmente em animais com ascendência de *Bos indicus*, pois sabe-se que animais cruzados com graus mais elevados de contribuição de bovinos *Bos indicus* têm menor maciez da carne (JOHNSON *et al.*, 1999).

Os programas de melhoramento animal tradicionais selecionam animais com base nos valores genéticos preditos, obtidos a partir de registros fenotípicos e pedigrees. No entanto, este método não objetiva a identificação dos genes e das vias metabólicas envolvidas nos traços fenotípicos alvos. O processo de seleção tradicional é lento se a característica somente pode ser medida no final da vida ou após a morte do animal, como é o caso da maciez da carne (HAYES; GODDARD, 2009). Pesquisas realizadas principalmente em bovinos *Bos taurus* identificaram QTLs nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 18, 20, 25 e 29 para características de qualidade de carne (ALEXANDER *et al.*, 2007; CASAS *et al.*, 1998, 2000, 2001, 2003; DAVIS *et al.*, 2009; GILL *et al.*, 2008 e 2010; GUTIERREZ *et al.*, 2008; IMUMORIN *et al.*, 2011; KEELE *et al.*, 1999; REARDON *et al.*, 2010; REXROAD *et al.*, 2001; STONE *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2009). No entanto, não está claro se estes loci contribuem para a variação das mesmas características em bovinos *Bos indicus*. Além disso, estudos de associação genômica ampla (GWAS) estão sendo cada vez mais utilizados para identificar QTLs associados com características complexas (FAN *et al.*, 2011; FERNANDO; GARRICK, 2009; MEUWISSEN *et al.*, 2001; MCCLURE *et al.*, 2012; PETERS *et al.*, 2012; VANRADEN, 2008). Esta abordagem requer que milhares de marcadores moleculares, abrangendo todo o genoma sejam genotipados em uma população de indivíduos fenotipados e que o número de marcadores seja calibrado em relação à medida de desequilíbrio de ligação (DL) da população para assegurar que QTLs de grande efeito não sejam perdidos simplesmente por estarem além do alcance do DL dos marcadores mais próximos.

O sucesso da seleção genômica depende da exploração do DL entre os marcadores e os QTLs que afetam traços fenotípicos alvos (RINCON *et al.*, 2011). Antes que a informação genética possa ser eficientemente utilizada por programas de melhoramento, estudos envolvendo diferentes raças e populações-alvo são essenciais para descrever com precisão as associações do marcador / QTL e sua fase de ligação com características de produção importantes em cada população. Raças bovinas diferem quanto à fase de ligação entre o marcador e os alelos do QTL e também quanto às frequências alélicas e, conseqüentemente, a importância dos efeitos dos QTLs pode ser diferente entre as raças. Este estudo identifica regiões genômicas relacionadas com a variação na força de cisalhamento (FC) medida após diferentes tempos de maturação da carne, espessura de gordura subcutânea (EGS), área de olho de lombo (AOL), parâmetros de determinação de características de cor da carne e da gordura (luminosidade (L*), intensidade da cor vermelha (a*) e intensidade da cor amarela (b*)), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cocção (PC) e pH muscular em bovinos de corte da raça Nelore, utilizando genótipos obtidos a partir da genotipagem no *Illumina BovineHD BeadChip* (Illumina Inc., San Diego, CA).

2.1.3. Materiais e Métodos

2.1.3.1. Animais e coleta de fenótipo.

Novilhos da raça Nelore provenientes de 34 touros representativos das principais linhagens comercializadas no Brasil foram genotipados. Famílias de meio-irmãos foram produzidas através de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Esses animais foram produzidos em três estações de monta e nascidos na base física da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada na cidade de São Carlos, na Embrapa Gado de Corte, situada no município de Campo Grande e em propriedades particulares dos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Posteriormente, foram confinados nas duas unidades da Embrapa e avaliados para características de eficiência alimentar, ganho de peso e deposição de gordura. Quando atingiram 5 mm de espessura de gordura subcutânea (medida obtida por ultrassonografia) peso e idade média de 383,2 Kg e 734 dias, respectivamente, os animais foram abatidos e foram feitas medidas de composição e qualidade da carcaça e da carne. A produção e avaliação fenotípica dos animais foram realizadas no âmbito do projeto em rede (Rede Bife de Qualidade) – Projeto Componente:

“Genética quantitativa e molecular de características de qualidade da carne e de eficiência alimentar na raça Nelore”, financiado pela Embrapa e liderado pela Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano.

A seleção dos touros foi realizada a partir de consultas aos catálogos das principais centrais de inseminação artificial do país. A partir de um número total de 616 touros Nelore das variedades mocha e aspada, foram eleitos para a composição desta amostra 32 touros ativos na população, ou seja, para os quais havia sêmen disponível no mercado, cujo valor não excedesse R\$ 50,00 a dose, a fim de representar touros acessíveis ao produtor típico da raça. Outro importante critério de seleção dos touros foi que os mesmos pertencessem às genealogias representativas das principais linhagens que compõem a raça Nelore, de uso comercial mais frequente dentro da raça. A escolha foi feita de maneira a minimizar o grau de parentesco entre eles. A avaliação do fenótipo para qualidade de carne para esses animais variou entre 430 e 536 indivíduos entre as características medidas. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, São Paulo, Brasil).

Os fenótipos para FC (kg), EGS (mm), AOL (cm²), CRA (%), parâmetros L*, a*, b* de cor da carne e da gordura, e PC (%) foram medidos a partir de bifés de 2,5 cm de espessura coletados no momento do abate na seção transversal do músculo *Longissimus dorsi dorsi* entre a 11^a e 13^a costela. Estes bifés foram identificados, embalados a vácuo e, se necessário, congelados para posterior análise. Os fenótipos EGS, AOL, CRA, parâmetros L*, a*, b* de cor, e PC foram medidos 24 horas *post-mortem*. Medidas de FC foram conduzidas em três bifés coletados entre a 11^a e 13^a costela, após 24 h (FC0), sete dias (FC7) e 14 dias (FC14) de maturação a 2 °C em uma câmara fria fabricada por Macquay Heatcraft do Brasil Ltda. (São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Os parâmetros L* a* e b* de cor foram determinadas após expor os bifés ao oxigênio atmosférico durante trinta minutos antes da análise, e cada característica foi medida em três locais em toda a superfície do bife utilizando um colorímetro Hunter Lab. modelo MiniScan XE com Software Universal v 4.10 (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA, EUA), iluminante D65 e observador normal 10°. O pH muscular também foi medido em três locais em todo o bife utilizando um instrumento pH Testo de medição, modelo 230 (Testo AG, Lenzkirch, Alemanha). A capacidade de retenção de água foi determinada usando uma técnica de compressão, na qual uma amostra de carne de 0,2 kg foi comprimida a uma força de 10 kg durante 5 minutos e a CRA foi estimada como a diferença entre o peso da amostra antes e depois

da compressão (HAMM, 1996). Após estas análises, para medir PC e FC, os bifes foram pesados e cozidos em forno combinado Tedesco, modelo TC 06 (Tedesco, Caxias do Sul, RS, Brasil), a 170 °C até que a temperatura no centro de cada amostra controlada por termopares ligados ao software FE- MUX (Flyever, São Carlos, SP, Brasil) atingisse 70 °C. As medidas FC foram obtidas utilizando o analisador de textura TA - XT2i acoplado a uma lâmina de Warner - Bratzler com espessura de 1,016 milímetros. A PC foi medida como a diferença de pesos antes e após o cozimento, expresso em porcentagem.

2.1.3.2. Extração de DNA e genotipagem

Palhetas de sêmen congelado obtidas a partir de centrais de inseminação artificial no Brasil foram utilizadas para extrair DNA dos touros pelo método de fenol-clorofórmio padrão (SAMBROOK *et al.*, 1990). Para a progênie, 5 mL de amostras de sangue foram coletados, por punção da veia jugular, em tubos para coleta a vácuo contendo EDTA potássico (K3) e as extrações de DNA foram realizadas utilizando o método *salting out* como descrito por Tizito *et al.* (2012). A concentração de DNA foi medida por espectrofotometria utilizando um NanoDrop®, e foi verificada a qualidade da relação da densidade óptica 260/280, seguido de inspeção da integridade por meio de eletroforese em gel de agarose.

Todos os animais foram genotipados utilizando o Illumina BovineHD BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA), quer no laboratório de genômica funcional bovina do USDA ARS em Beltsville, MD, EUA ou no Centro de Genômica da ESALQ, em Piracicaba, São Paulo, Brasil. Os genótipos foram decodificados no software Illumina Genome Studio. Os animais foram filtrados de acordo com call rate (<90%) e heterozigosidade (>40%). Loci foram excluídos se não puderam ser localizado exclusivamente a um autossomo ou ao cromossomo X, segundo a versão do genoma bovino UMD3.1, se não atingissem call rate de (<85%), se tivessem frequências de um alelo menor que 1% (*minor allele frequency* (MAF) $\leq 1\%$), e desvios significativos do equilíbrio de *Hardy Weinberg* $\chi^2_1 > 100.0$). Apenas os efeitos de SNP localizados nos cromossomos autossômicos foram considerados para análise de associação.

2.1.3.3. Associação genômica ampla e busca por genes candidatos

Genótipos perdidos foram imputados utilizando o programa Beagle (BROWNING; BROWNING, 2007) sem o uso de informações de pedigree. As características de qualidade de

carne foram analisadas sob um modelo bayesiano usando o programa Gensel (FERNANDO; GARRICK, 2009).

A abordagem BayesC, que é menos sensível aos valores iniciais de variâncias aditiva e residual, foi utilizada inicialmente para estimar essas variâncias, assumindo o parâmetro π como zero (isto é, partindo do princípio de que todos os SNPs contribuíam para explicar a variação genética em cada característica). As variâncias aditivas e residuais estimadas a partir das análises de BayesC0 ($\pi=0$) para cada característica foram então utilizadas como valores iniciais nas análises de BayesC π , realizadas para estimar o parâmetro π para cada característica. Os valores estimados para as variâncias e o parâmetro π foram finalmente utilizados para executar as análises de BayesB realizadas para estimar os efeitos dos marcadores.

A análise BayesB considera variações independentes para cada SNP no modelo, permitindo SNPs de grandes efeitos serem estimados sem regredir excessivamente seus efeitos para zero. O modelo estatístico incluiu os efeitos fixos de locais de nascimento e de confinamento, estação de monta e grupo de abate, já a idade do animal no abate foi incluída como uma covariável.

A estimação do efeito dos SNPs foi realizada de acordo com o modelo a seguir:

$$y = \mathbf{1}\mu + \sum_{j=1}^k x_j \beta_j \delta_j + \mathbf{e}$$

onde y é o vetor dos valores fenotípicos, μ é uma média geral, k é o número de marcadores no painel, x_j é o vetor de coluna que representa a variável genótipo no locus j , β_j é o efeito aleatório de substituição do alelo para o locus j , o qual está condicionado à σ^2_{β} e assume-se normalmente distribuídos $\mathbf{N}(\mathbf{0}, \sigma^2_{\beta})$; quando $\delta_j = \mathbf{1}$ mas $\beta_j = \mathbf{0}$ quando $\delta_j = \mathbf{0}$, δ_j é uma variável aleatória entre 0 e 1, que indica a ausência (com probabilidade π) ou presença (com probabilidade $1 - \pi$) do locus j no modelo, \mathbf{e} é o vetor de efeitos residuais aleatórios assumindo distribuição normal $\mathbf{N}(\mathbf{0}, \sigma^2_{\epsilon})$.

Com base na magnitude do parâmetro π estimado nas análises de BayesC π , foram identificados todos os genes presentes a ± 10 kb dos SNPs de maior efeito, escolhidos a partir do número de SNPs que passaram no controle de qualidade multiplicados por $(1 - \hat{\pi})$ para pesquisar por genes candidatos localizados próximos aos QTLs detectados. As regiões genômicas associadas com cada característica foram examinadas para genes candidatos utilizando o programa disponível online Map Viewer (NCBI). A anotação e vias metabólicas em

que os genes nessas regiões estão envolvidos foram avaliadas utilizando o programa DAVID “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (HUANG *et al.*, 2009).

2.1.4. Resultados e Discussão

2.1.4.1. Estatísticas sumárias

Médias, desvios-padrão, componentes de variância, herdabilidades e estimativas do parâmetro π para cada característica estão apresentados na Tabela 1. As estimativas de herdabilidade e π são baseadas em amostras pequenas e, conseqüentemente, possuem considerável variação decorrente da amostragem. As estimativas de herdabilidade variaram de 0,05 para o parâmetro L* de cor na gordura e 0,28 para o parâmetro b* de cor muscular.

Tabela 1. Média, desvio padrão, herdabilidade e parâmetro π estimado para cada característica.

Característica	N	Média \pm DP	σ^2_a	σ^2_e	h^2	π
FC0 (kg)	442	8,70 \pm 2,20	0,37228	1,84566	0,1678	0,992995
FC7 (kg)	425	5,93 \pm 2,16	0,523924	2,21659	0,1911	0,957823
FC14 (kg)	437	4,56 \pm 1,89	0,290425	1,56359	0,1566	0,996825
EGS (mm)	536	6,42 \pm 2,33	0,779323	2,87337	0,2133	0,990398
AOL (cm ²)	534	59,98 \pm 7,55	10,848	29,2516	0,2705	0,891685
L*músculo	453	38,55 \pm 2,55	0,694113	2,91523	0,1923	0,994683
a*músculo	453	16,88 \pm 3,96	0,533459	2,06924	0,2049	0,999995
b*músculo	453	13,51 \pm 2,00	0,823522	0,322681	0,2815	0,999946
L*gordura	451	75,69 \pm 4,71	1,10219	20,1762	0,0517	0,952439
a*gordura	452	8,22 \pm 4,04	0,830185	2,30143	0,1686	0,999899
b*gordura	452	17,24 \pm 2,82	0,984939	2,7525	0,2635	0,954324
CRA (%)	452	80,44 \pm 3,19	1,0267	7,77859	0,1166	0,954324
PC (%)	453	27,56 \pm 5,51	1,1079	15,6947	0,0419	0,97999
pH	452	5,59 \pm 0,20	0,011649	0,032997	0,2480	0,99979

N: tamanho amostral, DP: desvio-padrão, σ^2_a : variância aditiva, σ^2_e : variância residual, abreviação das características: força de cisalhamento (FC) medida em diferentes tempos de maturação da carne, 24 horas após o abate (FC0), após sete dias de maturação da carne (FC7) e após 14 dias de maturação da carne (FC14), espessura de gordura subcutânea (EGS), área de olho de lombo (AOL), parâmetros de determinação de características de cor da carne e da gordura (luminosidade (L*), intensidade da cor vermelha (a*) e intensidade da cor amarela (b*)), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cocção (PC) e pH muscular (pH).

As médias apresentadas para as medidas de força de cisalhamento (Tabela 1) são mais elevadas do que aquelas normalmente relatadas para as raças *Bos taurus* (MCCLURE *et al.*, 2012), mas isso era esperado e está de acordo com a observação de que a FC aumenta à medida que a proporção de *Bos indicus* aumenta em animais cruzados (JOHNSON *et al.*, 1990). A herdabilidade de cada característica foi estimada utilizando as análises de BayesC0 porque BayesC é menos sensível ao tamanho da amostra do que BayesB (FERNANDO; GARRICK, 2009). A maioria das estimativas de herdabilidade foi de tamanho moderado, indicando que existe variação aditiva para todas essas características em bovinos da raça Nelore.

2.1.4.2. Estudo de associação genômica ampla

Depois de selecionar SNPs com base no *call rate*, na frequência de alelos e no equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme descrito na metodologia, e após a imputação de 0,80% dos genótipos perdidos, os genótipos ficaram disponíveis para 651,259 SNP loci para novilhos e touros. O programa Gensel utilizado no GWAS, reporta dois resultados referentes às associações entre às características fenotípicas e os marcadores. Um resultado contém os efeitos de SNPs únicos e o outro considera efeitos de janelas cromossômicas de 1-Mb, as quais estamos considerando como regiões de QTL. As características de qualidade de carne avaliadas foram influenciadas principalmente por QTLs de efeitos pequenos e nenhum gene de grande efeito, como previamente descrito em bovinos taurinos (*CAPNI* do inglês: calpain 1, (μ /I) large subunit e o *CAST* do inglês calpastatin) foi encontrado como principal candidato nessa análise.

Muitas características de produção importantes são poligênicas e são controladas por um grande número de QTLs (ROLF *et al.*, 2012, SAATCHI *et al.*, 2012). A identificação dos genes subjacentes à variação de características complexas pode melhorar a nossa compreensão da biologia da variação fenotípica e facilitar atingir maior acurácia de seleção. A melhoria das características de qualidade de carne, incluindo a maciez, poderia estimular as compras de carne bovina pelos consumidores que esperam experiências alimentares desejáveis e tendem a desviar suas compras para outras fontes de proteína animal quando experimentam carne dura.

Nesse estudo, GWAS para 14 características de qualidade de carne foram realizados utilizando uma população de famílias de meio-irmãos da raça Nelore, o que nos permitiu identificar diversos QTLs relacionados com essas características. Com exceção do parâmetro a^* de cor da gordura e pH muscular para os quais foram identificados QTLs de maior efeito; os

QTLs detectados foram de efeito muito pequeno, evidenciando a natureza poligênica das características avaliadas. Para maciez da carne, em particular, esta descoberta contraria os resultados encontrados em bovinos taurinos onde há QTLs explicando entre 4,1 até 7,4 % da variância genética aditiva (MCCLURE *et al.*, 2012). Um fator que poderia ter influenciado o tamanho pequeno dos efeitos dos QTLs identificados seria as estimativas do parâmetro π (Tabela 1), que por sua magnitude, incluiu muito mais marcadores do que animais no modelo.

O programa DAVID v6.7 foi utilizado para pesquisar vias metabólicas funcionais com base nas listas de genes candidatos. Para FC0, identificamos 858 loci candidatos (incluindo genes, loci ainda não caracterizados, pseudogenes e proteínas preditas) na vizinhança dos 4.563 SNPs individuais selecionados com base no parâmetro π estimado para essa característica (Tabela 1). Alguns genes previamente relatados como candidatos para maciez de carne também foram encontrados nessas análises. Por exemplo, um SNP associado com FC0 foi localizado nas imediações do gene *CAPN2* (calpain 2, (m/II) large subunit) e quatro nas do gene *CAPN5* (calpain 5); SNPs associados com FC0 também foram encontrados na família gênica de colágenos (genes *COL15A1* e *COL23A1*). No entanto, nenhum SNP associado foi encontrado próximo ao gene *CAST*, que está associado com medidas de FC em raças taurinas. Apesar do BTA7 conter SNPs selecionados para FC0, como pode ser observado na Figura 2, esses SNPs não foram localizados perto de quaisquer genes anotados, sugerindo assim que as mutações causais podem ser de natureza regulatória. Como estamos plotando variâncias ao invés de P-valores (Figura2), quando um SNP explica relativamente maior proporção da variância que os demais, podemos observar um efeito de encolhimento, conhecido como *shrinkage* em análises bayesianas. As escalas dos gráficos poderiam ser modificadas para melhor visualização das regiões genômicas de efeitos menores, entretanto, não seria possível observar os marcadores de maiores efeitos. O maior QTL identificado (janela cromossômica de 1-Mb) para FC0 está localizado no BTA23 a 24 Mb (Tabela 2), o qual explica apenas 0,11 % da variância genética aditiva para FC0. Existem vários genes localizados nas imediações deste QTL incluindo a família gênica glutathione alfa S- transferase (*GSTA2*, *GSTA3*, *GSTA5*, *GSTA4*). Também identificamos genes candidatos em outras regiões de QTL como *SERPIN2* que codifica uma proteína serina protease e está localizado perto de SNPs associados no BTA2. Genes serpina são conhecidos por controlar a proteólise em vias moleculares associadas com a sobrevivência de células e desenvolvimento (SILVERMAN *et al.*, 2010). A análise funcional utilizando o

programa DAVID revelou grupos de genes envolvidos na atividade do canal de cálcio e de potássio e as vias metabólicas interação ligante-receptor neuroativa, sinalização TGF-beta, contração do músculo liso vascular, adesão focal, sinalização de cálcio e ribossomo.

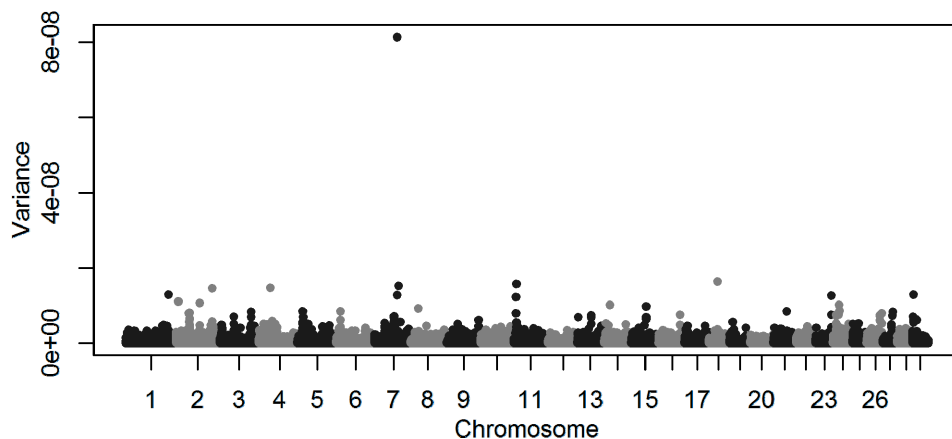


Figura 2. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC0.

Fonte: autoria própria

Tabela 2. QTL de maior efeito para cada característica.

Característica	BTA ^a	Posição (pb) ^b	Posição (Mb) ^c	Número de SNPs	Variância aditiva explicada (%)
FC0	23	24.002.374...24.999.318	24	453	0,11
FC7	13	71.001.773...71.998.254	71	364	0,10
FC14	2	73.002.970...73.996.212	73	271	0,19
EGS	11	82.000.961...82.998.027	82	298	0,36
AOL	23	24.002.374...24.999.318	24	453	0,08
L*músculo	23	24.002.374...24.999.318	24	453	0,14
L*gordura	23	24.002.374...24.999.318	24	453	0,10
a*gordura	12	36.010.895...36.994.095	23	333	1,21
b*gordura	26	43.006.538...43.997.236	43	323	0,11
CRA	17	58.001.206...58.998.805	58	326	0,10
PC	23	24.002.374...24.999.318	24	453	0,10
pH	8	87.002.083... 87.998.405	87	304	4,01

^aBTA: Cromossomo bovino; ^bPosição (pb): Posição onde o QTL começa e termina no cromossomo em pares de bases; ^cPosição (Mb): Posição do QTL no cromossomo em mega bases.

Foram identificados 4.161 genes dentro das regiões associadas com FC7 (Figura 3). Dois SNPs associados foram encontrados na vizinhança do gene *CAPN1*, quatro na do *CAPN2*, três na

do *CAPN5* e dois na do *CAST*, em adição, também foram encontrados SNPs próximos aos genes membros da família de colágeno (*COL1A1*, *COL24A1*, *COL28A*, *COL2A1*, *COL4A3* e *COL6A3*). O gene candidato *ASAPI* (ArfGAP com o domínio SH3, de repetição ankyrin e domínio PH 1), previamente relatado como associado com medidas de força de cisalhamento em um estudo de genes candidatos utilizando parte dessa população Nelore (TIZIOTO *et al.*, 2012), também foi encontrado como candidato nesta análise entre os loci mais fortemente associados com FC7.

A região de QTL que explicou a maior proporção de variância genética aditiva (0,10%) foi localizada no cromossomo bovino 13 a 71 Mb, onde os genes *PTPRT* (*tyrosine phosphatase, receptor type, T*) e *LOC614378* (histone H2B type 1-like) estão localizados. Considerando a abordagem de SNPs únicos, ao invés de QTLs, um SNP próximo a genes anotados, localizado no cromossomo 11, explicou a maior quantidade da variação da FC7, nesta região foram encontrados dois genes candidatos: *RAB11FIP5* (*RAB11 family interacting protein 5*), que está envolvido no tráfego de proteínas de endossoma apical para a membrana plasmática apical e *SFXN5* (*sideroflexin 5*) que transporta o citrato. Os grupos funcionais encontrados foram glicoproteína, ligante bissulfito e ligação de metais. Vias metabólicas interessantes, incluindo a interação receptor-ligante neuroativa, biossíntese o-glicano e adesão focal também foram encontrados para essa medida de FC.

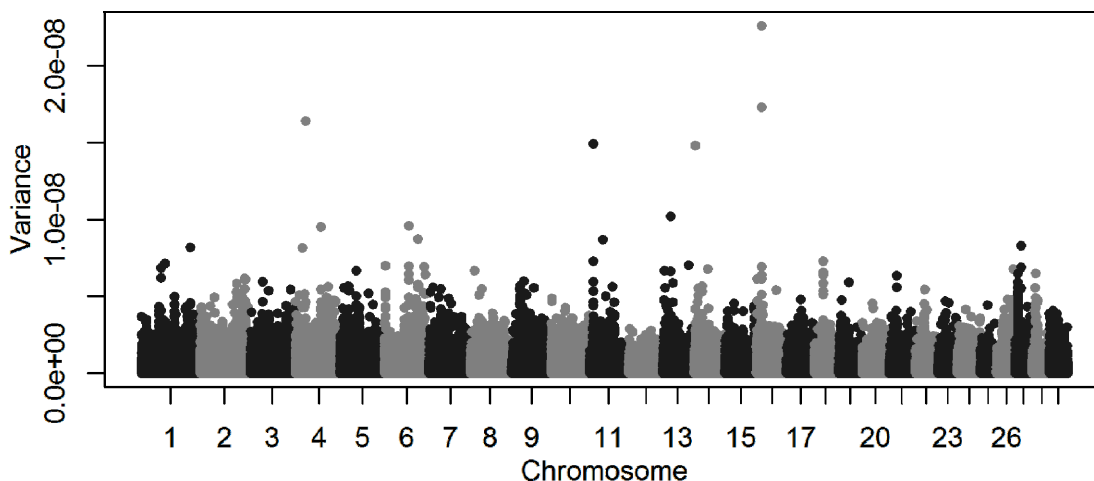


Figura 3. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC7.
Fonte: autoria própria

O QTL que explicou a maior quantidade da variância genética aditiva para FC14 está localizado no cromossomo 2 a 73 Mb e foi responsável por 0,19% da variância genética aditiva. Poucos genes estão localizados nesta região de QTL mas incluem a família *GLI2* (*zinc finger 2*) e os genes *CLASP1* (*cytoplasmic linker associated protein 1*), *MKI67IP* (*interacting nucleolar phosphoprotein*), *MKI67* (*FHA domain*), e *LOC100294993* (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like*). O SNP que explicou individualmente a maior porção da variância genética aditiva está localizado no cromossomo bovino 4 (Figura 4) próximo ao gene *POT1* (*protection of telomeres 1 homolog*), o qual é essencial para replicação do telômero.

Entre os grupos funcionais encontrados estavam ligação lipídica, adesão focal e atividade de exopeptidase. A principal via metabólica encontrada foi fagocitose Fc gamma R-mediada.

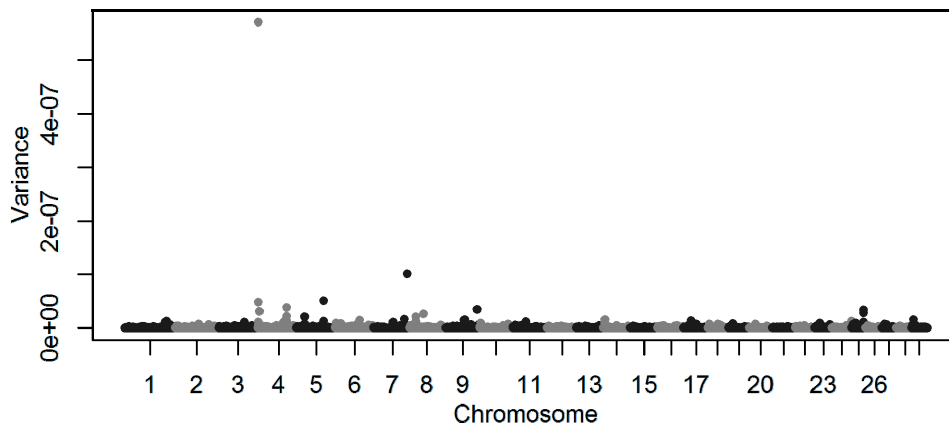


Figura 4. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para FC14.

Fonte: autoria própria

Um total de 56 genes foram detectados como candidatos para maciez de carne a partir da análise de todas as medidas de FC, e a análise funcional destes genes concordantes revelou três grupos funcionais relacionados com a regulação da transcrição, membrana e ligação de metais.

As alterações na textura e propriedades sensoriais podem ocorrer devido aos processos de degradação *post-mortem* que influenciam a qualidade da carne. Por isso, muita atenção tem sido dada aos genes *CAPN* e *CAST*, que estão envolvidos em um importante sistema proteolítico. As variantes desses genes foram encontradas como influenciando a maciez da carne em diferentes populações de gado de corte (CASAS *et al.*, 2006; CORVA *et al.*, 2007; PAGE *et al.*, 2002, SCHENKEL *et al.*, 2006). Apesar de termos encontrado SNPs nos genes *CAPN1*, *CAPN2*,

CAPN5 e *CAST*, que foram associados com as medidas de FC nesta população, esses tiveram efeitos menores do que outras regiões candidatas de QTL. Este resultado pode ser decorrente do pequeno tamanho da amostra utilizada neste estudo. Também é possível que as diferenças entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus* para as frequências alélicas nas mutações nos genes *CAPN1* e *CAST* e a extensão de DL entre SNPs e as variantes causais resultam em diferentes efeitos dos marcadores detectados em diferentes raças. Concordando com essa inferência, um estudo conduzido por WHITE *et al.* (2005), demonstrou que dois SNPs localizados no gene *CAPN1*, que têm sido descritos como associados com maciez de carne em populações *Bos taurus* (designados marcadores 316 e 530), não segregam em alta frequência em bovinos da raça Brahman, entretanto, o marcador 4751, também localizado neste gene, encontrou-se associado com maciez de carne desta raça. A presença de epistasia também pode influenciar a magnitude dos efeitos de SNP em diferentes populações, pois se sabe que os efeitos epistáticos podem explicar uma grande quantidade da variação de características quantitativas (HUANG *et al.*, 2012).

As diferenças entre os genes e as vias metabólicas identificadas neste estudo e aqueles já relatados para raças taurinas poderiam refletir diferenças no metabolismo ou na história de seleção de zebuínos. Grupos funcionais relacionados com o transporte de cálcio e de potássio, bem como a ligação de metais foram encontrados em nossas análises para as medidas de FC. O potássio é necessário para a contração muscular, impulsos nervosos e também contribui para o equilíbrio de fluidos celulares (KNOCHEL *et al.*, 1972). Estudos realizados com a mesma população Nelore mostraram que o conteúdo de potássio na carne pode afetar a maciez da mesma (TIZIOTO *et al.*, 2013). Além disso, o sistema proteolítico da calpaína é altamente sensível às flutuações dos níveis de íons de cálcio, pH e temperatura, e estes três parâmetros podem mudar rapidamente imediatamente *post-mortem* (SUZUKI *et al.*, 1995), indicando que a atividade do canal de cálcio pode influenciar o amaciamento da carne *post-mortem*.

Vias metabólicas importantes, incluindo a interação receptor-ligante neuroativa e de sinalização de TGF-beta foram identificadas a partir dos genes das regiões do genoma onde SNPs foram associados com FC0. Na via de interação receptor-ligante neuroativa, vários genes relacionados com o acoplamento de proteína G foram identificados. Estudos têm demonstrado que a ativação de receptores acoplados à proteína G está envolvida na manutenção dos músculos esqueléticos e também pode estar envolvida na mediação da maturação e crescimento de células

musculares, que opera através de muitas vias de sinalização para estimular seletivamente a síntese de proteínas ou inibir a rotatividade de proteínas dependentes de citocina (GUTTRIDGE, 2001).

A via metabólica TGF-beta está envolvida em muitos processos celulares, incluindo a apoptose. A superfamília de genes Fator-beta (*TGF-β*) foi identificada como importante reguladora do desenvolvimento muscular (MCPHERRON *et al.*, 1997). Genes de nossa lista incluem NOG (*Noggin*), que é crucial para a morfogênese de cartilagem e também inibe a proteína de sinalização morfogenética óssea, a qual é essencial para o crescimento do tubo neural e padronização de somitos e da proteína morfogênica óssea 7, que induz a formação de cartilagem e osso (LA ROSA *et al.*, 2011).

O gene PTPRT que foi identificado como um candidato para o QTL encontrado associado com FC7 (Tabela 2) pode estar envolvido tanto na transdução de sinal quanto na adesão celular do sistema nervoso central, ambas as vias foram também encontradas como desempenhando um papel importante na variação de FC0. Vias de interação de receptor de citocinas e sinalização de quimiocinas, que foram encontradas para os genes encontrados nas análises de FC7, sugerem que mecanismos alternativos e não óbvios podem estar agindo na maciez da carne, além da proteólise. Alguns estudos têm proposto que as proteínas de choque térmico podem desempenhar um papel na maciez da carne (HOCQUETTE *et al.*, 2012; PULFORD *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2014) e outro estudo sugeriu que genes relacionados à resposta imune, também podem estar envolvidos, devido sua relação com estresse (ZHAO *et al.*, 2012).

A via de biossíntese de O-Glicano também foi encontrada entre os genes associados com FC7 e está envolvida em modificações de proteínas serina ou treonina (VARKI *et al.*, 1999). A glicosilação não enzimática de proteína nos tecidos ajuda a formação de ligações cruzadas, como O-Linked oligossacarídeos, que pode conduzir à deterioração estrutural e funcional de colágenos (MONNIER *et al.*, 1984). A formação e acumulação destas ligações cruzadas podem contribuir para a dureza da carne proveniente de animais idosos. Biossíntese de O-Glicano está envolvida na glicosilação, que pode afetar a síntese de colágeno e de outras proteínas e esta pode ser a forma mais comum e complexa de modificação pós-traducional (WOPEREIS *et al.*, 2006). Finalmente, grupos de genes envolvidos na adesão celular foram encontrados para FC14. Proteínas de adesão celular parecem desempenhar um papel importante na maciez da carne dessa população.

A partir da análise dos genes dentro das regiões comuns associadas com todas as medidas de FC, inferimos que os processos biológicos de regulação da transcrição, glicosilação e de ligação de metais são importantes para a maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

Do GWAS para EGS (Figura 5), um QTL localizado no cromossomo 11 explicou maior quantidade da variação (0,36 %). Poucos genes e loci não caracterizados estão mapeados nesta região (Tabela 2), porém nenhum deles têm uma função clara ou intuitiva no anabolismo ou catabolismo lipídico. *TTF1* (transcription termination factor, RNA polymerase I), localizado cromossomo 9 foi o gene localizado na região de um SNP único que explicou a maior variação genética aditiva para EGS. As análises funcionais identificaram grupos relacionados com o processo de biossíntese de aminoácidos, morte celular, entre outras. Genes candidatos previamente identificados, incluindo *LEP* (leptin) e *DGATI* (diacylglycerol O-acyltransferase 1) (TANIGUCHI *et al.*, 2002, THALLER *et al.*, 2003) não foram identificadas nesta análise. Vias metabólicas encontradas incluíram a de biossíntese de CoA e de interação receptor-ligante neuroativa.

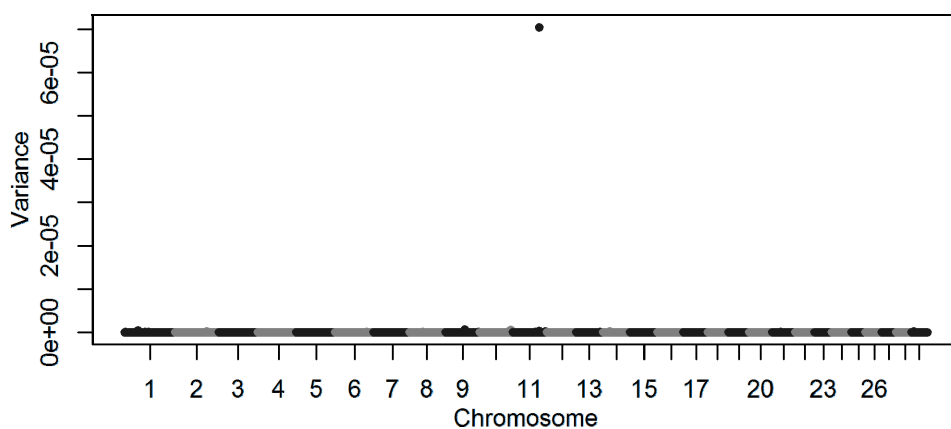


Figura 5. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para EGS.
Fonte: autoria própria

As análises para AOL identificaram seis QTLs que explicaram individualmente 0,8 % da variância genética aditiva como sendo os loci mais importantes (Figura 6). O mesmo QTL descrito para FC0 localizado no cromossomo 23, também parece influenciar as medidas de AOL (Tabela 2). Genes relacionados com atividade de proteína-quinase, ligação de ATP, morte celular e filamentos de queratina foram encontrados como candidatos nessa análise. As vias metabólicas

encontradas foram junção aderente, metabolismo e biossíntese de Esfingolipídeos e biossíntese de O-Glicano.

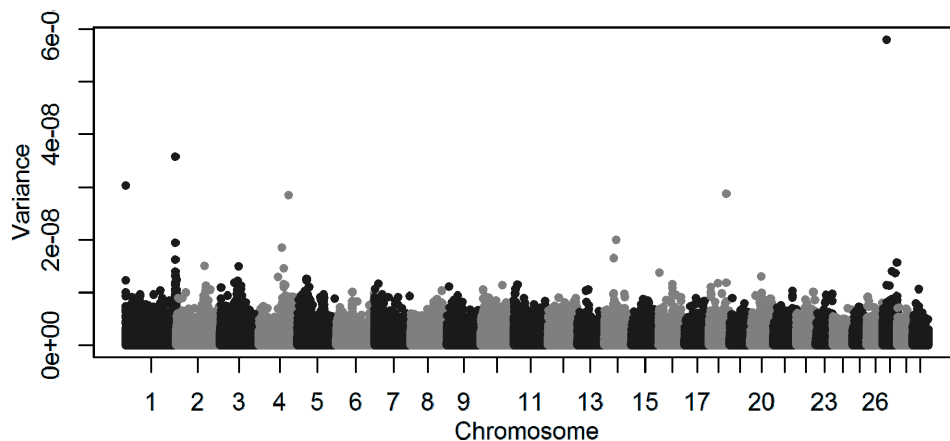


Figura 6. Manhattan plot da variância genética aditiva explicada por cada marcador para AOL.

Fonte: autoria própria

A via metabólica de interação receptor-ligante neuroativa foi encontrada entre os genes associados com EGS, indicando que genes relacionados com esta via desempenham um papel na deposição da gordura no Nelore, assim como na maciez. As vias de metabolismo esfingolípido, biossíntese O-glicano e de biossíntese glicoesfingolipídeos parecem ter funções em crescimento muscular, uma vez que também foram encontradas na análise para AOL.

Uma janela de QTL com um possível efeito pleiotrópico foi encontrada no cromossomo 23 e os maiores efeitos desse QTL foram atribuídos para os parâmetros L^* de cor tanto para carne quanto para gordura, FC0, AOL e PC. Mais estudos de mineração dessa região poderiam ajudar a identificar se este é um efeito de uma ou mais variantes que seriam úteis para melhorar simultaneamente quatro características de qualidade de carne na raça Nelore.

Os valores estimados de π para os parâmetros a^* e b^* de cores muscular foram maiores do que para as outras características (Tabela 1), indicando que relativamente poucos SNPs representados no chip devem estar associados com essas características. Não houve genes candidatos anotados identificados dentro da região de ± 10 kb dos SNPs associados. Para o parâmetro L^* de cor, o SNP mais fortemente associado está localizado no cromossomo 21, região que abriga o gene FSD2 (fibronectin type III and SPRY domain containing 2).

Os parâmetros a^* e b^* de cor para gordura e L^* para o músculo parecem ser influenciados pelas mesmas regiões. A região de QTL principal encontrada para o parâmetro a^*

de cor na gordura (Tabela 2) abriga poucos genes, no entanto, inferir sobre a implicação dessas regiões e genes nesta característica é difícil, pois há pouco conhecimento disponível sobre os mecanismos biológicos que regulam essas características de cor da gordura e até mesmo da carne, apesar de influenciarem a atitude dos consumidores no ato da compra. Vias relacionadas com a degradação da lisina, degradação de glicanos e moléculas de adesão celular, entre outras, parecem ser importantes para a manutenção da cor do músculo e gordura *post-mortem* em bovinos. Interações celulares são mediadas por diferentes famílias de receptores, incluindo o direcionamento de adesão celular às proteínas da matriz extracelular e os ligantes nas células adjacentes, e pode influenciar muitos processos, tais como o crescimento celular, diferenciação, formação da junção, e a polaridade (ALBELDA *et al.*, 1990).

Nós identificamos um QTL localizado a 58 Mb do cromossomo 17, que tem o maior efeito (0,10 % da variância genética aditiva) para CRA (Tabela 2). Na região desse QTL estão localizados os genes *PRKAB1* (protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit) e *HSP8* (heat shock 22 kDa protein 8). As análises no programa DAVID revelaram grupos funcionais envolvidos em processos biológicos e catabólicos e na ativação da resposta imune, localizados nas regiões associadas com CRA. As vias de sinalização de cálcio e interação ligante-receptor neuroativa também foram identificadas nessa análise. Como para CRA o QTL de maior efeito identificado para PC está localizado no cromossomo 23 e explica 0,10 % da variância genética aditiva, genes relacionados ao processamento de antígenos e via de apresentação, incluindo proteínas de choque térmico, foram encontrados nesta análise.

Capacidade de retenção de água da carne fresca é importante, pois afeta ambos o rendimento e a qualidade da carne comercializada. Parece que o mecanismo de proteólise, além de influenciar a maciez, também afeta a CRA. Os grupos funcionais: processo catabólico de ácido orgânico e proteólise foram identificados entre os genes localizados nas regiões associadas com CRA e proteases, incluindo as calpains *CAPN2*, *CAPN12*, *CAPN13* e *CAPN14*, foram identificadas como genes candidatos mapeados nessas regiões. A via de sinalização de cálcio foi identificada, o que indica que a CRA pode ser afetada por proteases tais como as calpains que são dependentes de cálcio.

As alterações no tecido conjuntivo, durante o processo de cozimento podem ter um efeito de amaciamento. Já foi proposto que as proteínas de choque térmico podem desempenhar um papel no amaciamento da carne. Em nossa análise, proteínas de choque térmico também

apresentaram implicação na variação da PC, a qual é importante para a suculência da carne cozida.

Um QTL de efeito maior para pH muscular (24h) foi identificado no cromossomo 8 a 87 Mb, o qual explica 4,01% da variância genética aditiva. Refrigeração *post-mortem*, pH, ambientes utilizados para a embalagem, intervenções antimicrobianas e cozimento podem influenciar os parâmetros de cor da carne. Regiões de QTLs já foram identificadas para todas essas características, o que sugere que há loci de grande efeito subjacentes as mesmas (MANCINI *et al.*, 2005). O QTL de maior efeito identificado para pH sugere que essa região genômica deve influenciar a manutenção de um ambiente interno fisiologicamente equilibrado.

2.1.5. Conclusão

Variantes genéticas têm sido largamente exploradas para explicar a variação de características de qualidade de carne, mas os mecanismos subjacentes que afetam essas características permanecem pouco conhecidos. Como as características de qualidade de carne avaliadas neste estudo em bovinos da raça Nelore parecem ser controladas principalmente por muitos QTLs de efeitos pequenos, a identificação dos genes relevantes deve ser difícil, porque cada gene causal tem uma pequena contribuição para a variação total. Assim, a seleção genômica, que explora a variabilidade em vários genes ao mesmo tempo, deve ser a estratégia mais adequada para melhorar estas características.

Este estudo fornece o primeiro passo para a aplicação da seleção genômica para características de qualidade de carne em bovinos da raça Nelore. Vias metabólicas importantes relacionadas com características de qualidade de carne foram identificadas, as quais não haviam sido relatadas para bovinos *Bos taurus*. Estes resultados devem ser interpretados com cautela, já que a magnitude dos efeitos estimados é influenciada pelo tamanho da amostra. Estudos com outras populações da raça Nelore serão necessários para validar os resultados deste estudo e também serão úteis para o desenvolvimento de modelos para a previsão do mérito genético para implementar a seleção genômica para a qualidade da carne em bovinos da raça Nelore.

2.2. Efeitos de loci de características quantitativas no conteúdo mineral do músculo *Longissimus dorsi* em bovinos.

2.2.1. Resumo

Minerais são requeridos em dietas bovinas para garantir a saúde do animal e níveis de produção e reprodução satisfatórios. As concentrações de minerais nos tecidos são, pelo menos, parcialmente determinadas geneticamente. Mapear regiões genômicas relacionadas com o conteúdo mineral no músculo bovino pode ajudar na identificação de genes que estão relacionados com a variação do equilíbrio, transporte, absorção e excreção de minerais e consequentemente, também podem estar relacionadas com doenças metabólicas. Adotando uma estratégia de associação genômica ampla, 373 novilhos da raça Nelore foram genotipados utilizando a plataforma *Illumina BovineHD BeadChip*. A análise de associação genômica foi realizada para as concentrações de minerais no músculo *Longissimus dorsi* utilizando uma abordagem bayesiana implementada no programa Gensel. O conteúdo de minerais no músculo de bovinos *Bos indicus* é moderadamente herdável com a proporção da variância aditiva explicada pelos genótipos variando de 0,29 até 0,36. A variação da concentração de minerais parece ser influenciada por inúmeros QTL de pequeno efeito, no entanto, um QTL de grande efeito que explicou 6,53% da variância aditiva foi encontrado para conteúdo de ferro. As listas de genes candidatos geradas para todos os QTLs detectados para concentração de minerais sugerem que a maioria dos genes subjacentes a esses QTLs estão relacionados com a transdução de sinal, via de sinalização, parte integrante de membrana, intrínseco de membrana, regulação de transcrição e ligação de íons metálicos. Este estudo identifica QTLs e genes candidatos relacionados com a variação da concentração de minerais no músculo. Nossos resultados fornecem a primeira etapa para a implementação de seleção genômica para essas características em bovinos de corte da raça Nelore, no entanto, validações em outras populações *Bos indicus* serão necessárias para avaliar a acurácia das estimativas moleculares dos valores genéticos e validar as proporções da variação do teor de minerais que pode ser explicada pelos marcadores.

2.2.2. Introdução

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm sido utilizados para identificar loci para características quantitativas (QTL) associados com características complexas e para compreender melhor quais são os genes e os mecanismos biológicos subjacentes a variação fenotípica.

Uma varredura que identifica regiões genômicas que estão relacionadas com o conteúdo de minerais em tecidos bovinos, tais como o músculo Longissimus dorsi, deve fornecer informações valiosas sobre os mecanismos subjacentes às doenças metabólicas em ruminantes (MORRIS *et al.*, 2012), auxiliar na formulação da dieta de animais e permitir o desenvolvimento de produtos de carne destinados a melhorar a nutrição humana. Bovinos exigem muitos minerais na dieta para manter a sua saúde, produção e reprodução. Se não estiverem presentes em quantidades adequadas, macrominerais, que são necessários em quantidades maiores, ou minerais-traço, podem causar problemas para o bem-estar animal e resultar em perdas de rentabilidade para os produtores. No entanto, porque os minerais-traço são necessários apenas em pequenas quantidades, a suplementação adicional pode induzir a toxicidade, e apenas doses modestas podem ser suplementadas para garantir a saúde animal.

Estudos com a mesma população Nelore utilizada neste estudo foram relatados anteriormente e mostram que o teor mineral está relacionado com a maciez da carne (TIZIOTO *et al.*, 2013; TIZIOTO *et al.*, 2014). Isto pode ser devido aos efeitos de genes cujos mecanismos de ação são dependentes da presença de um mineral específico. Por exemplo, a disponibilidade de cálcio pode afetar o sistema proteolítico calpaína/calpastatina que são os principais componentes da proteólise da carne *post-mortem* (PAGE *et al.*, 2002; CASAS *et al.*, 2006; SCHENKEL *et al.*, 2006), além de ser essencial para a contração muscular.

A variação da concentração de minerais é dependente da sua ingestão e excreção (MORRIS *et al.*, 2013), mas também podem ser afetada por efeitos ambientais, tais como local de nascimento, idade e raça (TIZIOTO *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que as concentrações de minerais em tecidos são influenciadas geneticamente e são hereditárias

(MORRIS; PHUA, 2010; MATEESCU *et al.*, 2013). Os genes devem afetar o equilíbrio mineral através das ações de receptores, transportadores e proteínas chaperona (MORRIS *et al.*, 2013).

Consequentemente, um estudo de associação genômica ampla para o teor de minerais na carne provavelmente aumentaria o conhecimento dos genes que influenciam a variação do equilíbrio de minerais, transporte, absorção e excreção, bem como proporcionaria a base para a implementação da seleção genômica para essas características. Este estudo identifica QTLs que devem conter genes que estão relacionados com a variação de arsênio (As), cálcio (Ca), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), fósforo (P), potássio (K), selenio (Se), sódio (Na), enxofre (S) e zinco (Zn), no músculo Longissimus dorsi de bovinos Nelore utilizando genótipos produzidos pelo Illumina BovineHD BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA).

2.2.3. Material e Métodos

2.2.3.1. Animais e coleta de fenótipos

Novilhos da raça Nelore, totalizando 373 animais, produzidos por 34 touros que representam as principais linhagens da raça no Brasil, foram genotipados e fenotipados. As famílias de meio-irmãos foram produzidas, confinadas e abatidas conforme descrito no item 2.1.3.1. Os fenótipos de minerais foram coletados como descrito por Gromboni (2013). Resumidamente, os reagentes de grau analítico e água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA) foram empregados e as soluções-padrão utilizadas para preparar a solução de referência multi-elemento foram certificadas com plasma e materiais de alta pureza de SpecSol (Jacareí, SP, Brasil). Um sistema de digestão por microondas em recipiente fechado (Ethos -1600, a Milestone -MLS, Sorisole, Itália), equipado com sensores de temperatura de fibra óptica e pressão foi utilizado para a digestão da amostra. Massas de amostra de 100 mg de músculo Longissimus dorsi foram digeridas com a ajuda de microondas utilizando 2 mL de HNO₃ concentrado e sub-fervido, 2 mL de H₂O₂ (30 % w/w) e 6 mL de água ultrapura em recipientes fechados feitos de resina de copolímero de perfluoroalcoxi. O programa de aquecimento foi feito em três etapas : (1) rampa de aquecimento de 10 min com a temperatura máxima de 120 °C (1300 W), (2) segunda rampa de aquecimento de 15 min com a temperatura máxima de 170 °C (1500 W), (3) temperatura a 170 °C durante 35 min.

Após a digestão, as amostras e as soluções controle foram transferidas para balões volumétricos, e o volume foi completado para 10 mL de água deionizada. As concentrações de minerais foram determinadas pelo espectrômetro Vista Pro-CCD ICP-OES (Varian, Mulgrave, Austrália). Comprimentos de onda de excitação foram escolhidos para minimizar a interferência espectral e produzir a intensidade mais elevada de emissão para cada elemento. Uma calibração linear foi calculada com até cinco pontos das preparações utilizando soluções analíticas padrões.

A exatidão e precisão do método utilizado foi avaliada medindo-se a recuperação e desvios-padrão relativos aos três materiais de referência certificados de fígado bovino (1557b) e músculo bovino (8414) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST Gaithersburg, MD, EUA).

2.2.3.2. Extração de DNA e genotipagem.

A extração do DNA e a genotipagem dos animais foram realizadas conforme descrito no item 2.1.3.2.

2.2.3.3. Associação genômica ampla e busca por genes candidatos

O conteúdo de minerais no músculo Longissimus dorsi foi analisado sob um modelo bayesiano utilizando o programa Gensel (FERNANDO; GARRICK, 2009) adotando uma abordagem semelhante à descrita por Tizioto *et al.* (2013). As análises de BayesC, foram utilizadas primeiramente para calcular as variâncias genéticas aditivas e residuais, assumindo o parâmetro π como 0. As variâncias genéticas aditivas e residuais estimadas a partir das análises de BayesC foram então utilizadas para executar as análises de BayesB para estimar os efeitos dos marcadores. Os valores π foram estimados para o conteúdo de cada mineral utilizando BayesC π e como sugerido por Mateescu *et al.* (2013), o parâmetro π foi escolhido com base no valor estimado que não excedesse o número de animais da análise. Nestas análises, o parâmetro π foi ajustado para 0,9995, sendo assim, o número de efeitos de SNPs a ser estimado era menor do que o número de animais utilizados ($449.364 \times (1 - \pi) = 224$ SNP). O modelo estatístico incluiu os efeitos fixos de grupo contemporâneo que foi formado utilizando os dados de locais de nascimento e de confinamento, estação de monta e grupo de abate, e a idade do animal no momento do abate foi incluída como covariável.

O limite para a declaração de uma região significativa foi baseado na magnitude assumida do parâmetro $\pi = 0,9995$. Os 224 SNPs com as maiores probabilidades posteriores de incorporação no modelo e que melhor explicaram a variância genética aditiva foram utilizados para pesquisar todos os genes dentro de ± 100 kb dos SNPs com os maiores efeitos. Além de calcular os efeitos individuais de cada SNP, o programa Gensel nos forneceu a proporção da variância que cada janela de 1-Mb representou. As regiões genômicas associadas com cada característica foram examinadas conforme descrito no item 2.1.3.3.

2.2.3.4. Correlações genéticas e fenotípicas

A matriz de correlação fenotípica foi estimada utilizando o procedimento PROC CORR do programa SAS (Statistical analysis software). As correlações genéticas foram estimadas como as correlações entre os valores genéticos genômicos fornecidos pelo programa Gensel nas análises de associação genômica.

2.2.4. Resultados e discussão

2.2.4.1. Estatísticas descritivas e parâmetros genéticos

Materiais de referência certificados foram avaliados para garantir a precisão do procedimento de preparação da amostra. Observou-se a concordância entre os valores obtidos para as amostras experimentais e os valores dos materiais certificados, o que indica a efetiva recuperação dos analitos após a digestão e sua precisa detecção.

As médias, estimativas dos componentes de variância e herdabilidades geradas pelas análises BayesC estão mostrados na Tabela 3. As estimativas de herdabilidade obtidas para todos os teores de minerais foram moderadas (0,29-0,36).

Tabela 3. Média, estimativas de componentes de variância e herdabilidade para o teor de cada mineral no músculo Longissimus dorsi de 373 novilhos Nelore.

Característica	Média (ppm)	σ^2_e	σ^2_a	h^2
Arsênio	0,0365	0,176	0,092	0,34
Cálcio	164,3293	0,055	0,025	0,31
Cromo	0,3783	0,237	0,132	0,36
Cobalto	0,0099	0,115	0,057	0,33
Cobre	1,7866	0,042	0,018	0,30
Ferro	44,6639	0,308	0,148	0,32
Magnésio	759,5118	0,037	0,015	0,29
Manganês	0,1954	0,315	0,158	0,33
Fósforo	7356,4144	0,037	0,015	0,29
Potássio	1077,5330	0,038	0,016	0,30
Selenio	0,2281	0,053	0,024	0,32
Sódio	1746,2670	0,038	0,016	0,29
Enxofre	6287,7256	0,040	0,017	0,30
Zinco	79,8071	0,042	0,018	0,31

σ^2_a : variância aditiva, σ^2_e : variância residual.

Correlações fenotípicas (Tabela 4) e genéticas (Tabela 5), estimadas como a correlação entre os valores genéticos genômicos dos animais para cada característica, estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5 e mostram que as concentrações de vários minerais são significativamente correlacionadas.

Tabela 4. Correlações fenotípicas entre os minerais no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

	As	Ca	Cr	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	P	K	Se	Na	S	Zn
As	1	0,2184	0,3668	0,5014	0,402	0,0838	0,0939	0,4237	0,1007	0,1082	0,4006	0,0975	0,1679	0,1994
		0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	0,1607	0,1131	<,0001	0,0891	0,0677	<,0001	0,0998	0,0044	0,0007
Ca		1	0,1344	0,1965	0,2	0,2856	0,4184	0,2728	0,4527	0,432	0,1949	0,5141	0,4126	0,4684
			0,0336	0,0011	1E-04	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Cr			1	0,564	0,545	0,1347	-0,142	0,5461	-0,096	-0,144	0,5308	-0,048	-3E-04	0,0801
				<,0001	<,0001	0,0351	0,0253	<,0001	0,1321	0,023	<,0001	0,4468	0,9959	0,207
Co				1	0,631	0,0888	-0,228	0,89	-0,196	-0,215	0,7734	-0,163	-0,141	-0,011
					<,0001	0,1473	0,0002	<,0001	0,0012	0,0003	<,0001	0,007	0,0196	0,8514
Cu					1	0,1342	0,0378	0,6178	0,0559	0,0452	0,5527	0,0982	0,0692	0,1595
						0,01	0,4657	<,0001	0,2806	0,3839	<,0001	0,0577	0,1816	0,002
Fe						1	0,3216	0,3252	0,3156	0,3165	0,0016	0,3631	0,2845	0,3362
							<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,975	<,0001	<,0001	<,0001
Mg							1	-0,119	0,9811	0,9865	-0,246	0,9389	0,85	0,809
								0,0402	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Mn								1	-0,089	-0,105	0,7129	-0,019	-0,038	0,1009
									0,1258	0,0693	<,0001	0,7494	0,5175	0,0821
P									1	0,9801	-0,24	0,9418	0,8537	0,8109
										<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
K										1	-0,25	0,9374	0,8565	0,8109
											<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Se											1	-0,184	-0,18	-0,061
												0,0004	0,0005	0,2361
Na												1	0,8188	0,8153
													<,0001	<,0001
S													1	0,6956
														<,0001
Zn														1

Abreviação das características: arsênio (As), cálcio (Ca), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), Ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), fósforo (P), potássio (K), selenio (Se), sódio (Na), enxofre (S) e zinco (Zn). P valores significantes ($P \leq 0.05$) estão destacados em negrito. Para cada mineral, primeira linha mostra as estimativas de correlações e a segunda linha mostra os P valores.

Tabela 5. Correlações entre os valores genéticos genômicos estimados pelo programa Gensel para o teor de cada mineral no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

	As	Ca	Cr	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	P	K	Se	Na	S	Zn
As	1,0000	0,0005	0,0017	0,1008	0,1501	-0,0278	0,0310	0,1644	0,0101	0,0422	0,1226	-0,0747	-0,0585	0,0527
		0,9931	0,9738	0,0519	0,0037	0,5926	0,5506	0,0014	0,8453	0,4160	0,0178	0,1501	0,2595	0,3097
Ca		1,0000	0,0445	0,2213	0,0030	0,1643	0,4062	0,1772	0,4361	0,4063	-0,0651	0,4300	0,4188	0,3878
			0,3911	<,0001	0,9544	0,0015	<,0001	0,0006	<,0001	<,0001	0,2100	<,0001	<,0001	<,0001
Cr			1,0000	0,2339	0,1764	0,0191	-0,0522	0,2722	-0,0660	-0,0865	0,2295	-0,0787	-0,0942	-0,1017
				<,0001	0,0006	0,7134	0,3148	<,0001	0,2037	0,0952	<,0001	0,1291	0,0693	0,0498
Co				1,0000	0,2398	0,0865	-0,0043	0,3559	0,0162	0,0008	0,2140	-0,0572	-0,0162	0,0289
					<,0001	0,0952	0,9344	<,0001	0,7552	0,9872	<,0001	0,2702	0,7554	0,5780
Cu					1,0000	0,0016	0,1750	0,2779	0,1684	0,1730	0,1929	0,0951	0,1321	0,1721
						0,9757	0,0007	<,0001	0,0011	0,0008	0,0002	0,0665	0,0106	0,0008
Fe						1,0000	0,1623	0,0955	0,1819	0,1491	0,0026	0,1174	0,2337	0,0964
							0,0017	0,0655	0,0004	0,0039	0,9608	0,0233	<,0001	0,0629
Mg							1,0000	-0,0305	0,9586	0,9661	-0,2055	0,8792	0,7027	0,6995
								0,5574	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Mn								1,0000	-0,0137	-0,0216	-0,0323	-0,0697	0,0257	-0,0016
									0,7920	0,6774	0,5337	0,1794	0,6203	0,9758
P									1,0000	0,9524	-0,2669	0,8738	0,7212	0,6971
										<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
K										1,0000	-0,2752	0,8578	0,7061	0,6866
											<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Se											1,0000	-0,2509	-0,2006	-0,1390
												<,0001	<,0001	0,0072
Na												1,0000	0,6751	0,6614
													<,0001	<,0001
Su													1,0000	0,4875
														<,0001
Zn														1,0000

Abreviação das características: arsênio (As), cálcio (Ca), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), Ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), fósforo (P), potássio (K), selenio (Se), sódio (Na), enxofre (S) e zinco (Zn). P valores significantes ($P \leq 0.05$) estão destacados em negrito. Para cada mineral, primeira linha mostra as estimativas de correlações e a segunda linha mostra os P valores.

As estimativas de variância e as estimativas de herdabilidades indicam (Tabela 3) que o conteúdo mineral muscular deve responder à seleção, e que a seleção genômica é viável dentro da raça Nelore, no entanto o pequeno tamanho da amostra e o delineamento experimental de famílias de meio-irmãos podem ter influenciado estas estimativas. Um estudo semelhante dentro da raça Angus, com mais de 1.900 observações fenotípicas, encontrou estimativas de herdabilidade de 0,48, 0,15 e 0,06 para as concentrações de Fe, Na e Zn, respectivamente, e herdabilidade 0 para o Mg, Mn, P e K, quando um modelo animal, que incorpora a matriz de parentesco numérica foi utilizado para estimar os componentes de variância. No entanto, quando o módulo BayesC (que leva em consideração as relações genômicas entre os animais) do programa Gensel foi utilizado, a proporção da variância explicada pelos os marcadores genômicos foi de 0,37, 0,18, 0,20, 0,12, 0,03, 0,09 e 0,17 para o Fe, Mg, Mn, P, K, Na e Zn, respectivamente (MATEESCU *et al.*, 2013).

2.2.4.2. Estudo de associação genômica ampla e busca por genes candidatos.

Depois de selecionar SNPs com base no call rate, na frequência de alelos (MAF<0.5), no equilíbrio de Hardy-Weinberg e imputar 0,80% dos genótipos perdidos, 449.364 loci estavam disponíveis para o GWAS.

Alguns minerais podem ser deficientes em forragens e pastagens. Assim, a seleção de animais com combinações genéticas vantajosas para o equilíbrio de minerais através de padrões de absorção e excreção favoráveis pode fornecer uma estratégia adaptativa interessante. Além disso, o potencial genético para desempenho e produtividade de gado de corte tem aumentado devido à seleção de animais com potenciais genéticos superiores, os quais geralmente requerem maior suplementação mineral. Neste sentido, a seleção para o equilíbrio mineral deve ser favorável também para beneficiar os custos de produção.

A maioria das correlações entre os efeitos de substituição de alelos para as concentrações de minerais foram positivas, sugerindo que a seleção genômica para aumentar a concentração de um mineral levaria ao aumento da concentração de outros minerais. O elevado número de correlações genéticas significativas indica que mecanismos biológicos similares podem afetar as concentrações de minerais em geral, e isso é confirmado pelo achado de grupos funcionais semelhantes para todas as medidas de minerais. Foram observados alguns genes e regiões de QTLs coincidentes como

aqueles apresentados, principalmente, na região centromérica do BTA8 para Fe, Zn e P (Figura 7).

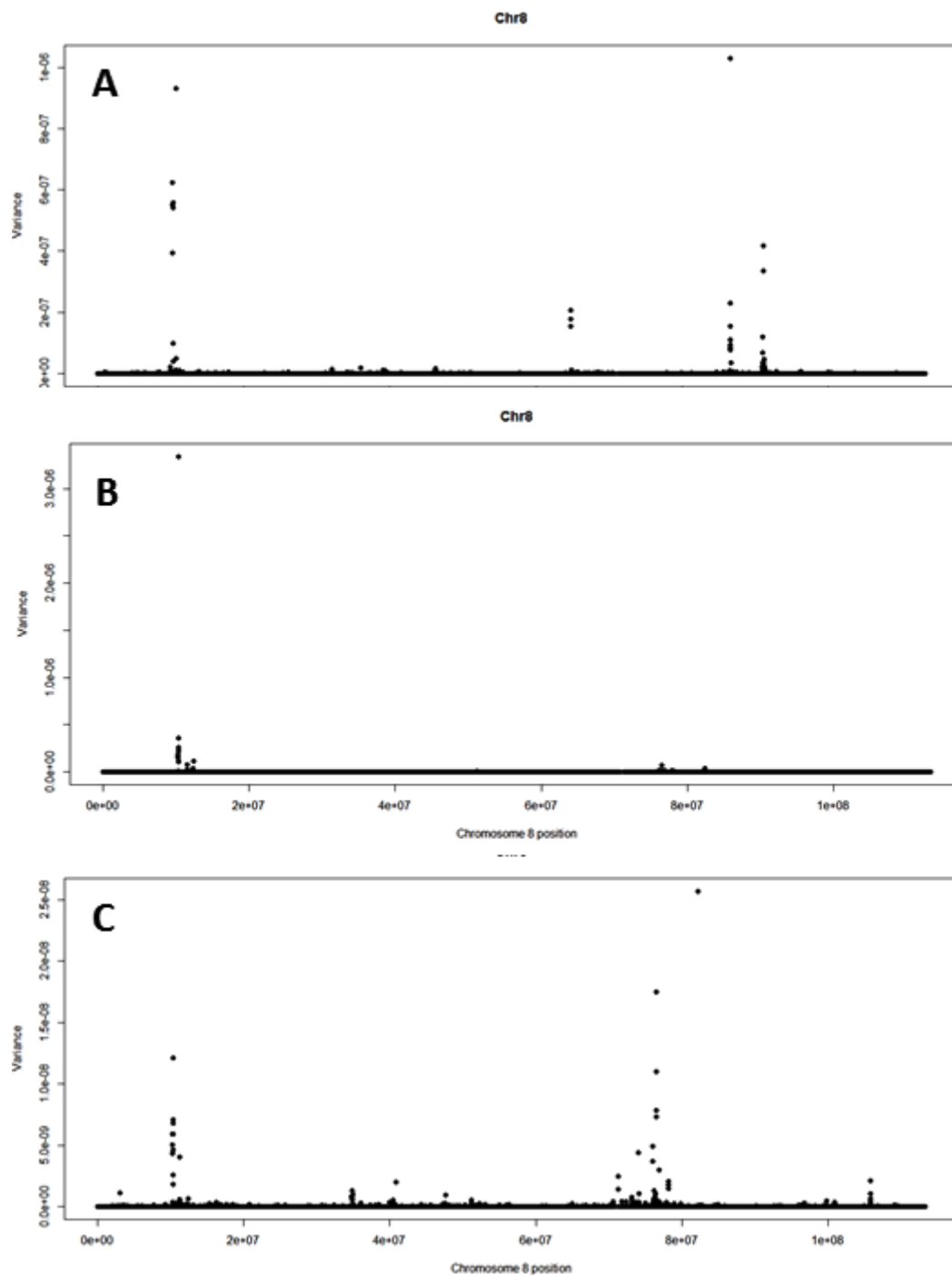


Figura 7. Gráficos representando a variância genética aditiva explicada por SNPs localizados no cromossomo 8 para ferro (A), zinco (B) e fósforo (C).
Fonte: autoria própria

Genes candidatos localizados dentro de 100 kb das regiões dos SNPs mais fortemente associados foram utilizados para procurar por grupos funcionais. A maioria dos genes dentro dessas regiões tem função na transdução de sinal, via de sinalização, parte integrante da membrana, membrana intrínseca, regulação de transcrição e ligação de íons metálicos. Genes da família transportadora de solutos foram identificados como candidatos para as concentrações de todos os minerais no músculo.

Sistemas de influxo celular de íons metálicos são fortemente regulados por ambos os mecanismos de controle transcricional e pós-transcricional (EIDE, 1998). A maioria dos genes que estão subjacentes aos QTLs identificados para influenciar as concentrações de minerais indica que a arquitetura genética da concentração de minerais no músculo provavelmente envolve genes que controlam o transporte e a homeostase de íons. Os genes com funções integrais de membrana, membrana intrínseca e proteínas transmembranares foram identificados como estando associadas com todas as concentrações de minerais pois provavelmente transportam substâncias específicas através de membranas biológicas de uma forma íon-dependente.

A maior parte dos QTLs identificados foram de efeito pequeno (isto é, responsável por menos de 1 % da variância genética aditiva (Tabela 6). Alguns QTLs de grande efeito também foram encontrados. Um QTL que explicou 6,53 % (Figura 8) da variância genética aditiva da concentração de Fe foi detectado localizado a 72 Mb do BTA12 (Tabela 6). A região do genoma que abriga este QTL de efeito importante inclui os genes da família ABC de transportadores (“*ATP-binding cassette family*”). Proteínas ABC transportam certo número de substratos, incluindo íons metálicos através da membrana plasmática, bem como através das membranas intracelulares (VASILIOU *et al.*, 2009). O QTL de maior efeito detectado na raça Nelore associado com teor de Fe foi mapeado em um cromossomo diferente do QTL de maior efeito descrito em Angus, o qual está localizado no BTA15 e explica 4,76 % da variação genética aditiva da característica (MATEESCU *et al.*, 2013). Na verdade, nenhum dos QTLs de grande efeito para concentração de Fe no músculo Longissimus dorsi identificados em Angus (MATEESCU *et al.*, 2013) foi localizado na mesma região dos encontrados neste estudo (Tabela 6). Enquanto um QTL mapeado a 62 Mb do BTA1 explicou 1,52 % da variância genética aditiva da concentração de Fe em Angus, em Nelore essa região genômica explicou apenas 0,05%. Morris *et al.*, (2012) realizaram um estudo em bezerros cruzados Jersey e Limousin para procurar QTLs que influenciavam as concentrações de minerais no fígado, rim e músculo utilizando microssatélites e as regiões do genoma

identificadas para o teor de Fe também foram discordantes com as reportadas no presente estudo.

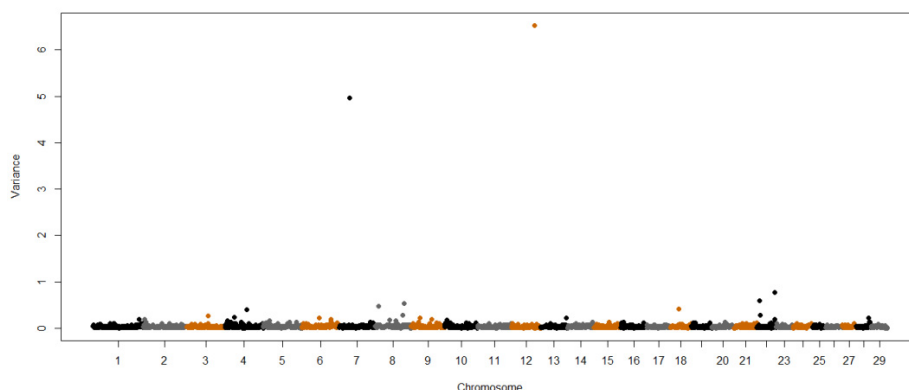


Figura 8. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de ferro no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

Fonte: autoria própria

Outros QTLs de efeitos maiores foram encontrados relacionados com o conteúdo de Se, Ca e Zn e foram localizadas no BTA11 a 22 Mb, BTA8 a 56 Mb e BTA8 a 10 Mb e explicaram 3,53, 2,59 e 2,55 % da variância genética aditiva nesses traços, respectivamente (Tabela 6; Figuras 9, 10 e 11). O QTL de grande efeito identificado no BTA8 a 10 Mb que explicou 2,55% da variância genética aditiva do teor de Zn também explicou 0,47 % da variância genética aditiva na concentração de Fe. Efeitos de substituição de alelo de vários SNPs localizados nesta região estavam na mesma direção para ambas às concentrações de Zn e Fe. A seleção para o genótipo neste QTL poderia ser utilizada para melhorar as concentrações de Fe e Zn simultaneamente no músculo. Além disso, identificamos outros QTLs para conteúdo de Zn no BTA8 situados a 11, 12, 76 e 78 Mb. BTA8 possui importantes QTLs influenciando as concentrações de Ca, Fe, Zn e P (Figura 7). O QTL neste cromossomo associado com Fe localizado à 10 Mb está em uma região que abriga o gene *SCARA5* (“scavenger receptor class A, member 5”) que está relacionado com a homeostase celular e transporte de ferro (LI *et al.*, 2009), e é um bom gene candidato para uma melhor exploração futura.

Algumas regiões encontradas no estudo de associação genômica ampla para as medidas de força de cisalhamento foram também identificadas para conteúdo de Ca. Algumas destas regiões coincidentes incluem as do BTA3 a 11 Mb, BTA17 a 39 Mb, BTA 22 a 44 Mb e BTA 29 a 29 Mb, nas quais estão localizados genes como *TRPM8*

(*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8*), *ULBP3* (UL16 binding protein 3), *C22H3ORF63* (*chromosome 3 open reading frame 63 ortholog*) e *SRPR* (*signal recognition particle receptor (docking protein)*), respectivamente. A influência dessas regiões observadas na maciez da carne pode ser devido aos efeitos das mesmas na regulação do conteúdo de cálcio, o qual é necessário para importantes sistemas proteolíticos *post-mortem*.

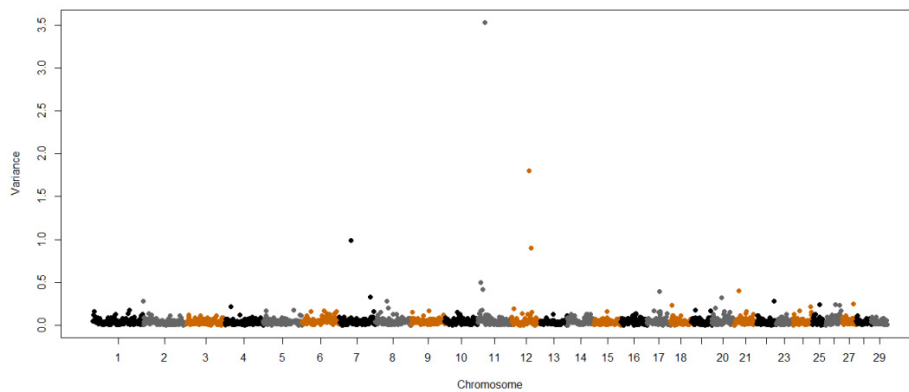


Figura 9. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de selenio no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

Fonte: autoria própria

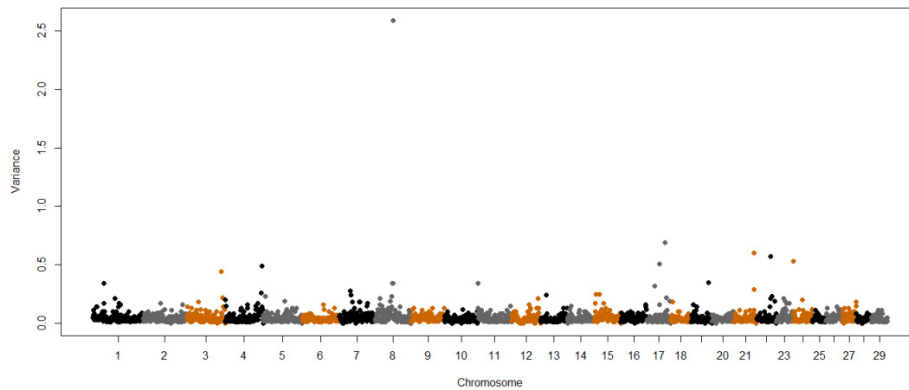


Figura 10. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de cálcio no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

Fonte: autoria própria

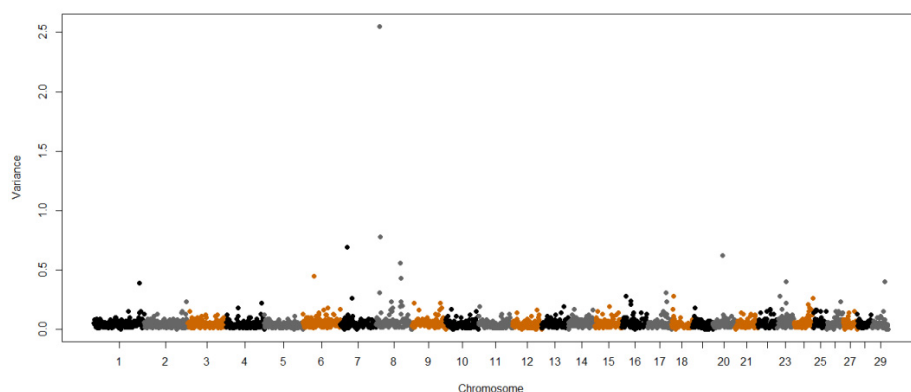


Figura 11. Gráfico da variância genética aditiva explicada por janelas de 1-Mb de marcadores para teor de zinco no músculo Longissimus dorsi da raça Nelore.

Fonte: autoria própria

Tabela 6. Cromossomo, localização, número de SNPs e variação genética explicada pelos QTLs mais importantes associadas com concentração de minerais do músculo Longissimus dorsi na raça Nelore.

Característica	BTA ^a	Posição (Mb) ^b	Número de SNPs ^c	Variância explicada (%) ^d
Arsênio	25	17	227	1,07
Cálcio	8	56	126	2,59
Cromo	20	65	267	1,06
Cromo	9	50	160	1,01
Cobalto	6	70	300	0,48
Cobre	18	29	229	1,06
Ferro	12	72	94	6,53
Ferro	7	32	257	4,97
Magnésio	10	50	144	1,29
Manganês	6	66	219	0,71
Fósforo	3	115	236	1,12
Potássio	10	50	144	1,20
Selenio	11	22	243	3,53
Selenio	12	54	186	1,8
Sódio	6	35	184	0,41
Enxofre	1	28	193	0,71
Zinco	8	10	218	2,55

^aBTA: Cromossomo bovino;

^bPosição (Mb): Posição do QTL no cromossomo em mega bases.

^cNúmero de SNPs dentro de uma janela de 1 Mb

^dPorcentagem da variância genética aditiva explicada pela janela de 1 Mb.

O ferro é necessário para várias vias metabólicas diferentes, que estão continuamente operando no nível molecular e são essenciais para a vida humana (WOOD; RONNENBER, 2006). Como foi encontrado em Angus (MATEESCU *et al.*, 2013), o melhor mineral candidato à seleção genômica foi o Fe, devido à presença do QTL de maior efeito.

Numerosos genes relacionados ao transporte de íons foram encontrados como candidatos para os QTLs detectados como influenciando as concentrações de todos os minerais. Curiosamente, genes relacionados ao transporte de sódio, incluindo os genes *SCN3B* (“voltage-gated, type III, beta subunit”), *SCN4B* (sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit) e *SLC13A2* (“Renal Sodium/Dicarboxylate Cotransporter”) foram especificamente encontrados como candidatos para a concentração de Na, bem como os genes relacionados com a atividade do canal de íons, tais como *SCN3B*, *SCN4B*, *CLIC5* (“chloride intracellular channel 5”) e *KCNJ11* (“potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11”).

Considerando-se o meio celular, o Mg é um dos elementos mais abundantes e está envolvido em essencialmente todas as vias metabólicas. Nossa análise de associação ampla do genoma revelou grupos funcionais de genes localizados nessas regiões de QTLs para o teor de Mg relacionados com a regulação da transcrição e ligação de nucleotídeos. Estudos têm mostrado previamente que o Magnésio iônico está relacionado com a estabilidade do RNA (MISRA; DRAPER, 1998) e DNA (HARTWIG, 2001).

Um estudo recente demonstrou que diferentes regiões genômicas devem influenciar características de qualidade de carne em bovinos zebuínos e taurinos (TIZIOTO *et al.*, 2013). Isto pode ser devido a diferenças entre as subespécies nas frequências alélicas em mutações causais, ou à extensão de DL disponíveis para detectar o QTL (BOLORMAA *et al.*, 2013), o que deve refletir o fato que polimorfismos em genes diferentes influenciam a variação dessas características nessas subespécies. Outra razão para estas inconsistências pode ser devido à resolução das plataformas de genotipagem utilizadas. A plataforma *Illumina BovineHD Bead Chip* utilizada neste estudo tem resolução consideravelmente maior do que a da *BovineSNP50* ou de microssatélites anteriormente empregados, que pode permitir a identificação de regiões genômicas não identificadas através de exames de resolução mais baixa.

Um grande número de registros fenotípicos e validação em outras populações serão necessários para estimar com precisão os efeitos dos QTLs detectados, antes que

esta informação possa ser utilizada de forma eficiente pelos programas de melhoramento genético animal. Apesar das inconsistências entre os QTLs de maior efeito nas raças Angus e Nelore, os grupos funcionais e vias metabólicas identificadas a partir das listas de genes candidatos sugeriram que os QTLs operaram dentro das mesmas vias. Algumas redes de genes comuns como os da família ABC de transportadores que desempenham um papel importante na concentração de Fe também foram encontrados em comparação com o que foi relatado por Mateescu *et al.* (2013).

Estudos que identificam QTLs associados ao teor de minerais teciduais foram apenas recentemente realizados (MORRIS *et al.*, 2012; MATEESCU *et al.*, 2013), e os mecanismos que controlam a homeostase mineral permanecem pouco compreendidos. O aumento do interesse em GWAS é decorrente da perspectiva de uso de marcadores moleculares para melhorar a precisão da estimativa de valor genético e aumentar a nossa compreensão do controle genético de características importantes. Além disso, a identificação de genes responsáveis pela variação de características também pode fornecer “*insights*” sobre os mecanismos biológicos que fundamentam a variação e os efeitos prováveis da seleção sobre esses polimorfismos (PRYCE *et al.*, 2010).

Além da eficiência de produção, programas de melhoramento de gado de corte devem começar a considerar características que influenciam a saúde dos animais e que também poderiam fornecer benefícios à saúde humana (MATEESCU *et al.*, 2013), como a concentração de minerais no músculo/carne. A genotipagem em larga escala tem sido utilizada por mais de 5 anos para explicar a variação em características quantitativas em bovinos, no entanto, os mecanismos biológicos que afetam a variação genética ainda são pouco conhecidos.

2.2.5. Conclusão

Regiões genômicas significativamente relacionadas com a composição mineral do músculo Longissimus dorsi foram identificadas em todos os cromossomos, revelando a natureza poligênica dessas características. Identificamos uma lista abrangente de genes candidatos para os QTLs de maiores efeitos detectados que estão relacionados com o transporte de minerais e homeostase para posterior validação e investigação de mutações causais. O melhoramento genético de características de composição mineral do tecido muscular pode permitir a identificação de animais com a capacidade de utilizar eficientemente a oferta mineral e evitar a produção de carne

nutricionalmente deficiente. Este estudo fornece o primeiro passo para a seleção genômica para a concentração mineral no tecido muscular em bovinos da raça Nelore, a qual envolve a variabilidade em muitos genes. Identificação de variantes causais subjacentes à QTLs de grandes efeitos permitiria a seleção a custo viável para a melhoria das funções de transporte e de metabolismo mineral em bovinos de origem zebuínas.

2.3. Referências

ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **The FASEB Journal**, v.4, p.2868-2880, 1990.

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

ARTHUR, P.F.; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science**, v. 68, p.131-139, 2001.

BARENDSE, W. **DNA markers for meat tenderness**. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1, 2002.

BROWNING, S.R.; BROWNING, B.L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing data inference for whole genome association studies using localized haplotype clustering. **American Journal of Human Genetics**, v.81, p.1084-1097, 2007.

CASAS, E. et al. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.468–473, 1998.

CASAS, E. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 2976–2983, 2003.

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

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

CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520-525, 2006.

CARVALHO, M.E. et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, v.96, n.3, p.1318-24, 2014.

CORVA, P. et al. Association of *CAPNI* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1064-1069, 2007.

DAVIS, G.P.; MOORE, S.S.; DRINKWATER, R.D.; SHORTHOSE, W.R.; LOXTON, I.D.; BARENDSE, W.; HETZEL, D.J. QTL for meat tenderness in the M. Longissimus dorsi lumborum of cattle. **Animal Genetics** v.39, p. 40–45, 2008.

DECKER, J.E. et al. A novel analytical method, Birth Date Selection Mapping, detects response of the Angus (*Bos taurus*) genome to selection on complex traits. **BMC Genomics**, v.13, p. 606, 2012.

EIDE, D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Nutrition**, v.18, p. 441-469, 1998.

FAN, B. et al. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. **PLoS ONE**, v.6, p.14726, 2011.

FERNANDO, R.L.; GARRICK, D.J. **GenSel—User manual for a portfolio of genomic selection related analyses**. 3rd ed. Animal Breeding and Genetics, Iowa State Univ., Ames, 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-12-186-s1.pdf>> Acesso em Janeiro de 2013.

GILL, J.L. et al. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.41, p. 36, 2009.

GILL, J.L. et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. **Meat Science**, v.86, p.985–993, 2010.

GROMBONI, C. **Teores dos elementos químicos essenciais e tóxicos na rastreabilidade da carne bovina**. 2012. 119 p. Tese de doutorado, área de concentração: Química Analítica. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2012.

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

GUTTRIDGE, D.C. Making muscles grow by G Protein–Coupled Receptor Signaling. **Science Signal**, v.4, p.45, 2001.

HAMM, R. Functional properties of the myofibrillar system and their measurement. In: BECHTEL, P. J. (Ed.). **Muscle as food**. Orlando: Academic Press, 1986. p. 135-199.

- HARTWIG, A. Role of magnesium in genomic stability. **Mutation Research** 475:113-121, 2001.
- HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews**, v.10, p.381-391, 2009.
- HOCQUETTE, J.F. et al. The Genotend chip: a new tool to analyse gene expression in muscle of beef cattle for beef quality prediction. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.135, 201.
- HUANG, D.W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v.4, p. 44-57, 2009.
- HUANG, W. et al. Epistasis dominates the genetic architecture of *Drosophila* quantitative traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**. 109:15553-15559, 2012.
- IMUMORIN, I.G. et al. Genome scan for parent-of-origin QTL effects on bovine growth and carcass traits. **Frontiers in Genetics**, v.2, p.44, 2011.
- JOHNSON, D.D.; HUFFMAN, R.D.; WILLIAMS, S.E. effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1980-1986, 1990.
- KEELE, J.W. et al. A region on bovine chromosome 15 influences beef Longissimus dorsi tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1364–1371, 1999.
- KNOCHEL, J.P.; SCHLEIN, E.M. On the mechanism of rhabdomyolysis in potassium depletion. **Journal of Clinical Investigation**, v.51, p.1750–1758, 1972.
- LA ROSA, I. et al. Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos. **Reproductive Biology Endocrinology**, v.9, p.18, 2011.
- LI, J.Y. et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. **Developmental Cell**, v.16, p.35–46, 2009.
- MANCINI, R.A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, p.100-121, 2005.
- MATEESCU, R.G. et al. Genome-wide association study of concentrations of iron and other minerals in Longissimus dorsi muscle of Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v.91, p.3593-3600, 2013.
- MCCLURE, M.C. et al. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner–Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. **Animal Genetics**, v.43, p.662-673, 2012.

- MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387,p.83–90, 1997.
- MEUWISSEN, T.H.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v.157, p.1819–1829, 2001.
- MISRA, V. K.; DRAPER, D.E. On the role of magnesium ions in RNA stability. **Biopolymers**, v. 48, p.113–135, 1998.
- MONNIER, V.M.; KOHN, R.R.; CERAMI, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.81, p.583-587, 1984.
- MORRIS, C.A.; PHUA, S.H. **Metabolic diseases in sheep and cattle. Chapter 15 in: Breeding for Disease Resistance in Farm Animals**, 2010. 3rd. edn. p. 317–34. Ed by SC Bishop, RFE Axford, FW Nicholas and FW Owen, 2010.
- MORRIS, C.A. et al. Effects of quantitative trait loci and the myostatin locus on trace and macro elements (minerals) in bovine liver, muscle and kidney. **Animal Genetics**, v.44, p.361-368, 2013.
- PAGE, B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.3077-3085, 2002.
- PETERS, S.O. et al. Bayesian genome-wide association analysis of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. **Journal of Animal Science**, v.90, p.3398-3409, 2012.
- PRYCE, J.E. et al. A validated genome-wide association study in 2 dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes, **Journal of Dairy Science**, v.93,p. 3331-3345, 2010.
- PULFORD, D.J. et al. The intracellular distribution of small heat shock proteins in *post-mortem* beef is determined by ultimate pH. **Meat Science** v.79,p.623-630, 2008.
- REARDON, et al. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine M. Longissimus dorsi and M. semimembranosus. **Meat Science** v.86, p.270-275, 2010.
- REXROAD, C.E. et al. Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. **Mammalian Genome**, v.12, p.561–565, 2001.
- RINCON, G. et al. Hot topic: Performance of bovine high-density genotyping platforms in Holsteins and Jerseys. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.6116-6121, 2011.
- ROLF, M.M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Animal Genetics**, v.43,p.367-374, 2012.

SAATCHI, M. et al. Accuracy of direct genomic breeding values for nationally evaluated traits in US Limousin and Simmental beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.44, p.38, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84,p.291-299, 2006.

SILVERMAN, G.A. et al. Serpins flex their muscle: putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p.24299-24305, 2010.

STONE, R.T. et al. Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. **Journal of Animal Science** v.83,p.2280-2288, 2005.

SUZUKI, K. et al. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v.376,p. 523-529, 1995.

TANIGUCHI, Y. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life** v.53,p.131-135, 2002.

THALLER, G. et al. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v.34, p.354-357, 2003.

TIZIOTO, P.C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v.45, p.1012-1020, 2013.

TIZIOTO, P.C. et al. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. **Meat Science**, v. 96,p.436-40, 2014.

TIZIOTO, P.C. et al. A SNP in *ASAPI* gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, v.92,p.855-857, 2012.

VANRADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4414–4423, 2008.

VARKI, A. et al (Ed.). **Essentials of glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

WHITE, S.N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, p.2001–2008, 2005.

VASILIOU, V.; VASILIOU, K.; NEBERT, D.W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. **Human Genomics**, v. 3, p.281-90, 2009.

WOOD, R.J. et al. (Ed.). **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 248–270.

WOPEREIS, S. et al. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. **Clinical Chemistry**, v.52, p.574–600, 2006.

ZHAO, C. et al. Functional genomic analysis of variation on beef tenderness induced by acute stress in Angus cattle. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2012, p.756284, 2012.

ZHOU, G. et al. Molecular cloning of the HGD gene and association of SNPs with meat quality traits in Chinese red cattle. **Molecular Biology Reports**, v.37,p.603-611, 2009.

3. Capítulo 3. Identificação de genes Candidatos para maciez de carne na raça Nelore.²

3.1. Resumo

Os genes *KCNJ11*, *MyoD1*, *CALCA* e *ASAPI* foram investigados como candidatos para maciez de carne com base nos efeitos previamente descritos e em suas localizações próximas à QTLs descritos para maciez de carne em bovinos. Variações nas sequências de DNA destes genes foram descritas através do sequenciamento dos mesmos em animais extremos para força de cisalhamento (FC). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram identificados e validados por meio de diferentes abordagens, aproveitando-se de projetos simultâneos que estão sendo desenvolvidos com a mesma população Nelore. Para o gene *ASAPI*, no entanto, adotamos outra estratégia, uma vez que os animais utilizados neste estudo possuem genótipos disponíveis na plataforma *Illumina BovineHD Bead Chip*, a qual apresenta 169 SNPs localizados no gene *ASAPI*. Esses SNPs foram utilizados para reconstrução de fase de ligação e formação de haplótipos para posteriormente investigar a associação entre o gene *ASAPI* e as medidas de FC. Ao sequenciar o gene *KCNJ11* foi possível identificar 22 SNPs. Dois SNPs foram genotipados em toda a população. A análise de associação entre os genótipos e os valores de FC revelou um efeito aditivo de um SNP em diferentes tempos de maturação da carne ($P \leq 0,05$). O sequenciamento do gene *MyoD1* permitiu a identificação de 10 SNPs, no entanto não foi realizada a avaliação de nenhum polimorfismo na população completa. O sequenciamento do gene *CALCA* revelou 15 polimorfismos, sendo que um deles apresentou associação sugestiva nos animais extremos ($P \leq 0,1$). No entanto, essa associação não foi confirmada quando utilizamos a população completa. Três haplótipos do gene *ASAPI* apresentaram associação significativa com maciez de carne ($P \leq 0,05$) em diferentes tempos de maturação. Níveis de expressão mais baixos dos genes *KCNJ11* e *MyoD1* foram relacionados com redução das medidas de FC e, portanto, carne mais macia. Estudos com outras raças e populações podem estimar a real magnitude dos efeitos descritos neste estudo e poderá ajudar a obter *insights* sobre a hipótese de esses polimorfismos constituírem mutações causais.

²Tizioto, P.C. et al. Identification of *KCNJ11* as a functional candidate gene for bovine meat tenderness. *Physiological Genomics*, v. n. 1215-21, 2013.

3.2. Introdução

A maciez da car, p.ne é um dos principais desafios para o mercado de gado de corte (VEISETH *et al.*, 2004). Assim, é importante desenvolver procedimentos para prever com precisão essa característica. No entanto, apesar da sua importância e o conhecimento de sua moderada a alta herdabilidade (O'CONNOR *et al.*, 1997), praticamente não se faz seleção sobre essa característica em programas de melhoramento de gado de corte, provavelmente devido ao custo envolvido na sua avaliação, uma vez que a maciez é medida apenas após o abate do animal, e na dificuldade técnica de mensuração confiável. Uma alternativa para contornar estas limitações é a identificação de marcadores moleculares, que podem ser úteis para selecionar precocemente de forma mais precisa animais com genótipos superiores.

As estratégias tradicionais dos programas de melhoramento não identificam os genes e as vias metabólicas que controlam as características-alvo, e por isso, não fornecem *insight* sobre os mecanismos biológicos que controlam características complexas (GODDARD *et al.*, 2009). A estratégia de gene candidato tem sido adotada na identificação de marcadores moleculares associados com características de importância econômica em bovinos, pois apresenta uma maneira mais acessível, do ponto de vista econômico, para transferência ao produtor. Além disso, a identificação de genes subjacentes à variação de características de produção poderia aumentar a compreensão da biologia dos perfis fenotípicos observados. Geralmente, os genes candidatos são eleitos com base na sua conhecida função fisiológica ou bioquímica e posição genômica estratégica.

Apesar do sistema proteolítico calpaína e calpastatina já ter sido descrito como influenciando a maciez de carne bovina (BARENDSE, 2002; CASAS *et al.*, 2006; CORVA *et al.*, 2007; PAGE *et al.*, 2002; SCHENKEL *et al.*, 2006), essa característica está sob controle poligênico, e os genes identificados até agora apenas explicam pequena parte da sua variação genética. Identificar mais marcadores moleculares relacionados às características de qualidade de carne melhoraria a previsão precoce dessas características. A inclusão de marcadores moleculares validados, associados às características de interesse, em painéis densos de SNPs também beneficiaria a seleção genômica (GODDARD *et al.*, 2009).

O gene *KCNJ11* (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11; Gene Bank ID: 532060), está envolvido na via de secreção de insulina (ALEKSEEV

et al., 2010) e as mutações estão relacionados com a fraqueza muscular (GLOYN *et al.*, 2004). Ele está localizado no BTA15, perto de um loco para característica quantitativa (QTL) descrito para maciez de carne (REXROAD *et al.*, 2001). Camundongos transgênicos que possuíam o gene *KCNJ11* nocauteado reduziram o armazenamento de glicogênio, apresentaram fenótipo magro, menor gordura corporal e fraqueza muscular (ALEKSEEV *et al.*, 2010).

A consideração deste gene como candidato para controlar a maciez da carne foi baseada primeiramente em seu envolvimento na força muscular (ALEKSEEV *et al.*, 2010; GLOYN *et al.*, 2004). Outras investigações da função do gene *KCNJ11* revelaram um papel importante no armazenamento de glicogênio, uma componente chave do processo bioquímico *post-mortem* que ocorre durante a transformação do músculo em carne.

Na mesma região desse QTL no BTA15 encontram-se mais dois genes potencialmente candidatos a influenciar a maciez da carne conhecidos como *CALCA* (*Calcitonin gene-related peptide 1 precursor*) e *MyoD1* (*Myogenic Differentiation 1*) (REXROAD *et al.*, 2001). O gene *CALCA* codifica o hormônio calcitonina, o qual está envolvido na regulação de cálcio e no metabolismo de fósforo. Já o gene *MyoD1* codifica uma proteína que regula a diferenciação de células musculares, induzindo a parada do ciclo celular, um pré-requisito para iniciação miogênica. Essa proteína ativa promotores músculo-específicos, além de estar envolvida na regeneração muscular (CALVO *et al.*, 1999; HAWKE *et al.*, 2001; LAGIRAND-CANTALOUBE *et al.*, 2009).

Optou-se por minerar essa região do cromossomo 15, pois há relatos prévios de um QTL importante para maciez (REXROAD *et al.*, 2001). Apesar desta não ter sido identificada no estudo de associação genômica ampla previamente apresentado, não havia muitos SNPs representativos na raça Nelore na plataforma *Illumina BovineHD Bead Chip* para esses genes candidatos específicos, e portanto associações importantes podem não ter sido identificadas.

Além disso, análises prévias utilizando uma amostra da população Nelore utilizada neste estudo, mostraram uma associação entre o gene *ASAPI* (TIZIOTO *et al.*, 2012) e maciez de carne. O gene *ASAPI*, localizado no BTA14 codifica uma proteína de transdução de sinal envolvida na diferenciação de fibroblastos em adipócitos e possivelmente de outros tipos celulares (KING *et al.*, 1999). Na plataforma *Illumina BovineHD Bead Chip*, em que todos os animais do presente estudo foram genotipados,

há 169 SNPs localizados nesse gene, sendo assim, optou-se também por validar os resultados previamente obtidos, realizando um estudo da associação das combinações haplotípicas construídas com os SNPs representados no chip localizados no gene *ASAPI* e as medidas de força de cisalhamento.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os genes *KCNJ11*, *MYOD1*, *CALCA* e *ASAPI* como candidatos a influenciarem a maciez da carne bovina. Para alcançá-lo, polimorfismos foram identificados e estudos de associação foram realizados numa população Nelore, utilizando tanto a variação nucleotídica quanto a variação de abundância de mRNA.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Animais e Coleta de dados fenotípicos

Um total de 460 novilhos Nelore produzidos, criados, confinados e fenotipados quanto à variação da força de cisalhamento medida após 24 h *post-mortem* (FC0), após sete dias de maturação da carne (FC7) e após 14 de maturação da carne (FC14) foram utilizados neste estudo, conforme descrito no item 2.1.3.1. do Capítulo 2.

3.3.2. Extração de DNA

A extração de DNA e avaliação da integridade do mesmo foi realizada conforme descrito no item 2.1.3.2 do Capítulo 2.

3.3.3. Seleção de animais extremos fenotípicos

Para identificar polimorfismos nos genes candidatos, amostras de 14 animais caracterizados como extremos da distribuição da FC medida a 24 *post-mortem* (FC0) foram selecionados para o sequenciamento. Estes animais foram escolhidos com base nos valores residuais obtidos a partir de um modelo estatístico utilizado para corrigir os valores de FC0 para variações ambientais, considerando os efeitos fixos de grupos de contemporâneos (GC), nos quais foram incluídos os efeitos de local de nascimento, local de confinamento, estação de monta e lote de abate. A idade do animal no abate e o pH da amostra de carne foram incluídos como covariáveis. Após a ordenação dos valores residuais, animais classificados entre os 5% maiores e menores valores foram selecionados, considerando-se ainda que fossem representadas famílias de meio-irmãos diferentes.

3.3.4. Sequenciamento dos genes *KCNJ11*, *CALCA* e *MyoD1* pela metodologia de Sanger

Os iniciadores (primers) de sequenciamento (Tabela 7, 8 e 9) foram desenhados com auxílio do software primer 3 plus, disponível on line (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para cobrir quase completamente os genes *KCNJ11* e *CALCA*. O gene *MyoD1* foi sequenciado completamente. A qualidade dos primers foi verificada pelo software OligoAnalyzer do site <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Foram escolhidos os melhores pares de primers desenhados, ou seja, os pares que apresentam ΔG maior que 0 (ideal para que não ocorram reações espontâneas), que não formaram hairpin (primers que não foram auto complementares) e que o produto de amplificação tivesse aproximadamente 600 pb.

Tabela 7. Descrição dos primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *KCNJ11* localizado no cromossomo 15 de 35650715 a 35653365 pares de base (GenBank ID: 532060).

Primer	Sequências 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Início do primer (pb)*
1F	TGTGTGAGGTCTGGTCAGCC	582	35650754
1R	ACACGTCCTGTAGGAAGCGG		35651316
2F	TATGTGCTCACGCGACTAGC	707	35651191
2R	ACCCACACCATTCTCCATGG		35651878
3F	AGTGCCACCATCCACATGCA	644	35651791
3R	AGCCTCACACAAGGTCCTGG		35652415
4F	GCCCAAGTTCAGCATCTCTC	556	35652288
4R	CTCATCACCTGCCCTTCCTA		35652824
5F	GAAGAACAGGCCCCACATT	686	35652697
5R	GCAAGAACAGCCCAGAGTTT		35653363
6F	AGGCCATTGATTGTGACCGG	533	35653248
6R	GATGAGGCAACTGAAGCACA		35653761

F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base, *Início de cada *primer* no BTA 15 de acordo com a versão UMD3.1 disponível no banco de dados NCBI.

Tabela 8. Descrição dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *MyoD1* localizado no cromossomo 15 de 35331399 a 35334046 pares de base (GenBank ID: 281938).

Primer	Sequências 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Ínico do primer (pb)*
1F	GGGAGCCTGGTGTGAAAGTA	560	35331372
1R	TAGTCGTCTTGCGTTTGAC		35331912
2F	CGGGCCGCTGTTTACTGT	598	35331881
2R	TTCTAACAGTGCCCCCAGTC		35332459
3F	GGATGCACAGGAAGGATACG	577	35332431
3R	CAGCCAGAATTCGTGAGGAT		35332988
4F	CTAAGCATGTAGTTCCTCC	566	35332944
4R	CAACAGTTCCTCGCCTCTC		35333491
5F	TCCTCCCAACAGCGCTTTAA	640	35333450
5R	TAAAATCCAGTCCCAACC		35334072

F: *forward*; R: *reverse*; pb= pares de base; *Início de cada *primer* no BTA 15 de acordo com a versão UMD3.1 disponível no banco de dados NCBI.

Tabela 9. Descrição dos *primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *CALCA* localizado no cromossomo 15 de 38160931 a 38166439 pares de base pelo método de Sanger (GenBank ID: 614663).

Primer	Sequências 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Ínico do primer (pb)*
1F	ATCCTTCCCATCATTGGTTG	593	38160841
1R	CGCAAATTCTGAACCCATTT		38161414
2F	GGAATAACTTTGTGCGGACC	643	38161353
2R	AGGACCAGGAAGGGCAGAA		38161977
3F	CAGGTCTCTGGGTTCACTAA	622	38161891
3R	GATAATGGCAGTTTGAGTCTG		38162490
4F	TAATCTCCTAACTGCTTGGC	536	38162382
4R	TTCTGTCTCCGGCTTCAGT		38162899
5F	GTTAGTTGGTCAGCCATGTC	626	38164201
5R	CCTAACTCCAGCTACCCAGG		38164807
6F	TGAACATGCCTGTCACTGG	646	38164682
6R	CACAGAACTATAGCAGCCAAT		38165307
7F	GCTCCTCCAGGGAATTTTC	615	38165183
7R	TGTTAGAGTGTGGGCTGTAC		38165778
8F	ACTCCAGGAAGAAAGGTGAG	470	38165711
8R	AAGGTGGGTACGATTGTTGC		38166161
9F	GAGCCTCAGTTTCCCATAT	440	38166132
9R	ACCTCATGTGCTCCTGAAGT		38166552

F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base; *Início de cada *primer* no BTA 15 de acordo com a versão UMD3.1 disponível no banco de dados NCBI.

Após testes para estabelecer as concentrações dos reagentes e a temperatura de amplificação específica dos *primers*, foram estabelecidas as seguintes concentrações: tampão de reação 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,2 mM de cada dNTP, 0,165 μM de cada *primer*; 0,65 unidades da enzima Taq DNA polimerase e 200 ng de DNA. Água deionizada autoclavada foi adicionada para completar o volume final de 15 μL .

A amplificação constou das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C para a desnaturação inicial das fitas do DNA, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 59° : temperatura de anelamento dos *primers*, 45 segundos a 72 °C. Após os 35 ciclos, o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 10 minutos a 72 °C.

As reações de PCR foram purificadas com o kit *ExoSAP*. Para purificação foram adicionados 2 μL de *ExoSAP* a 5 μL de produto da PCR, a mistura foi colocada no termociclador durante 15 minutos a 37 °C e 15 minutos a 80 °C.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing* da Applied Biosystem. Para a reação de sequenciamento adicionaram-se 6 μL de água, 1 μL de Big dye (que contem DNA polimerase, ddNTPs marcados e dNTPs), 1 μL de tampão (Mg^{+2} e Tris-HCl), 4 pmol de *primer* e 1 μL de produto de PCR. As condições para reação de sequenciamento constaram de: pré-incubação a 94 °C por 2 minutos e 25 ciclos a 96 °C por 20 segundos, 59°C por 10 (temperatura de anelamento dos *primers*) e 60 °C por 4 segundos.

Os produtos de sequenciamento foram purificados para evitar que os reagentes não incorporados interferissem na leitura do seqüenciamento. Para isso foram adicionados 40 μL de isopropanol 65% à temperatura ambiente (TA), homogeneizados e incubados no escuro a TA por 15 minutos. Passado este tempo, centrifugou-se por 25 minutos a 16.000 g em TA e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados 200 μL de etanol 60%, a TA, centrifugou-se por 5 minutos a 16.000 g a TA e o sobrenadante foi descartado (a lavagem com etanol 60% foi repetida duas vezes). As reações ficaram no escuro para secar durante 1 hora e depois foram armazenadas em

freezer (-20°C). A análise dos produtos de sequenciamento foi feita no sequenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems).

3.3.5. Análise do sequenciamento de Sanger e descrição de SNPs

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram submetidos à análise de qualidade através do programa Phred (EWING *et al.*, 1998), que atribui um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Quanto maior o valor atribuído pelo programa Phred, menor a probabilidade de ter ocorrido erro na designação do nucleotídeo. Em seguida, as sequências foram submetidas ao programa de montagem Phrap (disponível em: <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>), que agrupa as sequências organizando-as em contigs. A visualização das sequências geradas foi realizada pelo programa Consed (GORDON *et al.*, 1998) que permite a visualização dos SNPs (PROSDOCIMI *et al.*, 2002). Os SNPs presentes em éxons foram identificados através de pesquisas em bancos de dados públicos, com base nos frames de leitura dos genes. Estes foram analisados quanto à alteração de aminoácidos utilizando o programa Gene Runner (disponível em: <http://www.generunner.net/>).

O programa Haploview (BARRETT *et al.*, 2005) foi utilizado para determinar o desequilíbrio de ligação e para identificar Tag SNPs. O teste exato de Fisher foi aplicado para determinar se as frequências alélicas diferiam entre extremos para FC0, comparando os genótipos em cada extremo.

3.3.6. Sequenciamento de próxima geração de fragmentos do gene CALCA

Aproveitando experimentos paralelos do nosso grupo de pesquisa, desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, e da aquisição recente de um novo equipamento de sequenciamento de próxima geração (MiSeq, Illumina Inc., San Diego, CA), regiões do gene *CALCA*, para as quais o sequenciamento pela metodologia de Sanger havia sido mal sucedido, foram sequenciados conforme a metodologia a seguir.

As bibliotecas foram sintetizadas e quantificadas conforme o protocolo Nextera da Illumina adaptado. (http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/2a3297c5-8a34-4fc5-a148-3e16666fd65e/nextera_dna_sample_prep_guide_15027987_b.pdf).

Brevemente, *primers* contendo caudas com as sequências de adaptadores Illumina (Tabela 10) foram desenhados e sua qualidade foi avaliada conforme descrito no item 3.3.4. Após testes para estabelecer as concentrações dos reagentes e a

temperatura de amplificação específica dos primers, foram estabelecidas as seguintes concentrações: tampão de reação 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,2 mM de cada dNTP, 0,165 μM de cada primer, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA. Água miliQ autoclavada foi adicionada para completar o volume final de 25 μL .

A amplificação constou das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C para a desnaturação inicial das fitas do DNA, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 60° C (temperatura de anelamento dos primers), 45 segundos a 72 °C. Após os 35 ciclos, o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 10 minutos a 72 °C.

Após fazer um pool dos produtos das amplificações (5 μL de cada produto) para cada animal, realizou-se a purificação utilizando o sistema de *beads* magnéticas (AMPure XP *beads*), seguindo o protocolo recomendado. (http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/2a3297c5-8a34-4fc5-a148-3e16666fd65e/nextera_dna_sample_prep_guide_15027987_b.pdf).

Os produtos das PCRs purificados foram então enriquecidos através de uma PCR de 8 ciclos com o Kit de 96 indexes específicos para os adaptadores – Illumina, os quais possibilitam a demultiplexação das amostras que serão posteriormente agrupadas. O material foi novamente purificado através do sistema de *beads* magnéticas. Uma vez que não utilizaríamos a capacidade real do sequenciador MiSeq, ou seja teríamos uma cobertura grande de cada fragmento (<100x), a representação equimolar de todas as bibliotecas não era necessária. Por isso, todas as bibliotecas (cada biblioteca representando um animal) foram agrupadas (5 μL de cada biblioteca) e a quantidade do pool de bibliotecas foi determinada utilizando PCR quantitativo. Os 96 animais (delimitado pelo número máximo de combinações de indexes possíveis) foram escolhidos aleatoriamente, considerando-se amostrar diferentes famílias (maior variabilidade).

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq da Illumina, seguindo as recomendações do fabricante para o protocolo de *pair-end reads* de 500 ciclos utilizando o Kit v2.

Tabela 10. Descrição dos primers utilizados para amplificação e sequenciamento no equipamento Miseq do gene *CALCA* (Gene ID: 614663).

PR	Sequências 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)
1F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGAA GGGACTATGGTTGCC	406
1R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCAC ATTTCTATATCCCCTGAA	
2F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGTA TTGGAGGAGTTTAGCC	393
2R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCATT CACATGCTGCTCAGTC	
3F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCACCC TGAGTTTTGAGTTCACA	392
3R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAATC TTGTTGAGGTCCTGTGTGT	

PR: *Primers*; F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base

Os SNPs presentes em éxons foram identificados através de pesquisas em bancos de dados públicos, com base nos frames de leitura dos genes. Estes foram analisados quanto à alteração de aminoácidos utilizando o programa Gene Runner (disponível em: <http://www.generunner.net/>).

3.3.7. Análise do sequenciamento de próxima geração e descrição de SNPs

Os dados obtidos pelo Miseq (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisados seguindo três etapas principais. O equipamento possui uma plataforma integrada que fornece as análises dos dados, no entanto optou-se por fazer o alinhamento e a mineração dos SNPs manualmente para ter maior controle das metodologias e filtros de qualidade utilizados. O MiSeq Reporter software gera métricas de controle de qualidade que nos permitem analisar a qualidade das bibliotecas e o desempenho do sequenciamento. A demultiplexação das bibliotecas e a remoção das sequências dos adaptadores foram realizadas utilizando o software Miseq Reporter integrado na plataforma Miseq.

O programa Bowtie v.0.12.8 (LANGMEAD *et al.*, 2009) foi utilizado para o mapeamento das *reads* em relação ao genoma de referência de *Bos taurus* (versão UMD3.1) disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para cada amostra, um arquivo de extensão “.bam” (arquivo

binário do mapeamento da sequência) foi gerado, o qual foi utilizado para mapeamento de polimorfismos utilizando a ferramenta mpileup do programa samtools (<http://samtools.sourceforge.net/samtools.shtml>). Para filtragem dos dados obtidos, utilizamos SNPs e deleções com cobertura de *reads* superior a 30, com MAF > 5% e qualidade de genotipagem gerada pelo Samtools ≥ 50 .

Os SNPs identificados nessa região estavam disponíveis para 96 animais. Para verificar uma associação desses SNPs com a população foi utilizado o método da máxima verossimilhança restrita (REML) implementado no programa SAS como será descrito no item 3.3.10 posteriormente.

3.3.8 Avaliação dos efeitos dos SNPs selecionados nos genes candidatos.

Um SNP prospectado no gene *KCNJ11* foi escolhido para avaliação na população com base no teste exato de Fisher realizado para identificar uma associação prévia entre os animais extremos e a maciez da carne. Para a escolha do outro SNP buscou-se um TagSNP, ou seja, um SNP que apresentasse uma região de alto desequilíbrio de ligação com outros SNPs contidos no gene. Um SNP no gene *CALCA* também foi escolhido com base no teste de Fisher, além de ser considerada a frequência alélica satisfatória encontrada na população.

A determinação dos genótipos dos SNPs nos genes *KCNJ11* e *CALCA* foi realizada por meio da PCR em Tempo Real. Foi utilizado o sistema de detecção por sondas de hidrólise TaqMan™ (Applied Biosystems) em que sondas alelo-específicas pareiam na região alvo do SNP e permitem a identificação dos diferentes alelos. Para genotipagem por TaqMan™ foram utilizados 2,5 μL de master mix, 0,125 μL de ensaio, 7ng de DNA. Água foi adicionada para completar o volume final da reação de 5 μL . Os primers fornecidos pela Applied, utilizados na reação estão descritos na Tabela 11.

Uma vez que não encontramos associação prévia realizando o teste de Fisher, um SNP do gene *MyoD1* foi escolhido para avaliação na população devido ao padrão apresentado pela árvore de haplótipos desse gene. Árvores de haplótipos são utilizadas para estimar a história evolutiva da variação genética. Este tipo de estudo pode também ser utilizado para testar hipóteses sobre o significado evolutivo da variação genética e para identificar mutações que estão associados a fenótipos. A árvore de haplótipos das variações genéticas encontradas para o gene *MyoD1* foi construída utilizando o software TCS v1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000).

Tabela 11. Descrição dos primers Forward (F); Reverse (R); sonda alelo específica marcada com VIC e alelo específica marcada com FAM, disponibilizados pela Applied Biosystems, utilizados para genotipagem dos SNPs por Taqman.

Gene	Primer (F e R) 5'-3'	Sondas
<i>KCNJ11</i> 1526C>T	GCTGCACCTGCCTGTTC AGTCTCTCTCAGCCTCTTTCAGT	<u>VIC</u> -CTGTCCCCCACCCTGG (C) <u>FAM</u> -TCTGTCCCCTACCCTGG (T)
<i>KCNJ11</i> 2342T>C	CCCAGCCTGCTGGATGT CCACGGTGCCTTGC	<u>VIC</u> -CCTGACCCTTGTCCGC (T) <u>FAM</u> -CTGACCCTCGTCCGC (C)
<i>CALCA</i>	CCGTGGGTTTCAGAACTTGGT GCTCCCAGAACCTGCAACT	<u>VIC</u> -CGTTGTACCTATTTGCCACCCGCTT (A) <u>FAM</u> -CGTTGTACCTATTTGCCACCCACTT(G)

F: *forward*; R: *reverse*.

3.3.8. Reconstrução da fase de ligação e blocos haplotípicos dos SNPs localizados no gene *ASAPI*

A genotipagem dos animais no Illumina BovineHD BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA) e o controle de qualidade foram realizados conforme descritos do item 2.1.3.2. do Capítulo 2.

Uma vez que o gene candidato *ASAPI* apresentava vários SNPs representados no chip, esse não foi sequenciado, optando-se por trabalhar com a associação dos haplótipos construídos com os SNPs já genotipados pelo chip. Os haplótipos foram construídos utilizando o software FastPhase (SCHEET; STEPHENS, 2006), que utiliza um algoritmo baseado em Cadeia de Markov oculta. Esse método, baseado em um modelo de cluster de haplótipos descrito por Scheet; Stephens (2006), assume que, ao longo das regiões curtas de um cromossomo, os haplótipos tendem a se aglomerar em grupos. Devido à recombinação, os grupos de haplótipos, que são semelhantes em uma região de um cromossomo, serão diferentes em outra região, de acordo com a taxa de decaimento no desequilíbrio de ligação.

Os blocos haplotípicos foram construídos utilizando o programa Haploview (BARRETT *et al.*, 2005) . Para análise de associação foram considerados somente combinações haplotípicas encontradas em pelo menos a quatro animais.

3.3.9. Extração de RNA e dados de expressão gênica

Amostras do músculo Longissimus dorsi de 136 animais, colhidas no momento do abate dos animais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80 ° C até a extração de RNA. O RNA total foi extraído de 50-100 mg de tecido muscular, e 1µg de RNA total de cada amostra de músculo foi utilizado para realizar a transcrição reversa, utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System kit (Promega). A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração o RNA foi quantificado e submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do mesmo.

A expressão do gene *CALCA* não foi investigada, uma vez que esse gene não está expresso em tecido muscular. A análise da expressão dos genes *KCNJ11*, *MyoD1* e *ASAP1* foram realizadas utilizando o sistema de detecção LightCycler® 480 (Roche) no laboratório de Biotecnologia Animal, localizado na ESALQ - USP. Reações foram preparadas para um volume final de 10 µl contendo 1 mL de cDNA diluído 10x, 5 mL de SYBR Green I Master (Roche) 2x e 0.4 mM de cada primer. O desenho dos primers mostrados na Tabela 12 foi realizado baseado na sequência gênica depositada no GenBank, como descrito para o sequenciamento gênico. Para assegurar a qualidade do ensaio de PCR em tempo real, os tamanhos dos amplicons ficaram entre 80 e 150 pares de bases, os primers tiveram pelo menos 50% conteúdo de GC, *primer forward* e *primer reverse* foram desenhados em diferentes éxons ou em junção éxon-éxon, tendo no máximo 2°C de diferença na temperatura de *melting* entre os primers do mesmo gene.

Os genes constitutivos *RPL-19* (ribosomal protein L19), *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e *EEF1A* (Eukaryotic elongation factor 1A) foram utilizados como genes de referência na quantificação relativa. Para cada gene, a eficiência individual de todas as amostras foi calculada através do software LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003), utilizando pelo menos quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial das reações.

Tabela 12. Primers utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene (GenBank ID)	Sequência dos primers (5'-3')
<i>KCNJ11</i> (532060)	F: AGTGCCACCATCCACATGCA R: ACCCACACCATTCTCCATGG
<i>MyoD1</i> (281938)	F: GTTCCGACGGCATGATGG R: ATGCTGGACAGGCAGTCG
<i>ASAP1</i> (327705)	F: GAGACCACCGAGGACTACAAC R : CTGTAAGGCTGTTCTATCTTGGTC
<i>EEF1A</i> (AJ238405.1)	F: GCAGCCATTGTGGAGATG R: ACTTGCCCGCCTTCTGTG
<i>GAPDH</i> (281181)	F:GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT
<i>RPL-19</i> (510615)	F: GAAATCGCCAATGCCAAC R: GAGCCTTGTCTGCCTCA

Os dados de fluorescência obtidos no LightCycler ® 480 (Roche) foram exportados para o LinRegPCR, que usa uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR para determinar a quantidade de mRNA na amostra (R_0) e a eficiência de amplificação (E) usando as equações 1, 2 e 3. O software determina também os valores de C_t (*cycle threshold*) para cada amostra.

$$\log R = \log (E+1) \times n + \log R_0; \text{intercepto} = \log R_0, \text{inclinação} = \log [E + 1] \quad (1)$$

$$R_0 = 10^{\text{Intercepto}} \quad (2)$$

$$E = 10^{\text{inclinação} - 1} \quad (3)$$

A eficiência individual de todas as amostras foi calculada com o programa LinRegPCR utilizando pelo menos quatro pontos da curva de amplificação durante a fase exponencial da PCR. Um procedimento foi adotado para corrigir as eficiências individuais para a eficiência ideal, definida em 2.0 (Equação 4).

$$C_{t_{ij}} = \log_2 (E_{\text{gene}_{ij}}^{/ct/-\text{gene}(ij)}) \quad (4)$$

Na qual:

$C_{t_{ij}}$ é o C_t da amostra ij corrigido para a eficiência 2.0

$E_{\text{gene}_{ij}}^{C_{t_{\text{gene}(ij)}}$ é a atual eficiência calculado pelo LinRegPCR elevado pelos C_t das amostras para o ij .

3.3.10. Análises estatísticas

Nas análises para avaliar a influência dos marcadores sobre a maciez de carne na população Nelore estudada foi utilizado um modelo misto com os efeitos fixos de grupo de contemporâneos e genótipos do marcador, a idade do animal na data do abate e o pH foram incluídos como covariáveis, além do efeito aleatório do touro (progenitor). Para formação dos grupos de contemporâneos foram considerados, os efeitos de local, local de confinamento, estação de monta e lote de abate. As análises foram realizadas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 2000).

O modelo matemático utilizado para investigar a associação entre o marcador e os diferentes tempos de força de cisalhamento foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + GC_i + M_j + T_k + b_1(A_{ijkl}-a) + b_2(P_{ijkl}-P) + e_{ijkl} \quad (5)$$

em que:

Y_{ijklm} = Observação no m-ésimo indivíduo, de idade A, filho do k-ésimo touro, do j-ésimo genótipo para o marcador, pertencente ao i-ésimo grupo de contemporâneos.

μ = Média Geral

GC_i = Efeito fixo do i-ésimo grupo de contemporâneos;

M_j = Efeito fixo do j-ésimo genótipo para o marcador;

T_k = Efeito aleatório associado ao pai do animal, $N\sim(0, \sigma_t^2)$;

b_1 = Coeficiente de regressão associado à idade do animal

A_{ijkl} = idade do animal na data da medida, a é a idade média da medida.

b_2 = Coeficiente de regressão associado ao pH de cada amostra

P_{ijkl} = valor pra cada observação de pH, p é o pH médio das amostras.

e_{ijkl} = erro aleatório, suposto normalmente e independentemente distribuído com média zero e variância σ_e^2

O procedimento mixed procedure of SAS (proc mixed) foi utilizado para testar um modelo aditivo-dominante.

RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real) é um processo que envolve muitos passos (como por exemplo, quantificação de RNA, eficiência da transcriptase reversa) em que a variação não controlada pode levar a resultados imprecisos. Isto pode ser evitado através da normalização dos dados contra um gene de referência apresentando diferença mínima entre as amostras e tratamentos. Encontrar genes que não sofrem

variação entre amostras e tratamentos e que possam ser usados como referência não é uma tarefa trivial. Vários genes potenciais devem ser testados antes que os adequados possam ser identificados.

Métodos diferentes têm sido propostos para a seleção de genes de referência adequados, incluindo métodos que levam em consideração que a variação resultante entre as amostras pode ser devida a efeitos fixos (tratamento, idade do animal, gênero, raça, manejo e base genética), efeitos aleatórios (amostra animal), suas interações e variâncias heterogêneas dos genes de referência (REVERTER *et al.*, 2004; REVERTER *et al.*, 2005). Foi utilizado um modelo linear geral misto, que considera os efeitos fixos e aleatórios originados a partir do desenho experimental e outras variáveis, de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + e_{ij} \quad (6)$$

na qual:

Y_{ij} é o C_t para cada gene i na amostra j ;

μ é a média geral do C_t ;

G_i é o efeito fixo para o gene i th ($i=1, \dots, 5$);

S_j é o efeito aleatório associado com a amostra considerando $s_j \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$;

e_{ij} é efeito aleatório residual, com $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$.

Com base no modelo, melhores preditores lineares não viesados (BLUPs) foram obtidos para efeito de amostra aleatória, e estes foram utilizados para obter e ajustar o C_t valor (C_tA).

Após o ajuste dos valores de C_q , um modelo linear geral misto que inclui efeitos de abate, de parentesco, idade e do pH foi aplicado para cada tempo de maturação da carne para verificar a associação entre o nível de expressão dos genes *KCNJ11*, *MyoD1* e *ASAP1* e a maciez da carne.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Estatística descritiva das características de produção de carne

A Tabela 13 apresenta os dados de estatística descritiva para força de cisalhamento em diferentes fases de maturação da carne.

Tabela 13. Estrutura dos dados (estatísticas descritivas) das características estudadas.

Característica	N	Média ± DP	CV (%)	Mínimo	Máximo
FC0	461	8,82±2,02	20,68	2,91	12,12
FC7	423	5,09±1,62	29,71	1,91	10,31
FC14	434	4,05 ±1,40	35,08	1,49	9,61

N: Número de animais avaliados; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; FC0: força de cisalhamento medida após 24 horas do abate dos animais; FC7: força de cisalhamento medida após 7 dias de maturação da carne; FC14: força de cisalhamento medida após 14 dias de maturação da carne.

A diferença no número de animais utilizados para as diferentes medidas de força de cisalhamento deve-se ao fato de ter havido perdas durante o processo de maturação, por exemplo, devido a embalagens danificadas.

É possível observar um aumento gradativo da maciez da carne nas diferentes fases de maturação, o que era esperado do ponto de vista bioquímico. Durante o processo de maturação da carne, a ação de enzimas endógenas responsáveis pela maciez, como por exemplo, as Calpaínas, são potencializadas. Essas enzimas são capazes de degradar as proteínas miofibrilares, causando assim um aumento da maciez da carne. Após cerca de quatro dias de maturação, grandes mudanças são observadas na maciez da carne, por ação das Calpaínas (MORAIS; AZEVEDO, 2003). As Calpastatinas, responsáveis por inibir a ação das Calpaínas, causando diminuição da degradação das proteínas miofibrilares, também influenciam as medidas de maciez da carne decorrentes do processo de maturação.

3.4.2. Análises de variância para força de cisalhamento nos diferentes tempos de maturação da carne

As Tabelas 14, 15 e 16 apresentam um resumo da análise de variância da característica força de cisalhamento medida em diferentes fases de maturação da carne. Estas demonstram os efeitos de grupo de contemporâneos, pai, idade do animal na data do abate e pH incluídos no modelo estatístico e fornecem o quanto o modelo está explicando da característica, através da medida do coeficiente de determinação.

Tabela 14. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida 24 horas *post-mortem*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	FC0	
		Quadrados médios	Valor de P
Grupo de Contemporâneos	11	10,75	≤ 0,0001***
Pai	30	1,70	0,6177
Idade	1	4,04	0,1461
pH	1	2,25	0,2774
Resíduo	154	1,89	-
R ²		0,47	

R²: coeficiente de determinação; Idade: idade do animal na mensuração; *** P ≤ 0,01.

Tabela 15. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida após 7 dias de maturação da carne.

Fonte de variação	Graus de liberdade	FC7	
		Quadrados Médios	Valor de P
Grupo de Contemporâneos	11	6,09	≤ 0,0092***
Pai	30	2,81	0,3340
Idade	1	0,11	0,8342
pH	1	5,57	0,1407
Resíduo	148	2,54	-
R ²		0,32	

R²: coeficiente de determinação; Idade: idade do animal na mensuração. *** P ≤ 0,001

Tabela 16. Resumo das análises de variância da força de cisalhamento medida após 14 dias de maturação da carne.

Fonte de variação	Graus de liberdade	FC14	
		Quadrados médios	Valor de P
Grupo de Contemporâneos	11	5,93	≤ 0,0005***
Pai	30	1,48	0,7363
Idade	1	8,52	0,0320**
pH	1	2,15	0,2787
Resíduo	151	1,81	-
R ²		0,34	

R²: coeficiente de determinação; Idade: idade do animal na mensuração; *** P ≤ 0,01; **P ≤ 0,05.

3.4.3. Identificação de SNPs nos genes candidatos sequenciados e escolha de SNPs para avaliação na população

O gene *MyoDI* foi sequenciado completamente, no entanto, para os genes *KCNJ11* e *MyoDI*, as regiões cromossômicas de 35650316 até 35650754 e 38162918 até 38163092 pares de base (pb), respectivamente, não foram sequenciadas devido a problemas de amplificação de alguns fragmentos.

O sequenciamento do gene *KCNJ11* revelou 22 SNPs (Tabela 17). As frequências alélicas dos alelos menos comuns (MAF: *Minor allele frequency*) para os SNPs identificados nos animais extremos variaram entre 0,07 e 0,46.

Apenas um SNP encontrado na região codificadora foi uma mutação não-sinônima. O SNP 1186G>A é constituído por uma troca de uma Guanina por uma Adenina, causando a substituição do aminoácido Asparagina (aminoácido polar, grupo R carregado negativamente) por um aminoácido Serina (aminoácido polar, grupo R não carregado). Os demais 6 SNPs encontrados na região codificadora são mutações sinônimas, ou seja, não modificam o aminoácido. Além destes, foram encontrados 2 SNPs na região 5'UTR, 12 SNPs na região 3'UTR e 2 SNPs na região intergênica.

Tabela 17. Descrição dos SNPs identificados no gene *KCNJ11* em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h *post-mortem*, P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comuns (MAF)

SNP	NCBI_ss#	†Localização	‡Região gênica	Sequências flanqueadoras	P valores	§MAF
189G>A	537718959	189pb	5'UTR	GGTGGC(G/A)AACAGG	0,269	0,11
241T>C	537718961	241pb	5'UTR	CTGAGG(T/C)GTGAGG	0,049*	0,46
1059C>A	537718963	1059pb	CDs	GACCTC(C/A)GGAAGA	0,403	0,07
1186G>A	537718965	1186pb	CDs	GCAATA(G/A)CATCTT	0,272	0,4
1220C>T	537718967	1220pb	CDs	CTACCA(C/T)GTCATT	0,545	0,41
1241G>A	537718969	1241pb	CDS	CAGCCC(G/A)CTCTAT	0,227	0,22
1424T>C	537718971	1424pb	CDs	CTACTC(C/T)GTGGAC	0,254	0,13
1526C>T	537718973	1526pb	CDs	GACCCT(T/C)GTCCGC	0,254	0,13
1629C>T	537718975	1629pb	3'UTR	TGGGCT(C/T)CCTTCT	0,195	0,34
1693C>T	537718977	1693pb	3'UTR	GCCCCT(C/T)GGCCAG	0,195	0,15
1869C>T	537718979	1869pb	3'UTR	TCGTCC(C/T)GCTCCC	0,176	0,46
1893A>G	537718981	1893pb	3'UTR	TGACAG(A/G)GCTGTG	0,021*	0,42
1933C>T	537718983	1933pb	3'UTR	TCCATC(T/C)GATCTTG	0,269	0,11
1934G>A	537718985	1934pb	3'UTR	CCATCT(G/A)ATCTTG	0,265	0,12
1938C>T	537718987	1938pb	3'UTR	CTGATC(T/C)TGGGCC	0,269	0,11
2009C>T	537718989	2009pb	3'UTR	GAGGCC(C/T)GCTGCC	0,326	0,3
2291A>G	537718991	2291pb	3'UTR	TTAATG(A/G)GGGCTC	0,333	0,4
2307A>G	537718993	2307pb	3'UTR	GGCCCA(G/A)GGCTGC	0,833	0,1
2342T>C	537718995	2342pb	3'UTR	GTCCCC(C/T)ACCCTG	0,018*	0,39
2621G>A	537718997	2621pb	3'UTR	TTTGTC(G/A)TCAATA	0,004**	0,42
2952C>T	537718999	2952pb	Região intergênica	ATCACA(C/T)GTCCAG	0,049*	0,46
3037G>A	537719001	3037pb	Região intergênica	TCTAAC(G/A)TAACCT	0,06	0,36

†Baseado no banco de dados NCBI; ‡baseado na sequência depositada no banco público NCBI; §MAF: *Minor allele frequency* dos SNPs nos animais extremos fenotípicos; * indica $P \leq 0.05$; ** indica $P \leq 0.01$.

O padrão de desequilíbrio entre os 22 SNPs identificados no gene *KCNJ11* mostrou que o SNP 1526C>T é um dos principais TagSNP representante em uma região com alto desequilíbrio de ligação. Através do TagSNP 1526C>T é possível inferir a variação genética dos SNPs 189G>A, 1424T >C, 1933C>T, 1934G>A e 1938C>T.

De modo a avaliar a influência do gene *KCNJ11* na maciez da carne, como uma primeira abordagem as frequências genotípicas dos SNPs identificados foram comparadas entre os grupos de animais com fenótipos extremos para FC0. Como

mostrado na Tabela 17, o SNP 2342T>C apresentou uma associação significativa ($P \leq 0,05$) com FC0. Nessa comparação, observou-se uma prevalência do alelo T nos animais agrupados no grupo de menores resíduos para FC0. Com base nos critérios acima, os SNPs 1526C>T e 2342T>C foram escolhidos para a avaliação em toda a população.

O SNP e 2342T>C, escolhido por apresentar uma associação prévia nos animais sequenciados extremos para FC0, também apresentou frequência alélica e genotípica desejável para estudos de associação, pois está segregando para os dois alelos, apresentando MAF de 0,39 (Tabela 17).

Para o gene *MYOD1*, foram prospectados 10 SNPs (Tabela 18). O SNP481Ins>Del, localizado no éxon 1, é constituído de uma inserção/deleção de uma base adenina e modifica a matriz de leitura. Mutações do tipo inserção/deleção têm potencial de ter grandes efeitos no fenótipo, pois modificam a matriz de leitura dos aminoácidos, no entanto a frequência da mutação observada foi muito baixa (MAF=0,077), motivo pelo qual descartamos a possibilidade de realizar um estudo de associação com esse SNP em toda população. Os SNPs 754C>T, 1079T>G e 1177G>A, também estão localizados no éxon 1 e as substituições nucleotídicas causam modificação dos aminoácidos codificados; de Arginina para Cisteína, de Isoleucina para Serina e de Glicina para Serina, respectivamente, no entanto as frequências observadas também não foram desejáveis para estudos de associações. Os SNPs 1327T>C e 1527C>A estão localizados no íntron 1 e os SNPs 2365G>C, 2391G>A, 2339A>C e 2665C>G estão localizados no éxon 3. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os SNPs prospectados no gene *MyoDI* e FC avaliando os animais extremos para maciez de carne FC ($P \leq 0,05$) considerando os resultados do teste exato de Fisher (Tabela 18).

Em geral os valores de MAF observados foram baixos, sendo o máximo valor encontrado de 0,19. A baixa frequência observada para os polimorfismos pode ser devida ao papel funcional essencial exercido pelo gene *MyoDI* como ativador de transcrição de genes relacionados ao desenvolvimento muscular e, portanto, esse deve ser um gene bastante conservado devido às pressões seletivas. A validação em populações de bovinos de corte deve contribuir para estimar as reais frequências alélicas e o efeito desses marcadores na maciez da carne.

Tabela 18. Descrição dos SNPs identificados no gene *MyoD1* em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h *post-mortem*, P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comuns (MAF)

Gene MyoD1					
SNP	†Localização	‡Região gênica	Sequências flanqueadoras	P valores	§MAFs
481Ins>Del	481bp	Éxon1	CTGGTT(I/D)ATACAT	0,5000	0,077
754C>T	754bp	Éxon1	GATCCG(C/T)GCCTCG	0,2692	0,077
1079T>G	1079bp	Éxon1	GCTATA(T/G)CGAAGG	0,2692	0,038
1177G>A	1177bp	Éxon1	CGCAGC(G/A)GCGAAC	0,4615	0,038
1327T>C	1327bp	Íntron1	GCCCTC(T/C)GGTTGG	0,4406	0,115
1527C>A	1527bp	Íntron1	TGTTGC(C/A)GAAATG	0,3182	0,083
		Éxon3			
2365G>C	2365bp	5'UTR	ATCGGG(G/C)GGCGCC	0,2692	0,115
		Éxon3			
2391G>A	2391bp	5'UTR	CCGAGG(G/A)ATGGCG	0,1958	0,154
		Éxon3			
2339A>C	2539bp	5'UTR	AAGGAC(A/C)TGGTCC	0,4079	0,192
		Éxon3			
2665C>G	2665bp	5'UTR	CCCCTC(C/G)CCCATG	0,4167	0,042

†Baseado no banco de dados NCBI; ‡baseado na sequência depositada no banco público NCBI; §MAF: *Minor allele frequency* dos SNPs nos animais extremos fenotípicos.

Para escolher um SNP candidato para avaliação na população consideramos a estratégia de árvores de haplótipos. Árvores de haplótipos são utilizadas para estimar a história evolutiva da variação genética. Este tipo de estudo pode também ser utilizado para testar hipóteses sobre o significado evolutivo da variação genética e para identificar mutações que estão associadas a fenótipos. Iniciamos um estudo de árvore de haplótipos para o gene *MyoD1* (Figura 12).

Esta análise detectou dez haplótipos diferentes e inferiu três adicionais. Os haplótipos detectados foram: i)-CTGTCGGAC; ii)-TTGTCGGAC; iii)-ACTGTCGGAC; iv)-CTGTCGAAC; v)-CTGTCGGCC; vi)-CTGTCCGCC; vii)-CGATCCGAC; viii)-CTGCAGGCC; ix)-TTGCAGGCC e x)-CTGGCCGGCG. Os três haplótipos inferidos foram: xi)-CTATCGGAC, que deveria ter surgido a partir do haplótipo i; xii)-CGATCGGAC, que provavelmente seria originado do haplótipo xi e xiii)-CTGTAGAAC, que seria derivado do haplótipo v. Os haplótipos inferidos podem não ter sido detectados devido ao tamanho reduzido da amostra analisada. Ou podem ter sido eliminados da população.

O haplótipo identificado como ancestral foi o CTGTCGGAC (i); esta sequência mostrou os nucleotídeos consensos de todas as variações identificadas. O haplótipo ancestral foi observado em um animal classificado no extremo de menor resíduo para FC0. Embora o haplótipo ancestral devesse ser o genótipo mais frequente, isso não foi observado, provavelmente por causa do viés da amostragem de animais extremos utilizada, ou até mesmo devido aos impactos da seleção. O haplótipo iv foi encontrado em quatro animais, três dos quais eram da classe do mesmo fenótipo extremo.

Considerando a prevalência do haplótipo iv nos animais com maiores resíduos para a força de cisalhamento e que esse surgiu a partir do haplótipo i, encontrado em um animal do outro extremo fenotípico, consideramos que a variação que diferenciava o haplótipo i do iv deveria ser importante para a determinação do fenótipo de interesse. O haplótipo iv apresenta somente um SNP (2391G>A) contendo o nucleotídeo mutante, sendo assim, este foi o SNP escolhido para a avaliação na população.

No entanto não conseguimos estimar os efeitos deste SNP na população completa, devido a problemas que encontramos com ensaios Taqman. A futura avaliação deste SNP na população completa deve esclarecer o real efeito desse SNP na maciez da raça Nelore.

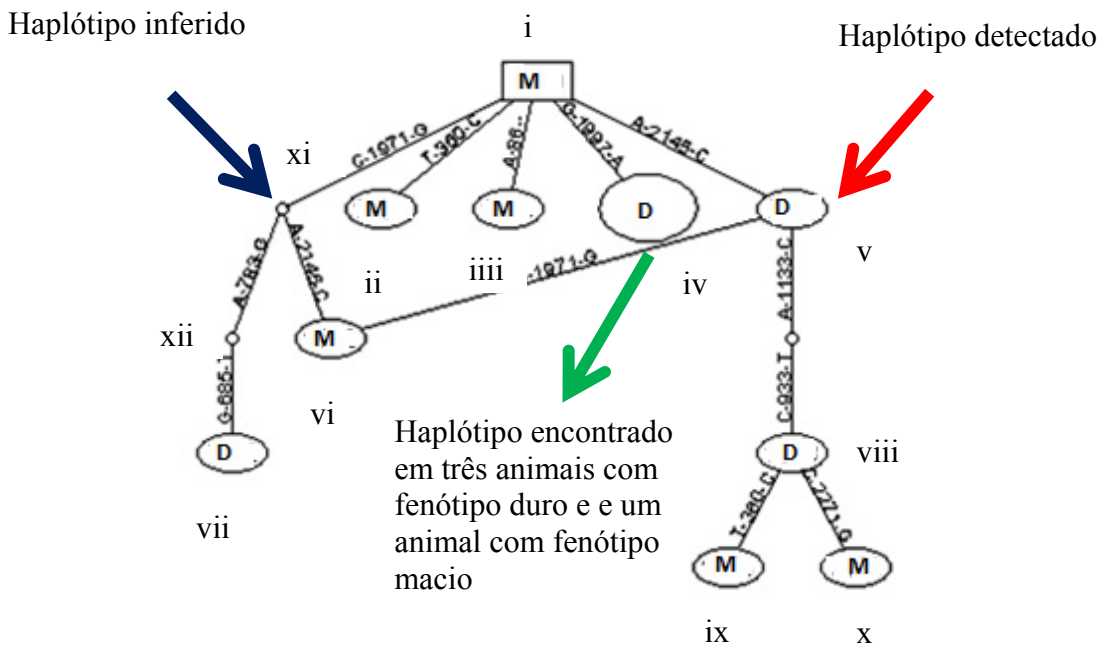


Figura 12. Árvore de haplótipo das variações detectadas pelo sequenciamento do gene *MYOD1*.
 Fonte: autoria própria

Apenas um SNP foi encontrado na sequência codificadora do gene *CALCA* (SNP 1905C>G), o qual a alteração de uma Citosina por uma Guanina causa a modificação do aminoácido Valina para Leucina (Tabela 19). O SNP872C>G, apesar de estar localizado no éxon 1, não constitui uma sequência codificadora, pois está localizado na região 5'UTR.

A maioria dos polimorfismos são substituição de bases (transversões ou transições), no entanto, o polimorfismo 3285Del>CTAC é constituído de uma deleção\inserção de quatro bases, uma vez que esse polimorfismo foi identificado posteriormente aos demais, aproveitando-se de projetos paralelos com sequenciamento de próxima geração, temos o genótipo desse SNP disponíveis para 96 animais (escolhidos aleatoriamente da população), assim como para os SNPs 3071T>C e 3757A>G, e por isso ao invés de realizarmos um teste exato de Fisher para visualizar a possível associação dos mesmos, fizemos um estudo de associação utilizando o método da máxima verossimilhança restrita (REML) implementado no programa SAS, que será apresentado posteriormente na seção em que discutiremos os resultados de associação dos SNPs escolhidos para a avaliação na população.

Assim como descrito para o SNP2342T>C do gene *KCNJ11*, o SNP1360C>T localizado no íntron 1 do gene *CALCA* foi escolhido para avaliação na população completa, uma vez que suas frequências genotípicas foram comparadas entre os grupos de animais com fenótipos extremos para FC0 e uma associação sugestiva ($P \leq 0,010$) foi observada para FC0. Nessa comparação, observou-se prevalência do alelo T nos animais agrupados no grupo de maiores resíduos para FC0.

Tabela 19. Descrição dos SNPs identificados no gene *CALCA* em novilhos Nelore extremos fenotípicos (n=14) para força de cisalhamento medida após 24 h post-mortem, P valores para o teste de Fisher e frequências alélicas dos alelos menos comum (MAF)

Gene <i>CALCA</i>					
‡Região					
SNP	†Localização	gênica	Sequências flanqueadoras	P valores	§MAFs
872C>G	872pb	Éxon1 5'UTR	CAATCG(C/G)CTACCG	0,1958	0,385
978A>G	978pb	Íntron 1	CCCTCC(C/T)CCTCCC	0,1748	0,346
1090T>G	1090pb	Íntron 1	CCAAGG(C/A)TTCCTC	0,1958	0,154
1334C>G	1334pb	Íntron 1	CGCCGT(G/C)GGTTCA	0,1748	0,308
1360C>T	1360pb	Íntron 1	CCAAAG(C/T)GGGTGG	0,0699	0,154
1523T>C	1523pb	Íntron 1	GCTGAC(C/T)GGTAGA	0,2040	0,308
1905C>G	1905pb	Éxon 2 (CDs)	CTGGCC(G/C)TGTACC	0,4406	0,115
2120T>G	2120pb	Íntron 2	TGTAGC(A/C)CACAGT	0,5385	0,038
2575G>A	2575pb	Íntron 2	ACAGTT(G/A)GAGCAG	0,5385	0,077
3071T>C	3071pb	Íntron 3	CTGGAAA(T/C)TGTCTG	0,02500	-
3285Del> CTAC	3285pb	Íntron 3	CCTAC(Del/CTAC)TGAGGA	0,2344	-
3757A>G	3757pb	Íntron 3	AAACCT(A/G)GTTCTC	0,28645	-
4140T>C	4140pb	Íntron 3	ATGGAC(T/C)ATAGCC	0,4406	0,115
5095T>A	5095pb	Íntron 3	GGAATT(T/A)TTCCAA	0,3263	0,192
5732G>A	5732pb	Íntron 4	TTGCTG(A/G)CCCCAG	0,2165	0,269
5763T>C	5763pb	Íntron 4	AGAGTC(T/C)GAATAT	0,4406	0,115
6590C>T	6590pb	Íntron 4	GTTTGC(T/C)TTACTA	0,3263	0,192
6035G>A	6035pb	Íntron 4	AGCCTC(A/G)GTTTCC	0,5455	0,167

†Baseado no banco de dados NCBI; ‡baseado na sequência depositada no banco público NCBI; § frequências alélicas dos alelos menos comum (MAF) dos SNPs nos animais extremos fenotípicos.

3.4.4. Descrição dos SNPs presentes na plataforma Illumina BovineHD BeadChip localizados no gene *ASAPI* e construção de haplótipos

Não houve a necessidade de sequenciar o gene *ASAPI*, pois há 169 SNPs nesse gene representados na plataforma *Illumina BovineHD BeadChip* (Tabela 20).

Tabela 20. Descrição dos SNPs localizados no gene *ASAPI* presentes no *Illumina BovineHD BeadChip*.

Gene <i>ASAPI</i>			
Nome do SNP	Localização em pb no cromossomo 14	Região do gene	Variação
Hapmap23192-BTC-059018	11328725	Íntron 1	G/T
BovineHD1400003189	11330635	Íntron 1	C/T
BovineHD1400003190	11333062	Íntron 1	G/A
BovineHD1400003191	11336233	Íntron 1	AG
BovineHD1400003192	11337518	Íntron 1	T/G
BovineHD1400003195	11343701	Íntron 1	A/G
BovineHD1400003196	11344156	Íntron 1	T/C
BovineHD1400003197	11346513	Íntron 1	T/G
BovineHD1400003198	11347848	Íntron 1	T/C
BovineHD1400003199	11348315	Íntron 1	C/T
BovineHD1400003200	11348966	Íntron 1	A/G
BovineHD1400003201	11350860	Íntron 1	C/T
BovineHD1400003202	11351935	Íntron 1	T/C
BovineHD1400003208	11373591	Íntron 2	T/C
BovineHD1400003209	11377415	Íntron 2	T/C
BovineHD1400003210	11382929	Íntron 2	C/T
BovineHD1400003211	11386690	Íntron 2	T/C
BovineHD1400003213	11390881	Íntron 2	T/C
BovineHD1400003214	11393266	Íntron 2	A/G
BovineHD1400003215	11394613	Íntron 2	A/G
BovineHD1400003216	11396305	Íntron 2	A/G
BovineHD1400003217	11399483	Íntron 2	C/A
BovineHD1400003227	11436131	Íntron 3	T/C
BovineHD1400003228	11438240	Íntron 3	A/G
UA-IFASA-8705	11440482	Íntron 3	G/A
BovineHD4100011103	11442537	Íntron 3	C/T
BovineHD1400003229	11445567	Íntron 3	G/T
BovineHD1400003230	11449356	Íntron 3	T/C
BovineHD1400003231	11450719	Íntron 3	T/C
BovineHD1400003232	11451934	Íntron 3	C/T
BovineHD1400003233	11462776	Íntron 3	A/G
ARS-BFGL-NGS-31174	11466299	Íntron 3	G/A
BovineHD1400003234	11467046	Íntron 3	A/C
BovineHD1400003235	11470115	Íntron 3	A/G
BovineHD1400003236	11471897	Íntron 3	T/C
BovineHD1400003237	11474322	Íntron 3	G/A
BovineHD1400003238	11478992	Íntron 3	G/T
BovineHD1400003239	11481748	Íntron 3	A/G
BovineHD1400003240	11484407	Íntron 3	T/C
BovineHD1400003242	11488405	Íntron 3	A/C
Hapmap30100-BTC-009671	11490338	Íntron 3	T/C

BovineHD1400003243	11491687	Intron 3	C/T
BovineHD1400003244	11492302	Intron 3	C/T
BovineHD1400003245	11493180	Intron 3	C/T
BovineHD1400003246	11494742	Intron 3	T/G
BovineHD1400003247	11495941	Intron 3	A/G
BovineHD1400003248	11496412	Intron 3	T/G
BovineHD1400003249	11497353	Intron 3	C/T
BovineHD1400003250	11497917	Intron 3	G/T
BovineHD1400003251	11499151	Intron 3	T/C
BovineHD1400003252	11500084	Intron 3	A/G
BovineHD1400003254	11501300	Intron 3	G/T
BovineHD1400003255	11502833	Intron 3	A/G
BovineHD1400003256	11504668	Intron 3	A/G
BovineHD1400003258	11509096	Intron 3	C/T
BovineHD1400003259	11511818	Intron 3	T/C
BovineHD1400003261	11513249	Intron 3	T/C
BovineHD1400003262	11513900	Intron 3	A/G
BovineHD1400003263	11514842	Intron 3	A/G
BovineHD1400003264	11516663	Intron 3	G/A
BovineHD1400003265	11517309	Intron 3	G/A
Hapmap26533-BTC-009833	11519315	Intron 3	C/T
BovineHD1400003268	11522041	Intron 3	G/A
BovineHD1400003270	11524915	Intron 3	G/A
BovineHD1400003272	11528469	Intron 3	C/T
BovineHD1400003273	11531625	Intron 3	C/A
BovineHD1400003274	11533941	Intron 3	G/T
BovineHD1400003276	11539298	Intron 3	C/T
BovineHD1400003277	11541742	Intron 3	A/G
BovineHD1400003278	11543390	Intron 3	A/G
BovineHD1400003279	11544329	Intron 3	G/T
BovineHD1400003280	11545009	Intron 3	A/G
BovineHD4100011109	11546869	Intron 3	C/T
BovineHD1400003281	11550527	Intron 3	A/G
BovineHD1400003283	11551915	Intron 3	T/C
BovineHD1400003284	11552371	Intron 3	A/G
BovineHD4100011111	11553037	Intron 3	C/T
BovineHD1400003286	11557193	Intron 3	G/A
BovineHD1400003287	11559606	Intron 4	T/G
BovineHD1400003288	11561304	Intron 4	A/G
BovineHD1400003289	11562483	Intron 4	A/G
BovineHD1400003290	11564502	Intron 4	A/G
BovineHD1400003291	11566397	Intron 4	C/T
BovineHD1400003292	11570227	Intron 4	A/C
BovineHD1400003293	11571946	Intron 4	T/C
BovineHD4100011112	11577340	Intron 4	G/A
BovineHD1400003294	11578060	Intron 4	A/C
BovineHD1400003295	11582178	Intron 4	G/A
BovineHD1400003296	11582743	Intron 4	G/A
BovineHD1400003297	11585266	Intron 4	G/A
BovineHD1400003298	11586103	Intron 4	A/C
BovineHD1400003299	11586726	Intron 4	T/C
BovineHD1400003302	11589888	Intron 5	C/T
BovineHD1400003303	11590565	Intron 5	G/A
BovineHD1400003304	11591475	Intron 5	A/G

BovineHD4100011113	11594294	Íntron 5	G/A
BovineHD1400003305	11595209	Íntron 5	C/T
BovineHD1400003306	11595996	Íntron 5	T/G
BovineHD1400003307	11596677	Íntron 5	T/C
BovineHD4100011114	11597343	Íntron 5	G/T
BovineHD1400003308	11597855	Íntron 5	C/T
BovineHD1400003309	11598852	Íntron 5	A/G
BovineHD1400003310	11599700	Íntron 5	A/G
Hapmap31248-BTC-010204	11600913	Íntron 5	C/T
BovineHD1400003311	11601767	Íntron 5	G/A
BovineHD1400003312	11605798	Íntron 5	A/G
BovineHD4100011115	11609451	Íntron 5	A/G
BovineHD1400003313	11610828	Íntron 5	G/A
BovineHD1400003314	11611567	Íntron 5	T/G
BovineHD1400003316	11613371	Íntron 5	G/T
BovineHD1400003317	11614018	Íntron 6	A/G
BovineHD1400003318	11614713	intron 7	G/T
BovineHD1400003319	11616599	Íntron 7	C/T
BovineHD1400003320	11617348	Íntron 7	C/A
BovineHD1400003321	11618187	Íntron 7	A/G
BovineHD1400003322	11619209	Íntron 7	G/A
BovineHD1400003323	11620061	Íntron 8	G/T
BovineHD1400003324	11620626	Íntron 8	T/G
ARS-BFGL-NGS-117252	11621252	Íntron 9	G/A
BovineHD1400003325	11622547	Íntron 9	G/A
BovineHD1400003326	11625028	Íntron 9	G/A
BovineHD1400003327	11626123	Íntron 9	G/A
BovineHD1400003328	11627090	Íntron 9	C/T
BovineHD1400003329	11627930	Íntron 9	T/G
BovineHD1400003330	11628798	Íntron 10	G/A
BovineHD1400003331	11630224	Éxon 11	A/G
BovineHD1400003332	11631027	Íntron 11	A/G
BovineHD1400003334	11632386	Íntron 11	G/A
BovineHD1400003338	11635184	Íntron 11	G/A
BovineHD1400003339	11636223	Íntron 12	G/A
BovineHD1400003340	11636972	Íntron 13	C/T
BovineHD1400003341	11637696	Íntron 13	T/C
BovineHD1400003342	11638540	Íntron 14	G/T
BovineHD1400003343	11639430	Íntron 14	C/T
BovineHD1400003344	11641253	Íntron 14	A/G
BovineHD1400003346	11645874	Íntron 14	C/T
BovineHD1400003347	11646415	Íntron 14	A/G
BovineHD1400003348	11647058	Éxon 15	C/T
BovineHD1400003349	11647690	Íntron 15	G/A
BovineHD1400003350	11648573	Íntron 15	A/G
BovineHD1400003351	11649212	Íntron 16	G/A
BovineHD1400003352	11649914	Íntron 16	C/T
BovineHD1400003353	11650987	Íntron 16	A/G
BovineHD1400003354	11652246	Íntron 16	G/A
BovineHD4100011116	11654080	Éxon 18	T/C
BovineHD1400003355	11655787	Íntron 18	A/C
BovineHD1400003356	11656320	Íntron 19	C/T
BovineHD1400003357	11657641	Íntron 19	C/A
BovineHD1400003358	11658271	Íntron 19	C/A

BovineHD1400003360	11663324	Íntron 24	G/A
BovineHD1400003361	11663996	Íntron 24	C/A
BovineHD1400003362	11664889	Íntron 25	T/C
BovineHD1400003363	11665441	Íntron 25	T/C
BovineHD1400003364	11666184	Íntron 25	A/G
BovineHD1400003365	11667122	Íntron 25	T/C
BovineHD1400003367	11670540	Íntron 25	T/C
BovineHD1400003368	11671555	Íntron 25	A/C
BovineHD1400003369	11675208	Íntron 26	G/A
BovineHD1400003370	11677249	Íntron 26	C/T
BovineHD1400003371	11677911	Íntron 26	C/T
BovineHD1400003373	11679810	Íntron 26	A/G
BovineHD1400003374	11680611	Íntron 26	G/A
ARS-BFGL-NGS-79338	11683342	Íntron 27	C/A
BovineHD1400003376	11685074	Íntron 28	A/G
BovineHD1400003377	11689386	Íntron 28	T/C
BovineHD1400003378	11690552	Íntron 29	C/T
BovineHD1400003379	11691037	Íntron 29	A/G
BovineHD1400003381	11693377	Íntron 30	T/G
BovineHD4100011117	11694193	Íntron 30	G/A

Pb: pares de bases

Nenhum dos três SNPs localizados em éxons modifica aminoácidos, portanto são mutações sinônimas. Desses 169 SNPs, 48 não formaram blocos de desequilíbrio de ligação com nenhum dos outros SNPs do chip e portanto não foram incluídos nas análises de associação. Com a inferência de fase de ligação e construção de blocos, foram construídos 21 haplótipos, utilizados posteriormente para realizar o estudo de associação com maciez da carne (Tabela 21).

Tabela 21. SNPs incluídos em cada um dos haplótipos formados com os SNPs no gene *ASAPI* representados na plataforma *Illumina BovineHD BeadChip*.

Gene <i>ASAPI</i>	
Haplótipos	Marcadores
1	BovineHD1400003192; BovineHD1400003195 and BovineHD1400003196
2	BovineHD1400003198 and BovineHD1400003199
3	BovineHD1400003200; BovineHD1400003201 and BovineHD1400003202
4	BovineHD1400003211 and BovineHD1400003213
5	BovineHD1400003227; BovineHD1400003228 and UA-IFASA-8705
6	BovineHD1400003229; BovineHD1400003230 and BovineHD1400003232
7	BovineHD1400003236 and BovineHD1400003238
8	BovineHD1400003245; BovineHD1400003246; BovineHD1400003247; BovineHD1400003248; BovineHD1400003249; BovineHD1400003250; BovineHD1400003251; BovineHD1400003252; BovineHD1400003254; BovineHD1400003255; BovineHD1400003256; BovineHD1400003258; BovineHD1400003259; BovineHD1400003261; BovineHD1400003262; BovineHD1400003263; BovineHD1400003264; BovineHD1400003265 and Hapmap26533-BTC-009833
9	BovineHD1400003270 and BovineHD1400003273
10	BovineHD1400003276; BovineHD1400003277; BovineHD1400003278 and BovineHD1400003279
11	BovineHD1400003280; BovineHD4100011109; BovineHD1400003281; BovineHD1400003283; BovineHD1400003284; BovineHD4100011111; BovineHD1400003286 and BovineHD1400003287
12	BovineHD1400003289; BovineHD1400003290; BovineHD1400003291; BovineHD1400003292; BovineHD1400003293; BovineHD4100011112; BovineHD1400003294; BovineHD1400003295; BovineHD1400003296; BovineHD1400003297; BovineHD1400003298; BovineHD1400003299; BovineHD1400003302; BovineHD1400003303; BovineHD1400003304; BovineHD4100011113 and BovineHD1400003305
13	BovineHD1400003307; BovineHD4100011114; BovineHD1400003308; BovineHD1400003309; BovineHD1400003310 and Hapmap31248-BTC-010204
14	BovineHD4100011115; BovineHD1400003313 and BovineHD1400003314
15	BovineHD1400003318; BovineHD1400003319; BovineHD1400003320; BovineHD1400003321; BovineHD1400003322; BovineHD1400003323; BovineHD1400003324 and ARS-BFGL-NGS-117252
16	BovineHD1400003327; BovineHD1400003328; BovineHD1400003329; BovineHD1400003330; BovineHD1400003331; BovineHD1400003334; BovineHD1400003338; BovineHD1400003341 and BovineHD1400003342
17	BovineHD1400003344; BovineHD1400003346 and BovineHD1400003347
18	BovineHD1400003350; BovineHD1400003351; BovineHD1400003352; BovineHD1400003353; BovineHD1400003354 and BovineHD4100011116
19	BovineHD1400003357; BovineHD1400003358; BovineHD1400003360; BovineHD1400003361; BovineHD1400003362; BovineHD1400003363 and BovineHD1400003364
20	BovineHD1400003368; BovineHD1400003369; BovineHD1400003370; BovineHD1400003371 and BovineHD1400003373
21	ARS-BFGL-NGS-79338; BovineHD1400003376; BovineHD1400003377; BovineHD1400003378; BovineHD1400003379 and BovineHD1400003381

3.4.5. *Estudo dos efeitos das associações entre os marcadores e as medidas de força de cisalhamento em nível populacional.*

A maioria dos genes que afetam características poligênicas, como a maciez da carne são desconhecidos. Pesquisas genéticas em bovinos têm procurado uma melhor compreensão da função da variação genética de características-alvo (GODDARD; HAYES, 2009). Genes candidatos posicionais e funcionais relacionadas com características economicamente importantes têm sido identificados, mas os genes reportados até agora explicam uma pequena porção da variação genética da característica. Além disso, a maioria das descrições de genes candidatos e de marcadores moleculares têm sido realizadas em bovinos *Bos taurus*. Diferenças entre gados taurinos e zebuínos para frequências alélicas em mutações causais ou na extensão do desequilíbrio de ligação (DL) podem resultar em efeitos diferentes sendo detectados nas diferentes raças. Diante disso, a identificação de genes candidatos e marcadores moleculares em uma amostra de uma população de referência da raça Nelore beneficiaria programas de melhoramento genético da raça.

A frequência do alelo menos comum observada para os dois SNPs escolhidos do gene *KCNJ11* na população (Tabela 22) foi maior do que nas amostras de animais extremos (Tabela 17).

Tabela 22. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs 1526C>T e 2342T>C do gene *KCNJ11* em animais Nelore, incluindo animais que não possuem fenótipos.

SNP <i>KCNJ11</i>	N	Frequência (%)				
		Genotípica			Alélica	
		CC	CT	TT	C	T
1526C>T	614	71,17	26,38	2,45	84,36	15,64
2342T>C	660	39,52	34,24	26,67	56,21	43,79

N: Número de observações

O SNP 2342T>C está em equilíbrio de Hardy- Weinberg e apresentou um efeito aditivo sobre FC0 e FC7 ($P \leq 0,05$; Tabela 23) . Os efeitos de substituição de alelo estimados para o SNP 2342T>C foram de 0,39 e 0,38 Kg para FC0 e FC7, respectivamente. Este polimorfismo representou 7,46 e 7,06% da variância genética aditiva e 8,87 e 7,94% da variância genética total de FC0 e FC7, respectivamente, e os desvios de dominância não foram significativos (Tabela 23).

Tabela 23. Resumo dos resultados da análise de associação entre as medidas de força de cisalhamento e dois polimorfismos no gene *KCNJ11* em animais da raça Nelore.

FC	N	SNP1526 C>T				SNP2342T>C			
		Gen,	Médias ±EP (Kg)	Add,	Dom,	Gen,	Médias ±EP (Kg)	Ad,	Dom,
0	461			ns	ns			0,3885	ns
		CC	8,86±0,15			CC	9,14±0,14		
		CT	8,72±0,14			CT	8,70±0,14		
7	423	TT	9,40±0,51			TT	8,75±0,16		
		CC	5,38±0,13	ns	ns	CC	5,50±0,13	0,3778	ns
		CT	5,46±0,13			CT	5,51±0,13		
14	434	TT	5,69±0,50			TT	5,12±0,15		
		CC	4,33±0,11	ns	ns	CC	4,35±0,11	ns	ns
		CT	4,49±0,11			CT	4,54±0,11		
		TT	4,57±0,43			TT	4,26±0,13		

FC: força de cisalhamento (medida em 24 horas após o abate = 0; medida após 7 dias de maturação = 7; medida após 14 dias de maturação da carne = 14) n: número de observações; Gen.: Genótipo; Médias ± EP : quadrados mínimos ajustados pelo modelo ± erro padrão; Ad.: Efeito aditivo (Kg); Dom.: Efeito de desvios de dominância; ns: não significativo ($P \leq 0,05$).

A partir desses resultados, pode-se sugerir que a seleção em favor do alelo T do presente SNP levaria a uma diminuição do valor médio da FC0 e FC7 desta população Nelore, melhorando assim a maciez. No entanto, não é possível indicar se o SNP 2342T>C é uma mutação causal a partir dos dados apresentados nesse estudo. No caso do SNP 2342T>C estar em desequilíbrio de ligação com a mutação causal, a recombinação pode romper a associação entre o alelo funcional e os marcadores do gene *KCNJ11*. Outra implicação disso, seria a necessidade da avaliação da fase de ligação deste marcador antes deste poder ser utilizado em outras raças bovinas.

O efeito dos haplótipos compostos pelos dois SNPs 1526C>T e 2342T>C não foi significativo ($P \leq 0,05$) para qualquer medida de FC. Estudos anteriores (resultados não publicados) realizados por nosso grupo de pesquisa com uma amostra dessa população Nelore (n = 184) não encontraram efeitos significativos de polimorfismos nos genes μ Calpain (SNP c.3379G > A : rs17872099) e calpastatina (SNP c.2959A>G: AF159246) sobre as medidas de FC. Os efeitos do gene *KCNJ11* SNP 2342T>C, nas

medidas de FC0 e FC7 permaneceram significativos ($P \leq 0,05$), mesmo quando os SNPs nos genes μ Calpain e calpastatina foram incluídos como efeitos fixos no modelo (dados não apresentados).

O gene *KCNJ11* codifica uma proteína de membrana que controla o fluxo de potássio para dentro da célula. O potássio é necessário para a contração muscular e impulsos nervosos e, junto com o sódio, ajuda a manter o equilíbrio de fluidos celulares (KNOCHEL *et al.*, 1972). Um estudo mostrou que a inativação do gene *KCNJ11* em ratos provoca menor peso corporal, maior gasto energético e fraqueza muscular (ALEKSEEV *et al.*, 2010). Fraqueza muscular associada a mutações do gene *KCNJ11* foi observada em seres humanos, em que as mutações no gene *KCNJ11* estão também associadas ao atraso do desenvolvimento e epilepsia, além de diabetes neonatal (GLOYN *et al.*, 2004). Estudos em músculo esquelético demonstraram o papel dos canais KATP nas performances fisiológicas de diferentes tipos de fibras musculares. Composição molecular e propriedades das subunidades de canais KATP músculo-específicas podem determinar as diferenças entre os tipos musculares na regulação da concentração de potássio extracelular através da vasodilatação, modulação da captação de glicose e respostas às drogas (TRICARICO *et al.*, 2006). O efeito do gene *KCNJ11* observado na maciez da carne no presente estudo é potencialmente devido a mudanças na atividade dos canais KATP. Embora o papel deste gene na contração muscular deve ser a base do efeito sobre a maciez da carne, este estudo é o primeiro a investigar essa relação e mais estudos são necessários para melhor elucidar esse mecanismo.

Uma vez que o gene *KCNJ11* está mapeado no BTA15, perto de um QTL para a maciez de carne (REXROAD *et al.*, 2001), e com base em suas vias metabólicas e função no músculo previamente relatada (ALEKSEEV *et al.*, 2010; BERNARD *et al.*, 2009; GLOYN *et al.*, 2004), nós sugerimos o gene *KCNJ11* como um possível candidato para influenciar as características de carcaça de bovinos, o que o presente estudo confirmou (Tabela 23). Outros genes candidatos para maciez da carne estão presentes nesta região. Alguns exemplos são os genes *CALCA* e *MYOD1*, que serão abordados posteriormente.

As frequências genóticas do SNP1360C>T localizado no gene *CALCA* foram 3,46, 29,29 e 67,64 % para os genótipos AA, GA e GG, respectivamente. Apesar do gene *CALCA* ter sido indicado como um candidato localizado no QTL do BTA15 descrito para maciez de carne (REXROD *et al.*, 2001), não foi encontrada nenhuma associação significativa desse SNP com maciez de carne ($P \leq 0,05$). A frequência baixa

do genótipo AA e o tamanho da amostra utilizada, pode ter influenciado os resultados. Apesar do tamanho amostral reduzido utilizado para sequenciamento/genotipagem (n = 96), testamos a associação entre os polimorfismos 3071T>C, 3285Del>CTAC e 3757A>G e as medidas de FC, no entanto, novamente nenhum efeito significativo pode ser observado.

O gene *CALCA* codifica um hormônio que tem função relacionada com a regulação do cálcio e atua para regular o metabolismo de fósforo. Esse hormônio provoca uma queda rápida, mas de curta duração no nível de cálcio e fosfato no sangue, promovendo a incorporação destes íons nos ossos. Por sua função na regulação de níveis de cálcio, fator-chave no amaciamento *post-mortem*, esse gene já havia sido apontado por Rexroad *et al.* (2001) como um gene candidato mapeado dentro de um intervalo de um QTL descrito para maciez no cromossomo 15. Porém apesar da função intuitiva do gene *CALCA* no amaciamento da carne, não conseguimos demonstrar nenhuma associação significativa entre o gene *CALCA* e as medidas de maciez dessa população da raça Nelore.

Os SNPs localizados no gene *ASAPI* foram primeiramente codificados como homozigotos 11 (alelo de referência) e 22 (alelo mutante) e heterozigotos 12 para podermos executar esses dados nos programas FastPhase e Haploview e construir os haplótipos. As frequências genóticas dos haplótipos 8, 9 e 10 estão apresentadas na tabela 24. Os genótipos dos haplótipos que apresentaram frequência ≤ 4 foram excluídos das análises. Somente os haplótipos 8, 9 e 10 apresentaram efeito significativo na força de cisalhamento medida 24 horas após o abate dos animais (Tabelas 25, 26, 27 e 28). O haplótipo 8 também apresentou efeito significativo sobre a força de cisalhamento medida após 7 dias de maturação da carne.

Tabela 24. Frequência genotípica para os haplótipos do gene *ASAP1*.

Genótipos/ Haplótipo8	Nº do haplótipo	Frequência	Porcentagem
1221112212222222111 1221112212222222111	1	1	0.13
1221112212222222111 2221121121111111222	2	1	0.13
1222112212222222111 1221112212222222111	3	7	0.89
1222112212222222111 1221121121111121122	4	8	1.01
1222112212222222111 1222112212222222111	5	11	1.39
1222112212222222111 1222112212222222112	6	4	0.51
1222112212222222111 2111221121111111222	7	40	5.07
1222112212222222111 2221121121111111222	8	38	4.82
1222112212222222111 2221121121111121122	9	1	0.13
1222112212222222111 2221221121111121122	10	9	1.14
1222112212222222112 1221112212222222111	11	2	0.25
1222112212222222112 1221121121111121122	12	1	0.13
1222112212222222112 1222112212222222111	13	5	0.63
1222112212222222112 2111221121111111222	14	17	2.15
1222112212222222112 2221121121111111222	15	11	1.39
1222112212222222112 2221221121111121122	16	2	0.25
2111221121111111222 1221112212222222111	17	10	1.27
2111221121111111222 1222112212222222111	18	50	6.34
2111221121111111222 1222112212222222112	19	13	1.65
2111221121111111222 2111221121111111222	20	154	19.52
2111221121111111222 2221121121111111222	21	132	16.73
2111221121111111222 2221121121111121122	22	39	4.94
2111221121111111222 2221221121111121122	23	30	3.8
2111221121111111222 222122112111112122	24	1	0.13
2221121121111111222 1221112212222222111	25	6	0.76
2221121121111111222 1222112212222222111	26	13	1.65
2221121121111111222 1222112212222222112	27	2	0.25
2221121121111111222 2111221121111111222	28	51	6.46
2221121121111111222 2221121121111111222	29	45	5.7
2221121121111111222 2221121121111121122	30	17	2.15
2221121121111111222 2221221121111121122	31	7	0.89
2221121121111121122 2111221121111111222	32	6	0.76
2221121121111121122 2221121121111111222	33	8	1.01
2221121121111121122 2221121121111121122	34	3	0.38
2221121121111121122 2221221121111121122	35	1	0.13
2221221121111121122 1222112212222222111	36	8	1.01
2221221121111121122 1222112212222222112	37	1	0.13
2221221121111121122 2111221121111111222	38	21	2.66
2221221121111121122 2221121121111111222	39	8	1.01
2221221121111121122 2221121121111121122	40	4	0.51
2221221121111121122 2221221121111121122	41	1	0.13

Genótipos/ Haplótipo9	Nº do haplótipo	Frequência	Porcentagem
12 12	1	159	20.15
12 21	2	103	13.05
12 22	3	17	2.15
21 12	4	250	31.69
21 21	5	184	23.32
21 22	6	33	4.18
22 12	7	20	2.53
22 21	8	22	2.79
22 22	9	1	0.13
Genótipos/ Haplótipo10	Nº do haplótipo	Frequência	Porcentagem
1221 1221	1	5	0.63
1221 2111	2	9	1.14
1221 2112	3	29	3.68
1221 2121	4	1	0.13
1221 2221	5	23	2.92
2111 1221	6	1	0.13
2111 2111	7	9	1.14
2111 2112	8	17	2.15
2111 2221	9	17	2.15
2112 1221	10	40	5.07
2112 2111	11	78	9.89
2112 2112	12	240	30.42
2112 2121	13	1	0.13
2112 2221	14	151	19.14
2121 1221	15	2	0.25
2121 2111	16	4	0.51
2121 2112	17	14	1.77
2121 2221	18	7	0.89
2221 1221	19	9	1.14
2221 2111	20	27	3.42
2221 2112	21	60	7.6
2221 2221	22	45	5.7

Nº : Número de observações

Tabela 25. Estimativa dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 8 do gene *ASAPI* que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.

Característica	Nº Gen.	Média ±DP	Efeito do Genótipo	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
FC			0.0130*	0.069	0.246
	3	10.66±1.12			
	4	8.52±0.60			
	5	8.39±0.56			
	7	8.85±0.29			
	8	8.84±0.34			
	10	9.00±0.64			
	13	9.65±0.12			
	14	8.97±0.53			
	15	8.6±0.61			
	17	9.02±0.53			
	18	9.11±0.27			
	19	8.53±0.53			
	20	9.39±0.16			
	21	8.77±0.17			
	22	9.15±0.30			
	23	9.64±0.36			
	25	10.48±0.93			
	26	9.38±0.48			
	28	8.13±0.25			
	29	9.19±0.28			
	30	9.05±0.46			
	31	10.45±0.64			
	32	8.86±0.72			
	33	8.42±0.60			
	36	8.09±0.71			
	38	9.41±0.42			
	39	8.21±0.65			

N: Número de observações ; *P ≤ 0.05.

Tabela 26. Estimação dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 8 do gene *ASAPI* que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 7 dias após o abate.

Característica	Nº Gen.	Média ±DP	Efeito do Genótipo	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
FC7			0.0220*	0.913	0.8253
	3	5.19±1.10			
	4	5.44±0.59			
	5	5.32±0.55			
	7	5.97±0.29			
	8	4.95±0.34			
	10	6.13±0.69			
	13	5.17±1.10			
	14	4.98±0.52			
	15	3.91±0.70			
	17	4.94±0.52			
	18	5.84±0.26			
	19	5.03±0.51			
	20	5.94±0.16			
	21	5.76±0.17			
	22	5.65±0.30			
	23	5.78±0.37			
	25	6.36±0.91			
	26	5.83±0.52			
	28	5.25±0.25			
	29	5.85±0.28			
	30	5.90±0.45			
	31	7.88±0.63			
	32	6.46±0.71			
	33	5.35±0.59			
	36	4.82±0.69			
	38	5.35±0.42			
	39	5.02±0.63			

N: Número de observações ; *P≤ 0.05.

Tabela 27. Estimação dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 9 do gene *ASAPI* que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.

Característica	Gen.	Média ±DP	Efeito Genótipo	do	Efeito Ad.	Desvio de Dom
FC0			0.0073*		0.317	0.0094*
	1	9.05±0.16				
	2	8.52±0.18				
	3	9.51±0.44				
	4	8.92±0.12				
	5	9.29±0.15				
	6	9.59±0.33				
	7	8.44±0.42				
	8	9.42±0.43				

N: Número de observações ; *P≤ 0.01.

Tabela 28. Estimação dos efeitos aditivo e de dominância do haplótipo 9 do gene *ASAPI* que apresentou efeito significativo sobre as diferentes medidas de força de cisalhamento medida 24 horas após o abate.

Característica	Gen.	Média ±DP	Efeito do Genótipo	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
FC0			0.0285*	0.503	0.919
		8.06±0.94			
		8.48±0.60			
		8.73±0.35			
		9.02±0.39			
		9.35±0.60			
		8.78±0.44			
		8.31±0.45			
		8.95±0.30			
		9.24±0.21			
		9.37±0.13			
		8.73±0.15			
		9.39±0.46			
		10.31±1.11			
		9.76±0.60			
		9.18±0.36			
		8.45±0.23			

*P≤ 0.05.

O Efeito de substituição alélica para os haplótipos do gene *ASAPI*, não puderam ser estimados porque não encontramos efeito aditivo significativo (P≤ 0.05), apesar de um efeito aditivo de um SNP localizado nesse gene já ter sido descrito na raça Nelore (TIZIOTO *et al.*, 2012). Os resultados da análise de haplótipos reforçam as indicações

obtidas anteriormente (TIZIOTO *et al.*, 2012; TIZIOTO *et al.*, 2013) de que o gene *ASAPI* afeta a maciez da carne, entretanto, dos 21 haplótipos investigados, somente os haplótipos 7, 8 e 9 apresentaram efeito significativo. Esses resultados podem indicar que a mutação causal se encontra nessa região, ou ainda, que esses haplótipos podem estar em desequilíbrio de ligação com variações causais, nesse gene (por exemplo, com SNPs não representados no chip), ou em outros genes.

Os efeitos dos haplótipos podem estar subestimados ou superestimados devido ao número pequeno de amostras em cada grupo genotípico.

Para o efeito do haplótipo 8 sobre FC7, não foi possível dividir o efeito genotípico em efeito aditivo ou de dominância, o mesmo aconteceu para o efeito do haplótipo 10 sobre FC0 e isso pode indicar que a associação desses haplótipos sobre as características estudadas pode ser devido a um efeito epistático, ou a amostra não foi suficiente para detectar tais efeitos.

O gene *ASAPI* está localizado no cromossomo 14 bovino onde existem relatos de QTLs para espessura de gordura e marmoreio (CASAS *et al.*, 2003) e maciez de carne (TIZIOTO *et al.*, 2013). Um recente estudo de associação genômica ampla com a mesma população utilizada aqui indicou que o BTA14 apresenta um QTL para maciez de carne e que o gene *ASAPI* é um candidato localizado na região desse QTL (TIZIOTO *et al.*, 2013). Outro estudo realizado por KING *et al.*, (1999) indicou que o gene *ASAPI* tem um papel importante no processo de transdução de sinal, em que um sinal é passado através de uma célula para provocar uma mudança na atividade ou estado de outra célula. A proteína codificada pelo gene *ASAPI* atua na diferenciação de fibroblastos em adipócitos e eventualmente de outros tipos celulares

Embora apenas o papel do gene *ASAPI* em diferenciação de adipócitos esteja comprovado, o envolvimento no processo de diferenciação de outros tipos celulares é sugerido na literatura (KING *et al.*, 1999). A partir dos nossos resultados, é possível especular que este gene deve estar envolvido também na diferenciação de fibras musculares. Outra hipótese é que este poderia estar DL com polimorfismos nos genes funcionais envolvidos no amaciamento da carne. A associação de *ASAPI* com a maciez da carne é suportado por resultados obtidos por Casas (CASAS, 2010, comunicação pessoal), que encontraram uma associação deste gene com marmoreio, força de cisalhamento e peso da carcaça quente em bovinos de corte *Bos taurus*.

3.4.6. Estudo dos efeitos das associações entre os níveis de expressão dos genes *KCNJ11*, *MyoD1* e *ASAP1* e as medidas de força de cisalhamento

A expressão gênica de perfis no músculo também foi utilizada para avaliar se os genes *KCNJ11*, *MyoD1* e *ASAP1* poderiam ser candidatos funcionais afetando a maciez da carne. Não foi possível verificar os efeitos da expressão do gene *CALCA* na maciez, uma vez que os resultados de PCR em tempo real e RNA-Seq obtidos por nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) sugerem que esse não se encontra expresso no músculo.

Para melhor caracterizar o envolvimento desses genes na regulação da maciez da carne, os níveis de expressão dos mesmos foram associados com os fenótipos individuais em 136 animais. Quando encontrada associação significativa de ambos marcadores e expressão gênica, a influência dos polimorfismos na abundância de mRNA também foi investigada para testar a hipótese de eQTL (*expression quantitative trait loci*).

Os níveis de expressão do gene *KCNJ11* encontram-se associados com FC7 ($P \leq 0,05$) (Tabela 29). Quando o nível de expressão diminui pela metade, a FC7 decresce 0,1627 ($\pm 0,06786$) kg (Figura 13). Em outras palavras, níveis mais baixos de expressão do gene *KCNJ11* foram relacionados com a carne mais macia após sete dias de maturação. Genótipos dos SNPs 1526C>T e 2342T>C, no entanto, não influenciaram os níveis de expressão deste gene ($P \leq 0,54$ e $P \leq 0,97$, respectivamente).

Uma vez que o SNP 2342T>C não parece ter influência sobre a abundância dos transcritos do gene *KCNJ11*, os efeitos observados do polimorfismo e do nível de expressão do gene *KCNJ11* na FC7 parecem ser independentes. O efeito do nível de expressão do gene *KCNJ11* na FC7 poderia ser explicado por mutações em regiões regulatórias ou por outros mecanismos, tais como a regulação gênica por microRNA, viés de códon ou mesmo interação com outros genes que codificam para fatores de transcrição.

Tabela 29. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene *KCNJ11* nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.

FC	Efeito estimado (Kg)±EP	P valor
0	-0,0786 ± 0,066	0,2403
7	-0,1627 ± 0,068	0,0187*
14	-0,03891± 0,056	0,4877

* P≤0.05; FC: força de cisalhamento (medida 24 horas após o abate = 0; medida após 7 dias de maturação = 7; medida após 14 dias de maturação da carne = 14).

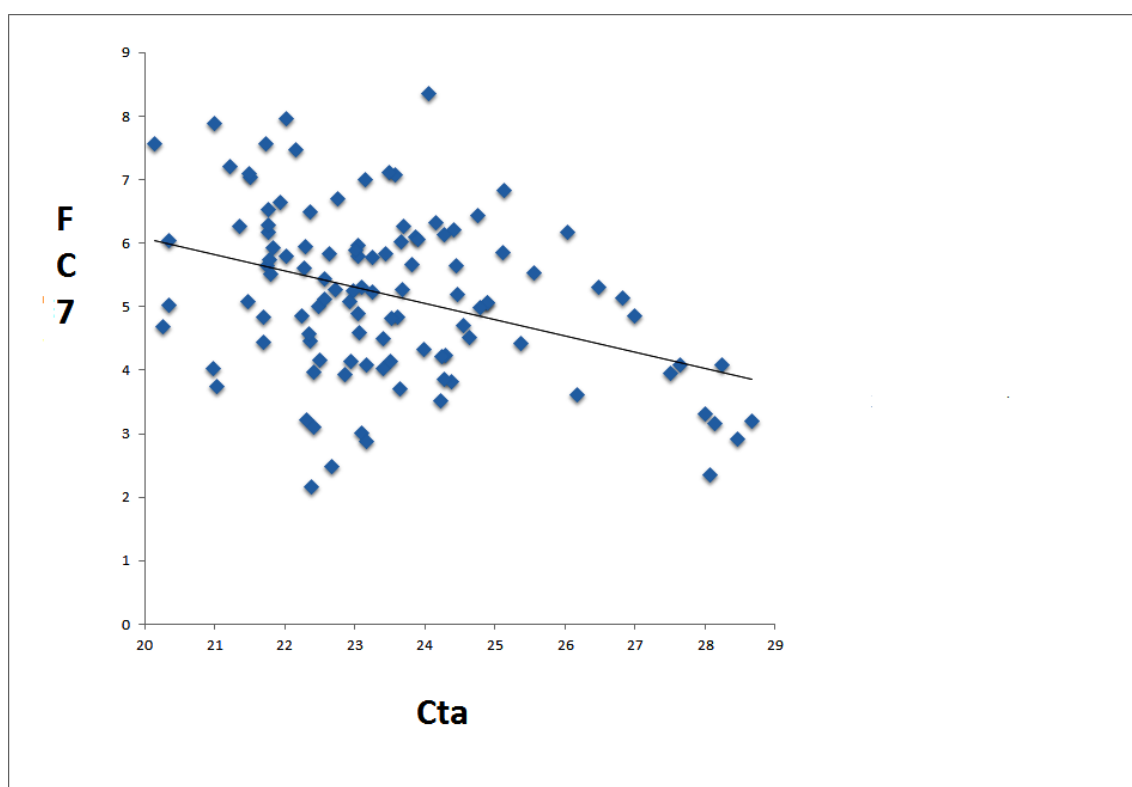


Figura 13. Regressão linear entre os níveis de expressão ajustados (Cta) do gene *KCNJ11* e as medidas de força de cisalhamento após 7 dias de maturação da carne.

Fonte: autoria própria

O nível de expressão do gene *MyoDI* também foi associado com a maciez da carne após 7 e 14 dias de maturação (Tabela 30) ($P \leq 0,01$). Quando o nível de expressão diminuiu pela metade, a FC7 decresce em 0,1766 ($\pm 0,0575$) kg e a FC14 diminuiu em 0,1274 ($\pm 0,0459$). Em outras palavras, níveis de expressão mais baixos do gene *MyoDI* aumentam a maciez da carne após 7 e 14 dias de maturação.

O gene *MyoDI* está localizado na mesma região em que o gene *KCNJ11* se encontra, a qual apresenta um QTL descrito para maciez de carne (REXROAD *et al.*,

2001). Esse gene está envolvido no desenvolvimento muscular, na regulação positiva do músculo esquelético, na regeneração do tecido muscular, na diferenciação de mioblastos, na regulação positiva de diferenciação da célula muscular e na adaptação da fibra muscular esquelética, e portanto é um candidato a influenciar características de produção (BHUIYAN *et al.*, 2009). O processo de miogênese é complexo e está envolvido na formação da fibra muscular ao longo do desenvolvimento embrionário, diferenciação e maturação (TE PAS *et al.*, 1994) e a família de genes *MyoD* tem papel importante nesse preceito.

Muita atenção tem sido dada aos mecanismos moleculares de ativação e manutenção da transcrição gênica músculo-específica. A família gênica *MyoD* codifica fatores de transcrição que controlam mudanças coordenadas na expressão de genes associados à miogênese (OLSON, 1993).

A partir dos resultados apresentados (Tabela 30), é possível especular que o gene *MyoDI* pode estar associado com o processo bioquímico de rigor mortis: o processo que converte o músculo em carne. No entanto, o efeito do gene *MyoDI* na maturação *post-mortem* não está claro. Diversos estudos utilizando modelos animais têm apontado os fatores de regulação muscular (FRM) como desempenhando um papel na regulação das respostas musculares e na atividade muscular (LOWE *et al.*, 1998; TAMAKI *et al.*, 2000).

O papel dos FRM na manutenção do fenótipo muscular também tem sido investigado. Estudos anteriores em ratos adultos mostraram que os produtos do gene *MyoD* são preferencialmente acumulados nas fibras musculares rápidas (HUGHES *et al.*, 1993; KRAUS; PETTE, 1997). Outros estudos também sugerem a contribuição do gene *MyoDI* na especificação de fibras do tipo rápidas (HUGHES *et al.*, 1997, CHARGE *et al.*, 2008). Outra pesquisa descreveu a relação do gene *MyoDI* com o desenvolvimento do músculo esquelético e formação de sarcômero (BLUM *et al.*, 2012). A composição do tipo de fibra e o comprimento de sarcômero dos músculos bovinos podem ter um papel importante na determinação da qualidade da carne e da maciez (TE PAS; EVERTS; HAAGASMAN, 2004).

Os efeitos do gene *MyoDI* observados neste estudo podem refletir a sua função como ativador da transcrição de genes específicos do músculo, que determinam a formação, o crescimento, a composição e o envelhecimento do tecido muscular. A variação da expressão do gene *MyoDI* pode causar um efeito em cascata que afetaria muitos genes específicos do músculo, como por exemplo, os genes α – actina (MOSS

et al., 1996), troponina I (LIN *et al.*, 1991) e da cadeia leve da miosina (WENTWORTH *et al.*, 1991). A associação entre marcadores moleculares em família de genes *MyoD* com características de carcaça em bovinos já havia sido investigada (BHUIYAN *et al.*, 2009). No entanto, o efeito do perfil de mRNA do gene *MyoD1* na maciez da carne mostrado neste estudo é novo e poderia ser útil para estudos que integram dados de expressão gênica e variações na sequência de DNA para investigar associações entre regiões e genes com características complexas e identificar novas vias genéticas e mutações regulatórias envolvidas na maciez da carne.

Tabela 30. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene *MyoD1* nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.

FC	Efeito estimado (Kg)±EP	P valor
0	- 0.0720 ± 0.057	0.2124
7	- 0.1766 ± 0.057	0.0029*
14	- 0.1274 ± 0.045	0.0069*

* $P \leq 0.001$; FC: força de cisalhamento (medida 24 horas após o abate = 0; medida após 7 dias de maturação = 7; medido após 14 dias de maturação da carne = 14).

Os resultados de expressão gênica mostraram que o gene *ASAPI* apresenta apenas um efeito sugestivo ($P \leq 0,10$) (Tabela 31) para FC7 em 136 animais da população da raça Nelore estudada.

Tabela 31. Efeito do nível de expressão muscular (Ct) do gene *ASAPI* nas medidas de força de cisalhamento em 136 novilhos da raça Nelore.

FC	Efeito estimado (Kg)±EP	P valor
0	-0.0543 ± 0.089	0.5468
7	-0.1685 ± 0.092	0.0714*
14	-0.1032 ± 0.074	0.1719

* $P \leq 0.1$; FC: força de cisalhamento (medida 24 horas após o abate = 0; medida após 7 dias de maturação = 7; medido após 14 dias de maturação da carne = 14).

As características biológicas de um fenótipo específico são controladas através da expressão de diferentes genes. A identificação dos genes que influenciam as características biológicas do músculo e o conhecimento dos seus perfis de expressão proporcionará uma melhor compreensão de processos fisiológicos musculares e a sua influência sobre a qualidade da carne (HOCQUETTE *et al.*, 2006).

3.5. Conclusão

Uma vez que vários genes em diferentes loci podem afetar características de produção, como a maciez da carne, não se espera que os estudos de genes candidatos possam explicar toda a variação para a característica estudada (BENDIXEN, 2005). Os resultados aqui apresentados mostram que a variação genética e a expressão do gene *KCNJ11*, assim como a expressão do gene *MyoD1* e variantes na sequência do gene *ASAPI* estão associadas com a maciez da carne de uma população da raça Nelore, sugerindo que esses são potencialmente candidatos fisiológicos e/ou funcionais para a qualidade de carne em bovinos. Os marcadores e/ou haplótipos identificados nesse estudo que contribuem para a variação fenotípica da maciez da carne, em associação com outros marcadores, podem ser utilizados para melhorar o ganho genético para essa característica, constituindo essa uma maneira mais acessível economicamente ao produtor. A magnitude dos efeitos descritos neste trabalho pode estar sub ou superestimada devido ao pequeno tamanho da amostra utilizada. Antes de essas informações serem utilizadas de forma eficiente dentro de programas de melhoramento, elas devem ser investigadas em mais raças e populações para descrever com precisão as associações dos marcadores e suas fases de ligação. Uma vez confirmada, a inclusão do SNP 2342T>C do gene *KCNJ11*, que se mostrou associado com maciez de carne, em painéis de genotipagem em larga escala pode melhorar a precisão da seleção genômica para essa característica, uma vez que esse SNP ainda não está representado nos chips de SNPs disponíveis no mercado. A investigação de mecanismos regulatórios da expressão dos genes candidatos *KCNJ11* e *MyoD1* também deverá contribuir para implementação dessa informação em programas de melhoramento, além de fornecer *insights* sobre os mecanismos moleculares que afetam a maciez da carne bovina.

3.6. Referências

- ALEKSEEV, A.E. et al. Sarcolemmal ATP-Sensitive K⁺ Channels Control Energy Expenditure Determining Body Weight. **Cell Metabolism**, v.11, p.50-69, 2010.
- BARENDSE, W. (2002) **DNA markers for meat tenderness**. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.
- BARRETT, J.C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v.21, n.2, p. 263-265, 2005.
- BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. **Meat Science**, v.71, p.138–149, 2005.
- BERNARD, C. et al. Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. **Meat Science**, v.82, p. 205–212, 2009.
- BHUIYANA, M.S.A. et al. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle. **Livestock Science**, v.126, p. 292–297, 2009.
- BLUM, R. et al. Genome-wide identification of enhancers in skeletal muscle: the role of *MyoD1*. **Genes & Development**, v. 26, p.2763-2779, 2012.
- CALVO, S. et al. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.1, p.515-25, 1999.
- CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Jornal of Animal Science**, v.84, n.3, p.520-525, 2006.
- CHARGE, S. B. et al. MyoD- and nerve-dependent maintenance of MyoD expression in mature muscle fibres acts through the DRR/PRR element. **BMC Developmental Biology**, v.8, n.5, p. 1-13, 2008.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, p. 1657–1659, 2000.
- CORVA, P. et al. Association of *CAPNI* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.4, p.1064-1069, 2007.
- EWING B; GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Essex, U.K: Longman Group Ltd.1960.
- GAO, Y. et al. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Science**, v.77, p.36–45, 2007.

GLOYN, A.L. et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v.350, n.18, p.1838-1849, 2004.

GODDARD, M. E; HAYES, B.J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Reviews**, v.10, p. 381-391, 2009.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v.91, n.2, p.534-51, 2001.

HOCQUETTE, J.F. et al. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v..1, p. 159–173, 2007.

HUGHES S.M. et al. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. **Mechanisms of Development**, v. 61,p. 151–163, 1997.

HUGHES, S.M. et al. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. **Development** v.118, p.1137–1147, 1993.

JOHNSON, D.D.; HUFFMAN, R.D.; WILLIAMS, S.E. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science** v.68, n.7, p.1980-1986, 1990.

KNOCHEL, J.P.; SCHLEIN, E.M. On the mechanism of rhabdomyolysis in potassium depletion. **Journal of Clinical Investigation**, v.51, n.7, p.1750–1758, 1972.

KRAUS, B.; PETTE, D. Quantification of MyoD, myogenin, MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles – effects of hypothyroidism and chronic low-frequency stimulation. **European Journal of Biochemistry**, v.247, p.98–106, 1997.

KING, F.J. et al. DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and Cellular Biology** v.19, n.3, p.2330-7, 1999

LAGIRAND-CANTALOUBE, J. et al. Inhibition of Atrogin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. **PLoS One** v.4, p.1–11,2009.

LIN, H.; YUTZEY, K.E.; KONIECZNY, S.F. Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, p.267–280, 1991.

LOWE, D.A.; LUND, T.; ALWAY, S.E. Hypertrophystimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. **American Journal of Physiology** v.275,p.155–162, 1998.

MOSS, J.B.; OLSON, E.N.; SCHWARTZ, R.J. The myogenic regulatory factor MRF4 represses the cardiac α -actin promoter through a negative-acting N-terminal protein domain. **Journal Biololy Chememistry**, v.271, p.31688–31694, 1996.

O' CONNOR, S.F. et al. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science** v.75, p.1822-1830, 1997.

OLSON, E. N. Regulation of muscle transcription by the MyoD family. **Circulation Research**, v.72, p.1-6,1993.

PAGE, B.T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science** v.80, p.3077-3085,2002.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 5, n.29, 2002.

RAMAKERS, C. et al.. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.13, p.62-66, 2003.

REVERTER, A. et al. Validation of alternative methods of data normalization in gene co-expression studies. **Bioinformatics**, v.21, n.7, p.112-1120, 2005.

REXROAD, C.E et al. Comparative mapping of BTA15 and SA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. **Mammalian Genome**, v.12, p.561–565, 2001.

SAS INSTITUTE INC. **Procedures guide**. 8. ed. Cary, 2000.

SCHEET, P.; STEPHENS, M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. **American Journal of Human Genetics**. 2006.

SCHENKEL, F.S et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, 2, p. 291-299, 2006.

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

SHACKELFORD, S.D. et al. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield and growth rate. **Journal of Animal Science** v.72, p.857-863, 1994.

- SYED, F.; GRUNENWALD, H.; CARUCCIO, N. Next-generation sequencing library preparation: simultaneous fragmentation and tagging using in vitro transposition. **Nature Methods Application Note**, v. 10, p. 782, 2009.
- TAMAKI T. et al.. Limited myogenic response to a single bout of weight-lifting exercise in old rats. **American Journal of Physiology** v.278, p.1143-1152, 2000.
- TE PAS, M.F.W., EVERTS, M.E., HAAGASMAN, H.P. **Muscle development of Livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Cabi Publishing, 2004.
- TIZIOTO, P.C et al. A SNP in *ASAPI* gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, v.92,p.855-857, 2012.
- TIZIOTO, P.C. et al.. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45:1012-1020, 2013.
- TIZIOTO, P.C. et al. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nellore cattle. **Meat Science**, v. 96, p.436-40, 2014.
- TRICARICO D. et al. Hybrid assemblies of ATP-sensitive K⁺ channels determine their muscle-type-dependent biophysical and pharmacological properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 103, p. 1118–23, 2006.
- UNTERGASSER, A. et al.. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research** 35: W71-W74, 2007.
- VEISETH, E. et al. Factors regulating lamb Longissimus dorsi tenderness are affected by age at slaughter. **Meat Science** 68: 635–640, 2004.
- WENTWORTH, B.M. et al.. Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.88, p.1242–1246, 1991.
- WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROOS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science** v.68, n.12, p. 4206-4220, 1990.