

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

**Marcela Maria de Souza**

**Avaliação dos efeitos de polimorfismos e da origem parental do  
alelo na expressão de genes candidatos à característica maciez da  
carne em bovinos da raça Nelore**

**São Carlos  
2012**

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

**Marcela Maria de Souza**

**Avaliação dos efeitos de polimorfismos e da origem parental do alelo na expressão de genes candidatos à característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.**

**Orientação: Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano  
Co-orientação: Dra. Simone Cristina Méo Niciura**

**São Carlos  
2012**

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

S729ae

Souza, Marcela Maria de.

Avaliação dos efeitos de polimorfismos e da origem parental do alelo na expressão de genes candidatos à característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore / Marcela Maria de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 100 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Genética molecular. 2. Expressão alélica. 3. Epigenética. 4. Carne bovina - maciez. 5. Nelore. 6. Polimorfismo. I. Título.

CDD: 574.87328 (20<sup>a</sup>)

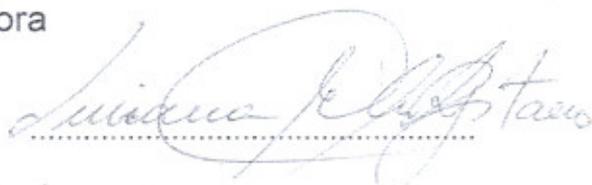
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“Avaliação dos efeitos de polimorfismo e da origem parental do  
alelo na expressão de genes candidatos a características maciez da  
carne em bovinos da raça Nelore”

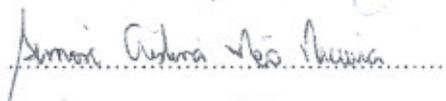
Dissertação de Mestrado de  
**MARCELA MARIA DE SOUZA**

Banca Examinadora

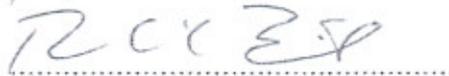
Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano



Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura



Prof. Dr. Reinaldo Alves de Brito



Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho



**Dedico este trabalho à minha avó Maria  
e aos meus pais Goretti e Américo,  
pelo grande apoio e esforço.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço a Dra. Luciana pela oportunidade de aprender, pela orientação, pela paciência e pela amizade.**

**À Dra. Simone Méo Niciura pelas ideias, orientação e amizade.**

**Aos líderes e componentes da rede “Bife de qualidade”, na qual este projeto está inserido, pela participação e contribuição neste trabalho, em especial à Dra. Fabiane Siqueira, ao Dr. Sérgio Raposo de Medeiros, Dr. Antônio do Nascimento Rosa e Dr. Luiz Otávio Campos da Silva.**

**Ao Dr. Maurício Mello de Alencar e Dr. Rymer Ramiz Tullio pela essencial participação neste projeto e pelos ensinamentos.**

**Ao Dr. Maurício Mudado por toda ajuda nas análises de bioinformática.**

**Ao Dr. Waldomiro Barioni Junior pela orientação e auxílio nas análises estatísticas.**

**À Embrapa pelo auxílio financeiro e aos funcionários, pela convivência, paciência, dedicação e atenção.**

**A Capes pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq pelo auxílio financeiro.**

**Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos pelos ensinamentos.**

**Aos meus queridos pais, Américo e Goretti, que muito me apoiaram, compartilharam as alegrias e foram pontos-chave nos momentos mais difíceis.**

**À minha avó Tita pelo apoio e paciência e ao meu irmão Gabriel pelas palavras que me confortaram nos momentos difíceis e pela colaboração.**

**Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Em especial à Flávia que colaborou muito nos sequenciamentos. Às amigas Adriana, Sarah, Polyana, Priscila pelo apoio, pela amizade e pelas caronas. Aos amigos Marina, Gisele, Wilson, Suelen, Vitor, Alexandre, Gustavo, Renata, Juliana e Gilbertinho por toda colaboração durante todo o projeto e principalmente pela amizade.**

**À Naiara Saraiva, Clara Slade, Tatiane Tetzner, Aline Lúcio e Dr. Joaquim Garcia por serem os grandes incentivadores dessa minha caminhada no campo da pesquisa.**

**A cada um de vocês meu agradecimento, cada um contribuiu de alguma maneira e foi essencial para a conclusão deste trabalho.**

## RESUMO

A maciez é o principal atributo apreciado pelos consumidores da carne bovina, no entanto, animais da raça Nelore, que compõem a maior parte do rebanho brasileiro, apresentam carne menos macia, quando comparados a animais de origem europeia. Assim, é fundamental compreender a variabilidade de genes associados à maciez além de seus mecanismos de expressão alélica, já que desvios da expressão em função da origem parental do alelo têm sido descritos para alguns genes e tais fenômenos precisam ser compreendidos para serem incorporados nos programas de melhoramento animal. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade de SNPs contidos em genes candidatos a influenciar a maciez da carne e compreender o padrão de expressão de seus alelos. Para isso, os genótipos para SNPs contidos nos genes *CAST*, *CAPN1*, *DGAT1*, leptina, *KCNJ11* e *IGFBP3* foram determinados em uma população de 30 touros, nos quais os genes *DGAT1*, leptina e *IGFBP3* não se mostraram polimórficos. Os SNPs polimórficos na população de touros foram então genotipados na progênie, por ensaio *TaqMan*<sup>®</sup> em PCR em tempo real, seguida da avaliação da expressão alélica dos mesmos. Na análise de expressão utilizou-se um SNP para discriminar cada alelo do gene, ou dois SNPs, no caso do *KCNJ11*. O padrão de expressão de todos os genes foi bialélico no tecido muscular adulto. Entretanto, com exceção do *CAPN1*, para o qual a diferença de expressão alélica não foi significativa, as razões de expressão alélica foram significativamente diferentes de 1 para os genes *CAST* ( $1,3 \pm 0,03$ ) e os dois SNPs analisados do *KCNJ11* SNP 2126T>C ( $1,2 \pm 0,04$ ) e SNP 2942C>T ( $1,46 \pm 0,04$ ). A expressão alélica diferencial (EAD) encontrada no SNP 2126T>C do *KCNJ11* e no *CAST* não foram influenciadas pela origem parental do alelo, mas a diferença de expressão alélica no SNP 2942C>T do gene *KCNJ11* apresentou efeito de origem parental, além da influencia do genótipo do outro SNP do *KCNJ11*. Concluiu-se então que os genes *CAST*, *CAPN1* e *KCNJ11* são polimórficos na população, não são *imprinted*, mas os genes *CAST* e *KCNJ11* apresentam expressão alélica diferencial.

**Palavras-chave:** *imprint*; marcador molecular; Nelore; bovino; expressão alélica. maciez.

## ABSTRACT

Tenderness is the main trait appreciated by consumers of bovine meat, however Nellore animals that comprise the largest part of Brazilian cattle, have lower tenderness when compared with European animals. In this way, it is essential understand the variability of genes associated to tenderness as well as their mechanisms of allelic expression, considering that deviations of expression depending on the parental origin of the allele have been described for some genes, and these phenomena must be understood to be incorporated in animal breeding programs. Therefore, the aim of this study was to evaluate the variability of SNPs in candidate genes for tenderness and investigate the expression pattern of their alleles. For this purpose, genotypes of SNPs in *CAST*, *CAPN1*, *DGAT1*, leptin, *KCNJ11* and *IGFBP3* genes were determined in 30 sires, in which the genes *DGAT1*, leptin and *IGFBP3* were not polymorphic. After this, polymorphic SNPs in population of sires were genotyped in their offspring by TaqMan® assay in real time PCR, followed by allelic expression analysis. In the expression analysis, to discriminate each allele of the gene it was utilized one SNP, or two in the case of *KCNJ11*. All genes presented biallelic expression in adult muscular tissue. However, with exception of *CAPN1* for which the allelic expression difference was not significant, the allelic expression ratio was significantly different of 1 for SNP of *CAST* ( $1.3 \pm 0.03$ ) and the two SNPs of *KCNJ11* SNP 2126T>C ( $1.2 \pm 0.04$ ) and SNP 2942C>T ( $1.46 \pm 0.04$ ). Differential allelic expression (DAE) found in SNP 2126T>C of *KCNJ11* and in *CAST* were not influenced by parental origin of allele, but the differences in allelic expression for SNP 2942C>T of gene *KCNJ11* showed parental origin effect and influence by genotype of the other SNP of *KCNJ11*. It was conclude that the *CAST*, *CAPN1* and *KCNJ11* are polymorphic in this population, they are not imprinted, but *CAST* and *KCNJ11* showed differential allelic expression.

**Keywords:** *imprint*; molecular marker; Nellore; Bovine; allelic expression; Tenderness.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eletroferogramas gerados pelo sequenciador para posterior análise nos programas *Phred/Phrap/Consed*..... 50
- Figura 2.** Imagem da saída do programa *Consed* que permite a visualização dos SNPs..... 51
- Figura 3.** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo.  $\log_2$  da intensidade FAM/intensidade VIC plotado contra  $\log_2$  da razão aleloFAM/aleloVIC das 7 diluições (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 – alelo VIC:alelo FAM) dos DNAs de indivíduos homocigotos..... 57
- Figura 4.** Razão da expressão dos alelos G/A do SNP g.2959A>G em amostras de músculos de novilhos da raça Nelore..... 58
- Figura 5.** Razão da expressão alélica G/A do SNP g.2959A>G em amostras de músculos de animais Nelore, de acordo com a origem parental do alelo G..... 59
- Figura 6:** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo.  $\log_2$  da intensidadeFAM/intensidadeVIC foi plotado contra o  $\log_2$  de aleloFAM/aleloVIC das diluições dos DNAs de indivíduos homocigotos em 7 proporções (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 – aleloVIC:aleloFAM), para o SNP do gene *CAPN1*..... 66
- Figura 7:** Razão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 2126T>C..... 67
- Figura 8:** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo.  $\log_2$  da intensidadeFAM/intensidadeVIC foi plotado contra o  $\log_2$  de aleloFAM/aleloVIC das diluições dos DNAs de indivíduos homocigotos em 7 proporções (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 – alelo VIC:aleloFAM). **A)** Curva padrão SNP 2126T>C. **B)** Curva padrão SNP 2942C>T..... 70
- Figura 9:** Razão da expressão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 2126T>C, gene *KCNJ11*. ..... 72
- Figura 10:** Razão da expressão alélica C/T do SNP 2126T>C em amostras de músculos de novilhos da raça Nelore, de acordo com a origem parental do alelo C..... 73
- Figura 11:** Razão da expressão alélica C/T do SNP 2942C>T em amostras de músculos de animais da raça Nelore..... 73
- Figura 12:** Razão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 2942C>T de acordo com a origem parental do alelo C..... 74
- Figura 13:** Efeito do genótipo do SNP 2942C>T sobre EAD do SNP 2126T>C..... 76
- Figura 14:** Efeito do genótipo do SNP 2126T>C sobre a EAD do SNP 2942C>T.... 77

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localização e características de polimorfismos nos genes *CAPN1*, *CAST*, *DGAT1*, *KCNJ11*, *IGFBP3* e leptina, sequências no GenBank e possíveis genótipos..... 45
- Tabela 2.** Sequências (5'-3') dos *primers* e das sondas utilizados para a genotipagem dos polimorfismos nos genes *CAPN1*, *CAST*, *DGAT1*, *KCNJ11*, *IGFBP3* e leptina..... 46
- Tabela 3.** *Primers* utilizados para o sequenciamento de fragmentos do gene *CAPN1*, tamanho do produto de amplificação.....48
- Tabela 4.** Frequências alélicas e genótípicas encontradas para o SNP A>G éxon30/3'UTR do gene *CAST* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.....56
- Tabela 5.** Polimorfismos e frequências alélicas do gene *CAPN1* de animais da raça Nelore.....62
- Tabela 6:** *Tag*SNP, nas respectivas posições no gene e os SNP que eles capturam.....63
- Tabela 7:** Frequências alélicas e genótípicas encontradas para o SNP 3379G>A do gene *CAPN1* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.....65
- Tabela 8.** Frequências alélicas e genótípicas encontradas para o SNP 2126T>C do gene *KCNJ11* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.....68
- Tabela 9:** Valores de *a* e *b* na equação obtida para a curva padrão  $Y = a + Bx$  para os dois SNPs do gene *KCNJ11*.....71

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. Objetivos gerais .....	14
3.2. Objetivos específicos .....	14
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
4.1. Bovinocultura de corte no Brasil .....	15
4.2. A raça Nelore no Brasil .....	16
4.3. Melhoramento genético de bovinos .....	17
4.4. Uso de marcadores moleculares no Melhoramento Animal .....	19
4.4.1. Marcadores moleculares.....	19
4.4.2. Prospecção de polimorfismos no genoma .....	21
4.4.3. Genotipagem de polimorfismos .....	22
4.4.4. Seleção assistida por marcadores (SAM).....	24
4.5. Características de qualidade da carne.....	26
4.6. Genes candidatos para características de qualidade da carne.....	28
4.6.1. <i>CAPN1</i> – <i>Calcium-activated neutral protease 1</i> .....	29
4.6.2. <i>CAST</i> – Gene codificador da calpastatina .....	31
4.6.3. <i>KCNJ11</i> – <i>Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J</i> , membro 11 ....	32
4.6.4. <i>Obese</i> – Gene codificador da leptina.....	33
4.6.5. <i>DGAT1</i> - Diacilglicerol O-aciltransferase.....	34
4.6.6. <i>IGFBP3</i> - <i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i> .....	34
4.7. Expressão gênica .....	35
4.7.1. Epigenética.....	36
4.7.2. Expressão alélica específica.....	37
4.7.2.1. <i>Imprinting</i> genômico .....	38
4.7.2.2. Expressão alélica preferencial (EAP) .....	39
4.7.2.3. Expressão alélica diferencial (EAD).....	39
4.7.3. Prospecção de expressão alelo específica e sua aplicação no Melhoramento Animal .....	40
<b>5. Material e Métodos</b> .....	<b>42</b>
5.1. Animais .....	42
5.1.1. Touros .....	42
5.1.2. Novilhos .....	42
5.1. Coleta das amostras de DNA, extração e quantificação do DNA .....	43
5.2. Genotipagem dos polimorfismos.....	45
5.4. Sequenciamento .....	46
5.5. Extração e quantificação do RNA .....	51
5.6. Síntese de cDNA (RT-PCR).....	52

5.7. Avaliação da expressão gênica alelo específica.....	52
<b>6. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
6.1. Escolha dos animais extremos para o sequenciamento .....	53
6.2. Análise de TagSNP para os genes <i>KCNJ11</i> e <i>CAPN1</i> .....	54
6.3. Análise estatística da expressão alélica diferencial .....	54
6.4. Análise de efeito de origem parental.....	55
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
7.1. Gene <i>CAST</i> .....	55
7.1.1. Frequências alélicas e genotípicas.....	55
7.1.2. Análise da expressão alelo específica.....	57
7.2. Gene <i>CAPN1</i> .....	61
7.2.1. SNPs identificados no gene <i>CAPN1</i> .....	61
7.2.2. Escolha do SNP do <i>CAPN1</i> para as análises de expressão .....	63
7.2.3. Frequências alélicas e genotípicas.....	65
7.2.4. Análise da expressão alelo específica.....	66
7.3. Gene <i>KCNJ11</i> .....	67
7.3.1. Escolha do SNP, Estudo de <i>TagSNP</i> e <i>Haploview</i> .....	68
7.3.2. Frequências alélicas e genotípicas.....	68
7.3.3. Análise da expressão alelo específica.....	69
7.4. Genes da leptina, <i>DGAT1</i> e <i>IGFBP3</i> .....	78
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte tem grande impacto na economia brasileira, principalmente quando se trata do cenário de exportação, já que o país é o maior exportador de carne bovina do mundo e o segundo maior produtor mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos (ANUALPEC, 2010). Para consolidar sua posição, o Brasil vem tentando se adequar às normas impostas pelo comércio mundial (LOPES; SANTOS, 2007) visando à modernização, melhoria na eficiência de produção e qualidade do produto que chega ao consumidor (MENEZES et al., 2005).

A maciez da carne é a característica mais apreciada pelo consumidor mundial (VERBEKE et al., 2010), entretanto, animais *Bos indicus*, que compõem a maior parte do rebanho bovino brasileiro (MAGNABOSCO et al., 1997), são inferiores nessa característica quando comparados aos animais de origem europeia (CROUSE et al., 1989; O'CONNOR et al., 1997; ROSSATO et al., 2010).

Assim, na tentativa de melhorar a eficiência produtiva do rebanho brasileiro e a qualidade do produto final, muitos produtores lançam mão do melhoramento genético animal por meio de ferramentas como a seleção de indivíduos superiores geneticamente de acordo com as características de interesse, e esses animais irão compor o grupo de animais utilizados como pais da próxima geração (KINGHORN et al., 2006).

Maciez é uma medida geralmente expressa tardiamente. Assim no sentido de prever precocemente o potencial do animal para tal característica, aumentar a eficiência de seleção e diminuir prejuízos, os marcadores moleculares vêm sendo visados como auxiliares no melhoramento genético animal (DEKKERS; HOSPITAL, 2002; VILLANUEVA et al., 2005). Os marcadores são variações entre os materiais genéticos dos indivíduos, que segregam de maneira Mendeliana e podem ser utilizados como marcos para identificar os melhores animais a serem reprodutores. A inclusão de marcadores moleculares no melhoramento animal (Seleção Assistida por Marcadores – SAM) junto com as técnicas tradicionais de melhoramento também é utilizada com o intuito de aumentar a precisão da estimativa do valor genético do animal (CARNEIRO et al., 2006) e correção de possíveis erros nos pedigrees através de testes de parentesco (LONG et al., 1990).

Diversos genes já foram associados com maciez, como por exemplo, o *CAPN1* (KOOHMARAIE, 1994) e o *CAST* (SCHENKEL et al., 2006), que compõem o sistema calpaína-calpastatina, responsável pela degradação das miofibrilas do músculo no período *post-mortem*. Genes como o da leptina (GEARY et al., 2003; KONONOFF et al., 2005) e o *DGAT1* (MOORE et al., 2003; THALLER et al., 2003) também estão associados à maciez, atuando na deposição de gordura tanto subcutânea quanto intramuscular, evitando o endurecimento da carne.

Novos genes tornam-se alvos de estudos devido a sua posição no genoma ou ao seu envolvimento em processos biológicos que possivelmente poderiam afetar a maciez da carne. É o caso do gene *IGFBP3* (VENERONI, 2010), localizado em uma região do cromossomo 4 de bovinos associada com gordura intramuscular, e o gene *KCNJ11* que foi associado à produção de fenótipos magros em camundongos mesmo em dietas ricas em gorduras (ALEKSEEV et al., 2010).

Contudo, a aplicação da MAS considera que os alelos herdados de cada parental contribuem igualmente na caracterização do fenótipo, porém são conhecidos casos em que há expressão alelo específica, ou seja, o alelo herdado da mãe não se expressa de maneira igual ao alelo paterno. Esses eventos são denominados epigenéticos e envolvem a introdução de informações reversíveis nos cromossomos que alteram a expressão dos genes, podendo resultar em variação no fenótipo, sem modificar a sequência de nucleotídeos (KENDREW, 1994). Podem ocorrer através da metilação de alelos resultando no silenciamento dos mesmos, fenômeno conhecido por *imprint* genômico ou então ocorrem pela modificação da estrutura da cromatina, que também silencia genes e alelos (GREGORY et al., 2001).

Assim genes *imprinted*, nos quais apenas um alelo é expresso de acordo com sua origem parental, podem afetar os modelos estatísticos usados no melhoramento animal por causarem diferenças entre valores genéticos de fêmeas e machos, e produzirem desvios em efeitos genéticos aditivos e não aditivos (PATTEN; HAIG, 2008). A expressão alelo específica também pode ocorrer em genes *não-imprinted*, sendo resultado de elementos regulatórios no DNA que atuam sobre a expressão de cada alelo diferentemente (KURREEMAN et al., 2004; PASTINEN; HUDSON 2004). Já foi demonstrado que esse tipo de expressão é amplamente distribuída no genoma de humanos (YAN et al., 2002; LO et al., 2003). Em bovinos ainda são escassos os trabalhos envolvendo esses mecanismos, tanto

com finalidade de incorporação na MAS quanto para caracterização dos genes.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A raça Nelore compõe a maior parte do rebanho bovino brasileiro e, por essa razão, é de extrema importância para agropecuária nacional. Apesar de ser bem adaptada ao clima do país, a qualidade da carne ainda é inferior à dos animais europeus. Além disso, no Melhoramento Genético tradicional pouco tem sido feito para a seleção de características que influenciam a qualidade da carne na raça. A investigação da presença de polimorfismos em genes candidatos e a investigação do padrão de expressão desses genes podem contribuir para o avanço do conhecimento, que futuramente pode ser empregado para auxiliar os programas de melhoramento genético na seleção precoce de animais com base nessas características. Estudos sobre o papel de genes candidatos para características de produção de carne de bovinos da raça Nelore e o padrão de expressão dos seus alelos ainda são incipientes, razão pela qual propusemos a realização dessa pesquisa.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

O trabalho teve como objetivo verificar se há expressão alelo específica e efeito de origem parental para os genes *CAST*, *CAPN1* e *KCNJ11*, candidatos para associação com características de maciez da carne e deposição de gordura, em tecido muscular e adiposo de animais Nelore. Além disso, buscou-se analisar a frequência de SNPs contidos nos genes *CAST*, *CAPN1*, *KCNJ11*, *DGAT1*, leptina e *IGFBP3*, e encontrar SNPs polimórficos para o gene *CAPN1* em uma população da raça Nelore.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Prospectar SNPs informativos contidos no gene *CAPN1*;
- Analisar a frequência de SNPs contidos nos genes *CAPN1*, *CAST*, *KCNJ11*, leptina, *DGAT1* e *IGFBP3*;
- Avaliar a existência de expressão alelo específica e efeito de origem parental nos genes *CAST*, *CAPN1* e *KCNJ11*.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Bovinocultura de corte no Brasil

A principal atividade econômica do Brasil é o agronegócio, sendo responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB) e 37% dos empregos gerados no país (ANUALPEC, 2010). Dentre as atividades do agronegócio destaca-se a bovinocultura de corte, pois o país é atualmente o maior exportador mundial de carne, superando inclusive países como Austrália e Estados Unidos, em segundo e terceiro lugares, respectivamente. Essa posição foi alcançada após crescimento expressivo no comércio de exportação da carne brasileira. Em consequência, em 2009, o país dedicou 21,2% da sua produção total à exportação, o que equivale a 1.611 milhões de toneladas, enquanto a Austrália exportou 1.390 milhões (ANUALPEC, 2010).

Uma série de acontecimentos ao longo de duas décadas promoveu essa abertura do mercado internacional para a carne brasileira. Nas décadas de 80 e 90, houve modernização do setor de produção de carne no Brasil com o objetivo de alcançar maior competitividade, após sua aproximação econômica com a Argentina e países do MERCOSUL. A modernização envolveu o estímulo do setor e busca por avanços tecnológicos na engorda e terminação dos animais. A desvalorização da moeda brasileira na década de 90 também favoreceu o crescimento da exportação de carne gerando investimentos no setor, ponto chave na abertura do mercado internacional (POLAQUINI et al., 2006).

Além disso, o abastecimento mundial de carne pelos rebanhos europeus foi abalado pela incidência da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), comumente conhecida como doença da vaca louca, e a exportação de carne da Argentina foi afetada pelo aparecimento de febre aftosa no seu rebanho (POLAQUINI et al., 2006; ZANINE et al., 2006). As baixas na exportação de carne permitiram que o Brasil ocupasse áreas do mercado antes dominadas pelos produtores europeus e argentinos.

Diante desses acontecimentos, o país conquistou espaço no mercado mundial e vem firmando sua posição, demonstrando grande potencial para produção de carne. Em 2009, o rebanho brasileiro atingiu aproximadamente 174 milhões de

cabeças, ficando atrás apenas da Índia, líder isolado com cerca de 281 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2010).

Visando consolidar sua posição de destaque no mundo e atender o mercado consumidor nacional, o Brasil vem tentando se adequar às normas impostas pelo cenário mundial (LOPES; SANTOS, 2007). As exigências na pecuária estão se tornando cada vez maiores quanto à qualidade (LUCHIARI FILHO, 2006), otimização de custos (PANETO et al., 2009), rastreabilidade (LOPES; SANTOS, 2007) e sustentabilidade.

Para atender essas exigências do mercado e a demanda de consumidores, novas tecnologias estão sendo aplicadas buscando-se melhorar a eficiência da produtividade e a qualidade do produto que chega ao consumidor (MENEZES et al., 2005). A transferência de embriões, a clonagem, a produção *in vitro* de embriões, o mapeamento genômico e a seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) são exemplos dessas novas tecnologias.

#### **4.2. A raça Nelore no Brasil**

Os rebanhos brasileiros são compostos, principalmente, por animais *Bos indicus* (BONILHA et al., 2008), sendo sua base genética composta de animais importados da Índia por volta de 1962. Os principais touros que contribuíram para formação da base genética existente hoje na raça Nelore no país foram: Kavardi, Taj Mahal, Goghavari, Golias e Rastã (MAGNABOSCO et al., 1997).

No início da colonização do Brasil, período no qual a pecuária não tinha finalidade econômica, os bovinos utilizados eram de origem europeia (*Bos taurus*). Contudo esses animais apresentam baixa adaptabilidade ao clima do Brasil, isso inclui pouca tolerância ao calor e baixa resistência a parasitas, o oposto dos animais *Bos indicus*, que apresentam características satisfatórias de adaptação ao clima nacional, e foram trazidos principalmente no intuito de serem utilizados para tração e produção de carne e leite por Dom Pedro I (MAGNABOSCO et al., 1997).

Apesar dos animais zebus (*Bos indicus*) se adaptarem bem ao clima tropical e apresentarem maior resistência a parasitas (MARQUES, 1976; O'KELLY; SPIERS, 1976; PIPER et al., 2009) são inferiores aos animais europeus em uma série de outras características.

Essa inferioridade é percebida em estudos de cruzamentos entre as

duas subespécies. Restle et al. (2000) observaram acentuada queda no ganho de peso à medida que se aumenta a proporção de *Bos indicus* no indivíduo. Em relação às fêmeas, Restle et al. (2001) encontraram que vacas da raça Charolês (*Bos taurus*) apresentaram melhor desempenho reprodutivo do que vacas Nelore, com porcentagem de fêmeas prenhes 80,60% e 45,50%, respectivamente. Além disso, animais *Bos taurus* produzem notavelmente carne de melhor qualidade em relação a características como maciez e marmoreio, comparada aos animais *Bos indicus* (CROUSE et al., 1989; O'CONNOR et al., 1997; VAZ et al., 2002; ROSSATO et al., 2010).

No Brasil, os animais zebuínos representam cerca de 80% do rebanho bovino (MAGNABOSCO et al., 1997). Em algumas regiões do país, por exemplo, no Sul, atingindo algumas áreas do Centro-Oeste e do Sudeste (VAZ et al., 2001), a raça Nelore e outros zebuínos são utilizados em cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus*, com o objetivo de melhorar a eficiência produtiva do animal explorando a heterose (CROUSE et al., 1989).

Além da utilização de cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus*, o ganho genético do rebanho brasileiro e o aumento de sua produtividade podem ser alcançados com técnicas de seleção de animais geneticamente superiores a partir do uso de Diferença Esperada na Progênie (DEPs), oriundas de avaliações genéticas (LÔBO et al., 2008).

#### **4.3. Melhoramento genético de bovinos**

O ganho genético do rebanho pode ser alcançado lançando mão de diversas estratégias de melhoramento genético, cujo objetivo é aprimorar as características dos animais que formarão a próxima geração.

As ferramentas clássicas do melhoramento animal são basicamente os sistemas de acasalamentos e de seleção. Nos sistemas de acasalamento, o cruzamento entre raças explora diferenças genéticas para a característica de interesse, como é o caso dos cruzamentos *Bos taurus* x *Bos indicus*. Outra ferramenta é a seleção que, por meio da mensuração de características fenotípicas de interesse, identifica os animais geneticamente superiores para comporem o grupo que será utilizado como pais da próxima geração. Recentemente, a aplicação da genética molecular, como auxílio a essas ferramentas tradicionais, tem contribuído

com o melhoramento animal.

O sistema de produção e o mercado vão direcionar quais características serão utilizadas como critérios de seleção. Com base em observações fenotípicas é possível calcular o Valor Genético Estimado (VGE) do animal ou a DEP, e assim, inferir quais são geneticamente superiores (KINGHORN et al., 2006). Para obter maior resposta à seleção, a característica utilizada como critério deve apresentar variação fenotípica e herdabilidade de alta magnitude. A herdabilidade é a proporção da variação fenotípica que é explicada pela variação genética aditiva (KINGHORN et al., 2006).

Características reprodutivas, de crescimento e morfológicas são utilizadas como critérios de seleção em programas de melhoramento, e proporcionam ganho genético. Contudo,

Medidas de peso corporal, consideradas como característica de crescimento, são constantemente usadas em programas de melhoramento, pois além de serem fáceis de mensurar, apresentam herdabilidade de magnitude média a alta, o que significa que quando aplicada como critério respondem bem à seleção. A velocidade de crescimento do animal pode ser melhorada a partir da seleção de indivíduos com melhores avaliações para características como peso ao sobreano, que apresenta grande variabilidade genética na raça e alta herdabilidade (KOOTTS et al., 1994; KOURY FILHO et al., 2009; LAUREANO et al., 2011).

Características de reprodução devem ser incluídas como critérios de seleção visando aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho. Com esse objetivo, a característica mais utilizada é o perímetro escrotal que está relacionado à fertilidade, é de fácil mensuração e repetibilidade (SILVA et al., 2000; PEÑA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; LAUREANO et al., 2011).

Características morfológicas são incluídas nos programas de avaliação genética com o objetivo de melhorar características de carcaça e de acabamento.

A resposta à seleção dependerá da precisão da estimativa das DEPs (KINGHORN et al., 2006), podendo produzir taxas anuais de ganho genético da ordem de 1% (LÔBO et al., 2008). A predição do mérito genético do animal pode ser baseada no seu próprio desempenho ou de parentes. A metodologia utilizada quando se aproveita informações de parentes do indivíduo é conhecida como BLUP (*Best linear unbiased prediction*), ou seja, melhor predição linear não-viesada (KINGHORN et al., 2006). Entretanto, recentemente a genética molecular vem

possibilitando o conhecimento de genes com efeito sobre determinadas características de interesse e, com a utilização da análise direta do genótipo, é possível conferir maiores ganhos genéticos (DEKKERS, 2004).

#### **4.4. Uso de marcadores moleculares no Melhoramento Animal**

##### **4.4.1. Marcadores moleculares**

O material genético contém informações necessárias para a coordenação da estrutura e função de cada célula. Ao comparar o material genético de dois indivíduos é possível observar grande variação entre eles. Essas diferenças nos genomas podem ser utilizadas como marcas, as quais são denominadas marcadores moleculares.

As variações podem estar situadas em regiões codificadoras, e afetar ou não a função da proteína codificada, ou podem estar em regiões não codificadoras, tais como promotores na região não traduzida 5' (UTR), íntrons, regiões intergênicas e 3'UTR, e afetar ou não características importantes (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

Quando regiões do genoma nas quais estão situados os marcadores moleculares estão associadas à variação de uma característica quantitativa, essas regiões são conhecidas como *Quantitative Trait Loci* (QTL) (ANDERSSON, 2001). Sendo assim, a classificação dos tipos de marcadores moleculares associados à variação de caracteres quantitativos, segundo Dekkers (2004), é baseada na ligação dos polimorfismos com o QTL, no qual podem existir um ou muitos genes, que contêm a mutação funcional que influencia o fenótipo (ANDERSSON, 2001).

O marcador correspondente à mutação funcional que afeta a característica alvo é denominado marcador direto. Apesar de serem mais convenientes por fornecerem informações diretas (KINGHORN et al., 2006), geralmente não são de simples identificação devido à dificuldade de provar sua causalidade (DEKKERS, 2004).

A segunda classe são os marcadores em desequilíbrio de ligação, cujos loci estão próximos o suficiente da mutação funcional para existir desequilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL (ANDERSSON, 2001).

O tipo de marcador molecular denominado *restriction fragment length*

*polymorphism* (RFLP) foi o primeiro descrito, em 1971, por Danna e Nathans baseado na função da enzima de restrição caracterizada por Smith e Welcox (1970) e com a utilização de gel de poliacrilamida (LOENING, 1967). Nessa metodologia, uma enzima de restrição corta o DNA dividindo-o em fragmentos cujos pesos moleculares diferem, e esses são separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Um polimorfismo de uma única base pode causar ganho ou perda de um sítio de restrição, o que gera variação no peso molecular dos produtos de restrição, detectada por eletroforese. Marcadores RFLPs foram utilizados em anos passados na construção de mapas físicos de restrição (DANNA et al., 1973).

Os primeiros estudos de marcadores moleculares com fins zootécnicos foram publicados na década de 80 envolvendo marcadores RFLPs. Em 1985, Chardon et al. utilizaram produtos de RFLP para caracterizar uma população de suínos quanto ao complexo principal de histocompatibilidade, o qual está associado às infecções parasitárias. Nos anos seguintes, outros autores utilizaram o RFLP na avaliação da variação genéticas quanto a genes como tiroglobulina (GEORGES et al., 1987) e hormônio do crescimento (BECKMANN et al., 1986) em populações de bovinos. Atualmente são muito utilizados como metodologia de genotipagem de SNPs e associação de genes com características produção animal (DARIO; SELVAGGI, 2011; LV et al., 2011) além de eventualmente serem usados em estudos de expressão e epigenética (ZHANG et al., 2007).

Ao longo do genoma estão espalhados blocos constituídos por repetições em tandem de dois a quatro nucleotídeos, e que podem ser utilizados como marcadores (WEBER; MAY, 1989). Denominados microssatélites, ou SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*), essa classe é utilizada principalmente para caracterização genética de espécies e em estudos de parentesco de indivíduos (AMIGUES et al., 2011; AZAM et al., 2011). A metodologia baseia-se na diferença do peso molecular dos fragmentos que contêm as repetições, assim aqueles cujos números de repetições diferem, apresentarão peso molecular também diferente (WEBER; MAY, 1989). Com o auxílio de microssatélites foi possível construir os primeiros mapas genéticos abrangentes de bovinos (BARENDSE et al., 1994; ROHRER et al., 1994) em virtude de sua ampla distribuição no genoma e alta variabilidade.

Apesar das utilidades desses marcadores microssatélites, são as substituições de base única (SNP - *single nucleotide polymorphism*) que fornecem

maior densidade e muitas vezes são a única opção de marcadores muito próximos ou dentro de um gene de interesse (GUT, 2001; KWOK, 2001). Esses marcadores são descritos como mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (CAETANO, 2009) e são a base de vários tipos de marcadores moleculares como, por exemplo, RFLP, RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Grande parte dos SNPs são neutros, mas a pequena fração com efeito significativo sobre o fenótipo responde como a principal fonte de variação fenotípica resultante de variação genética entre os indivíduos de uma espécie (JORDAN et al., 2002).

#### 4.4.2. Prospecção de polimorfismos no genoma

Diversas metodologias para identificação de polimorfismos ao longo do genoma estão disponíveis, no entanto, a maioria desses métodos não é eficiente para a detecção de sequências completas de genomas por serem demoradas e trabalhosas (HUTCHISON, 2007).

Em 1977 foram publicadas duas metodologias de sequenciamento, o método químico (MAXAM; GILBERT, 1977) e o método didesoxi (SANGER et al., 1977), que caracterizaram a era moderna de sequenciamento, possibilitando a coleta rápida de informações de genomas inteiros. Nos últimos anos, didesoxi é a técnica que vem sendo mais utilizada (KWOK; CHEN, 2003), e foi aprimorada com o auxílio da bioinformática na análise dos dados (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998). A metodologia é baseada na incorporação de didesoxinucleotídeos (ddNTP), que não possuem o grupo hidroxila (OH) 3' necessário para ligar o próximo desoxinucleotídeo (dNTP), interrompendo a extensão da fita de DNA (SANGER et al., 1977). Atualmente, em uma modificação do método proposto por Sanger et al. (1977), esses ddNTP são marcados e ao final de vários ciclos é possível identificá-los em sequenciador automático capilar (REGITANO et al., 2007).

Novas tecnologias de sequenciamento estão surgindo, conhecidas como sequenciamento de nova geração. As plataformas Roche 454 (MARGULIES, et al., 2005), Solexa-Illumina (BENNETT, 2004) e ABI *Solid* (VALOUEV et al., 2008), que compõem o grupo dos sequenciadores de segunda geração, permitem o sequenciamento de milhares de bases em uma única corrida em curto período, o que torna mais eficiente o sequenciamento de genomas inteiros. Recentemente foi

desenvolvida a terceira geração de sequenciadores, caracterizada pelo sequenciamento de uma única molécula de DNA sem a necessidade de pausa entre os passos de leitura, permitindo o sequenciamento de um genoma de mamífero inteiro em algumas horas (SCHADT et al., 2010). As plataformas *Pacific Biosciences* e *Ion Torrent* foram as primeiras a comporem o cenário dos sequenciadores de terceira geração (GLENN, 2011).

Com o grande número de SNPs detectados no sequenciamento completo do genoma bovino (*Bovine HapMap Consortium*, 2009), mapas genéticos de alta densidade de SNPs tornaram-se disponíveis (LODISH et al., 2005; LARKIN, 2011). Esses mapas permitem estudos de associação genômica com características de produção, considerando que o alto número de marcadores permite proximidade suficiente a genes de interesse, o que resulta em desequilíbrio de ligação com praticamente qualquer gene do genoma (RISCH, 2000).

#### **4.4.3. Genotipagem de polimorfismos**

Após ser identificado, o SNP pode ser genotipado em grande número de animais com a utilização de metodologias baseadas na discriminação alélica, seja ela por hibridização, incorporação de nucleotídeos, ligação de oligonucleotídeos ou clivagem enzimática alelo específica (KWOK, 2001; KWOK; CHEN, 2003).

A evolução das metodologias de genotipagem teve início com técnicas básicas de clivagem enzimática como PCR-RFLP (MAEDA et al., 1989), depois surgiram técnicas de incorporação de nucleotídeos que utilizam sequenciadores automáticos para detectar os SNPs nos produtos de PCR marcados com fluorescência (KWOK, 2001).

Os equipamentos de PCR em tempo real permitiram a discriminação de alelos polimórficos de um SNP utilizando uma sonda diferente para cada alelo. Esse método de hibridização com sondas de hidrólise tem como produto comercial amplamente utilizado o ensaio de genotipagem de SNP *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, CA). São utilizadas duas sondas de oligonucleotídeos alelo específicas com marcador fluorescente em uma extremidade (repórter) e na outra extremidade um marcador (*quencher*) que absorve a fluorescência do repórter quando a sonda está intacta. Os *primers* incluídos no ensaio flanqueiam a região do SNP e permitem o início da polimerização de uma fita de DNA pela atividade da DNA polimerase, e

essa cliva a sonda que se encontra hibridizada. Essa clivagem da sonda separa o repórter do *quencher*, assim a fluorescência emitida pelo repórter, não mais absorvida pelo *quencher*, passa a ser captada pelo equipamento de PCR em tempo real (LIVAK et al., 1999).

Microarranjos de DNA, também conhecidos como *chips* de SNPs, caracterizados pela impressão de oligonucleotídeos em lâmina de vidro (HACIA et al., 1999), e espectrometria de massas (MALDI-TOF) (TANG et al., 1999) também são técnicas que permitem a genotipagem, com a vantagem de analisar grande número de SNPs simultaneamente.

Os SNPs podem ser utilizados na identificação de loci ou regiões cromossômicas que estão associados com a variação em características quantitativas, sendo ótimos auxiliares no desenvolvimento de programas de melhoramento de características bovinas de importância econômica, por serem mais estáveis ao longo das gerações do que os microssatélites (STONE et al., 2005). Assim quando é estabelecida a associação entre SNP e característica de produção, esse marcador pode ser incluído em programas de melhoramento genético visando aumentar a acurácia e a resposta à seleção (DEKKERS, 2004; IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

A conclusão do sequenciamento completo do genoma bovino (*Bovine HapMap Consortium*, 2009) permitiu o desenvolvimento de *chips* para a determinação simultânea de 54 mil SNPs (WIGGANS et al., 2009) e, recentemente, cerca de 770 mil SNPs (Illumina, Inc San Diego). Com base na genotipagem em larga escala, alguns autores como Solberg et al. (2008) e Wiggans et al. (2009), relataram estudos de seleção genômica, na qual se utilizam diversos SNPs distribuídos densamente ao longo do genoma, sendo possível rastrear a variabilidade genética aditiva total de uma característica por todo o genoma. Isso permite calcular o valor genotípico de um indivíduo com base nos genótipos de todos os SNPs que influenciam a característica, ou seja, o valor genômico do animal. Em 2009 foi publicado o primeiro sumário com valores genômicos de touros (USDA) para a raça Holandesa e, desde então, diversos estudos têm sido direcionados para produção de sumários de reprodutores para outras raças bovinas.

#### 4.4.4. Seleção assistida por marcadores (SAM)

A aplicação do melhoramento animal na criação de animais de produção tem como objetivo alcançar maior produtividade com menor custo e em menor tempo possível. Essa ciência vem sendo alvo de mudanças de grande impacto nas últimas décadas, em parte devido à aplicação da genética molecular na identificação de regiões cromossômicas ou mesmo de genes que afetam características de importância econômica.

Segundo Dekkers (2004), o programa clássico de melhoramento busca maximizar a resposta à seleção por meio de um balanço entre várias características de interesse, e assim melhorar geneticamente a população. As características de importância econômica, por sua vez, são em sua maioria complexas, apresentam fenótipos com distribuição contínua e são influenciadas por muitos genes ou QTLs dispersos ao longo do genoma (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008). Assim, a genética molecular possibilitou a identificação de cada gene e regiões cromossômicas que afetam características de produção (ANDERSSON, 2001). Dessa maneira, a seleção direta desses genes ou regiões cromossômicas resultou em avanços nos programas de melhoramento genético (DEKKERS; HOSPITAL, 2002). Por esse motivo, muitos estudos estão sendo direcionados para avaliar estratégias de uso da informação genética molecular nos programas de seleção.

Com marcadores dispersos ao longo do genoma é possível detectar e estimar efeitos dos QTLs e genes, e essas informações vêm sendo usadas como critério de seleção indireta para o melhoramento genético de características quantitativas. A utilização de marcadores moleculares como auxílio nos programas de melhoramento animal é denominada Seleção Assistida por Marcadores (SAM), e sua base é a correlação entre a característica e o genótipo do marcador, gerada devido ao desequilíbrio de ligação entre QTL e o *locus* marcador.

É importante salientar que a SAM é uma ferramenta que deve ser utilizada em conjunto com as técnicas tradicionais, sendo um auxílio à seleção dos melhores animais para serem progenitores da próxima geração, visando maior acurácia. A SAM aumenta a precisão da estimativa do valor genético do animal (VGA). Para tanto, o efeito aditivo atribuído ao marcador é incluído no modelo de estimativa e quanto mais marcadores com efeito aditivo conhecidos são incluídos no modelo, maior será a contribuição para a confiabilidade da DEP. Além disso, os

marcadores podem ser utilizados para confirmar parentesco entre os animais corrigindo possíveis erros de registros genealógicos, já que a seleção baseada no pedigree, isto é, a predição do VGA utilizando informações de parentes (BLUP) pode ser afetada por erros de avaliações e informações incorretas de pedigree resultando em prejuízos (CARNEIRO et al., 2006). Os marcadores moleculares são auxiliares na obtenção dessas informações corretas de similaridade genética, favorecendo a utilização do pedigree sem erros, portanto a seleção é mais eficiente, principalmente para características de baixa herdabilidade (LONG et al., 1990). Com o recente desenvolvimento de painéis composto por centenas de milhares de marcadores é possível implementar a seleção genômica, na qual o efeito aditivo de cada posição do genoma é utilizado na predição de um valor de DEP genômica. Villanueva et al. (2005), em seus estudos com uso de marcadores moleculares no BLUP, encontraram ganho extra se comparado ao BLUP tradicional e esse ganho aumentou ao longo das gerações.

Como já mencionado, os marcadores moleculares podem ser úteis na identificação de indivíduos aparentados (DODDS et al., 1996), o que tem diversas aplicações possíveis, como por exemplo, na análise de paternidade (HEATON et al., 2002). Perfis constituídos por muitos marcadores apresentam padrão individual e podem ser úteis ao rastreamento de um corte de carne com características desejáveis até sua fonte de origem (HILL et al., 2008).

Outra utilidade dos marcadores moleculares é na caracterização de populações (TAMBASCO et al., 2000, AMIGUES et al., 2011; AZAM et al., 2011) cuja importância está na possibilidade de análise da variabilidade genética (TELLES et al., 2001), e esta é fundamental para programas de conservação (EDWARDS et al., 2000; CAÑÓN et al., 2001) e no delineamento de programas de cruzamentos.

Características de qualidade da carne apresentam expressão tardia. Entretanto, os polimorfismos associados com tais características podem ser utilizados como auxiliares no programa de melhoramento, possibilitando prever em idades iniciais, a partir do genótipo do animal, se ele produzirá carne com melhor qualidade para determinada característica.

Diversos estudos estão sendo conduzidos com o intuito de associar SNPs com características de interesse econômico em animais de produção, como qualidade da carne e carcaça. Alguns SNPs em genes candidatos para essas características têm sido os principais alvos desses estudos, como por exemplo,

aqueles contidos no gene que codifica a calpaína, o gene *CAPN1* (CASAS et al., 2006; WHITE et al., 2005; PAGE et al., 2002), no *CAST*, gene codificador de calpastatina (SCHENKEL et al., 2006; CASAS et al., 2006; MORRIS et al., 2006), no gene codificador de leptina (SCHENKEL et al., 2005; NKRUMAH et al., 2005; KONONOFF et al., 2005; LUSK, 2007), além do *DGAT1*, Diacilglicerol O-aciltransferase 1, ligado à deposição de gordura na carne (MOORE et al., 2003; THALLER et al., 2003, FORTES et al., 2009).

#### 4.5. Características de qualidade da carne

A atual posição do Brasil no setor de exportação de carne bovina tem como consequência a necessidade de buscar alternativas para obter carne de melhor qualidade, satisfazendo o gosto do consumidor nacional e internacional. Determinadas características exercem grande influência sobre a qualidade do produto final tornando-as de grande interesse econômico e comercial e alvo de diversos estudos.

Existem fatores que afetam a qualidade da carne no período *ante-mortem* e estão vinculados ao genótipo, idade ao abate e ao ambiente em que o animal se desenvolveu. No período *post-mortem*, além do efeito ambiental, diversas reações enzimáticas acontecem, podendo gerar variações marcantes nas propriedades da carne.

A maciez da carne é o atributo mais valorizado pelos consumidores de carne bovina (VERBEKE et al., 2010) e sua variação é resultante de diversos fatores *ante-mortem* e *post-mortem*. O tamanho dos sarcômeros, a quantidade de colágeno que compõe o tecido conjuntivo (LIGHT et al., 1985) e de gordura intramuscular são responsáveis por uma pequena parte dessa variação, o restante da variação é devido ao processamento *post-mortem*.

A gordura intramuscular, também conhecida como marmoreio, afeta a qualidade da carne, diminuindo sua densidade (SEIDEMAN et al., 1987), o que implica em sensação de maior suculência (THALLER et al., 2003; CASAS et al., 2007). O marmoreio consiste no depósito de gordura no tecido adiposo que rodeia os feixes musculares. Essa é uma característica quantitativa afetada por diversos genes, mas que contribui apenas entre 3 a 10% da variação na sensação de maciez (NISHIMURA et al., 1999).

A gordura subcutânea presente na carcaça também influencia a maciez da carne, pois a espessura adequada de gordura protege as fibras musculares contra a queda brusca de temperatura durante o congelamento, evitando efeitos indesejáveis do resfriamento (KONONOFF et al., 2005) como endurecimento e escurecimento da carne.

No entanto, o principal mecanismo que atua na maciez da carne é o processamento *post-mortem*. Após a morte do animal ocorre o *rigor mortis*, ou seja, a contração muscular irreversível que torna o tecido muscular rígido, e isso se deve à formação de pontes entre miosinas e actinas (ALVES et al., 2005). A ação das enzimas proteolíticas que degradam as miofibrilas, componentes estruturais do tecido muscular esquelético, nesse período causa amaciamento na carne, amenizando o *rigor mortis* (KOOHMARAIE, 1994) e resultando maior maciez (KOOHMARAIE, 1994; CASAS et al. 2006).

São três os complexos enzimáticos que atuam no amaciamento, o sistema das calpaínas, o complexo multicatalítico de proteases e o sistema das catepsinas. Entretanto, o sistema das calpaínas é o principal responsável pela proteólise miofibrilar (KOOHMARAIE, 1994; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; PAGE et al., 2002). As enzimas  $\mu$ -calpaína e m-calpaína, que são ativadas por íons cálcio, compõem esse complexo enzimático, que é inibido pela atividade da enzima calpastatina (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999). A atividade das proteases também pode ser regulada pelo tamanho dos sarcômeros durante o período *post-mortem*, pois limita o acesso da protease ao substrato miofibrilar (WEAVER et al., 2008). Outros reguladores são a taxa de declínio do pH e a temperatura durante o desenvolvimento do *rigor mortis* (DRANSFIELD, 1994). O nível de calpaína presente no músculo é uma característica de alta herdabilidade (SHACKELFORD et al., 1994).

A avaliação da maciez pode ser feita por meio de análise sensorial, na qual pessoas treinadas dão notas para a carne de acordo com a maciez perceptível (CROSS et al., 1978). Outra maneira de verificar a maciez, mas de forma objetiva, é por meio do equipamento que mede a força necessária para cisalhar uma seção transversal de carne (WHEELER et al., 1995). O método subjetivo está correlacionado com o método de análise objetiva (BOUTON et al., 1971).

As medidas de força de cisalhamento (FC) e marmoreio apresentam herdabilidade moderada em torno de 0,2 e 0,5. Segundo Johnston et al. (2003), a

herdabilidade para FC em *Bos indicus* é superior à de *B. taurus* (0,3 e 0,09, respectivamente).

Animais *Bos indicus* apresentam carne menos macia do que animais *B. taurus* (CROUSE et al., 1989; WHEELER et al., 1990; VAZ et al., 2002; ROSSATO et al., 2010). Isso foi demonstrado nos estudos de Bianchini et al. (2007), os quais encontraram que animais puros *B. indicus* ou contendo  $\frac{1}{2}$  *B. taurus* apresentaram FC de 4,98 e 4,45 kgf, respectivamente, enquanto animais taurinos, das raças Simental e Simbrasil, apresentaram 3,13 e 3,33 kgf, respectivamente. Além disso, outros autores relataram, em cruzamentos *B. indicus* x *B. taurus*, que à medida que a proporção de zebuíno aumenta, a FC também cresce, resultando em diminuição da maciez (CROUSE et al., 1989; JOHNSON et al., 1990). Essa diminuição da maciez com aumento da proporção de zebuínos pode estar relacionada com a concentração superior de calpastatina encontrada nos mesmos (WHEELER et al., 1990; SHACKELFORD et al., 1991), ou também devido ao fato de os animais zebuínos apresentam teor de marmoreio reduzido (SHACKELFORD et al., 1991), o que lhes confere carne menos suculenta e sensação de menor maciez em relação aos taurinos.

#### **4.6. Genes candidatos para características de qualidade da carne**

Ao longo do progresso no estudo da biologia molecular aplicada ao melhoramento animal, diversos QTLs foram demonstrados estar associados com a variação fenotípica em determinadas características de qualidade da carne e da carcaça. Através de estudos de mapeamento genético e da disponibilidade de dados fenotípicos é possível detectar presença de QTL, demonstrando a variação fenotípica entre indivíduos que herdaram os diferentes alelos (ANDERSSON, 2001).

Stone et al. (1999) demonstraram presença de QTL no cromossomo bovino 5 (BTA5) influenciando características de carcaça, como por exemplo marmoreio, peso da carcaça entre outras, em uma população oriunda de cruzamentos *B. taurus* x *B. indicus*. Nesse mesmo cromossomo, Alexander et al. (2007) e Casas et al. (2003) identificaram QTLs para maciez da carne. Keele et al. (1999) identificaram um QTL no BTA15 afetando força de cisalhamento no músculo *longissimus*, após 14 dias de maturação, em uma população descendentes de touros cruzados Brahman x Hereford e mães, *B. taurus*. Também foram identificados

QTLs para maciez nos cromossomos BTA7 (DRINKWATER et al., 2006; DAVIS et al., 2008), BTA10 (DAVIS et al., 2008) e BTA29 (CASAS et al., 2000; SMITH et al., 2000). Ainda, QTLs sugestivos para maciez foram relatados no BTA29 (CASAS et al., 2001) e BTA10 (ALEXANDER et al., 2007).

O marmoreio e a gordura subcutânea, que estão indiretamente relacionados à maciez da carne (THALLER et al., 2003; KONONOFF et al., 2005), também possuem QTLs já descritos em diversos cromossomos bovinos. No BTA3, Casas et al. (2001) encontraram QTL significativo para grau de marmoreio da carne, enquanto Casas et al. (2004) encontraram apenas QTL sugestivo. Outros QTLs sugestivos foram descritos para os cromossomos BTA8 e BTA10 (CASAS et al., 2001) e BTA16 (CASAS et al., 2004). Para deposição de gordura e metabolismo de lipídeos existem QTLs descritos no BTA1 (CASAS et al., 2003), BTA2 e BTA7 (ALEXANDER et al., 2007), e sugestivos no BTA3 (CASAS et al., 2004) e BTA8 (CASAS et al., 2001).

A maioria das características de interesse na produção animal tem variação contínua no fenótipo e são influenciadas por QTLs dispersos no genoma, e em cada QTL são encontrados uma diversidade de genes que, em conjunto, afetam as características de interesse (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008). A partir dessas considerações fica claro a necessidade de se estudar individualmente cada gene contido no QTL e que afeta uma pequena proporção da variação da característica, quando se tem por objetivo compreender os mecanismos envolvidos na variação fenotípica ou manipular essa variação (RNA de interferência, transgenia e farmacogenômica).

#### **4.6.1. CAPN1 – Calcium-activated neutral protease 1**

As calpaínas são proteases citosólicas que exibem atividade proteolítica dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em pH neutro. Essa atividade dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  foi demonstrada em estudos nos quais a injeção de cálcio na carne aumentou a maciez (WHEELER et al., 1991). Essa protease bovina apresenta alta similaridade com as proteínas de humanos e camundongos (SMITH et al., 2000). Em bovinos, o gene *CAPN1* é constituído por 22 éxons, localizado no BTA29 (WHITE et al., 2005).

A molécula  $\mu$ -calpaína é um heterodímero, com uma subunidade

regulatória pequena (*CAPNS1*) e uma grande (gene *CAPN1* para a enzima  $\mu$ -calpaína, e *CAPN2* para a m-calpaína), é a primeira e principal enzima a atuar no amaciamento do músculo esquelético no período *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1996; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; PAGE et al., 2002).

A atividade desempenhada por ela consiste na degradação das proteínas miofibrilares do músculo (KOOHMARAIE, 1994; WHITE et al., 2005), processo pelo qual a carne sofre amaciamento. Segundo Dransfield (1993), a variação na atividade da  $\mu$ -calpaína explica 65% da variação na maciez da carne.

Enquanto Casas et al. (2000) identificaram um QTL para maciez no cromossomo bovino 29, Smith et al. (2000) mapearam o gene *CAPN1* na região que compreende esse QTL. Por isso o gene *CAPN1* é considerado um gene candidato posicional para maciez, e ainda candidato funcional devido à biologia do sistema que seu produto integra.

Por ser um gene candidato posicional e funcional, o *CAPN1* é alvo constante de estudos de associação, e diversos SNPs contidos nele já foram descritos em diferentes populações apresentando associação com maciez. Page et al. (2002) descreveram 2 variações no gene, uma no éxon 9, que resulta em troca de aminoácido na posição 316 da proteína (CAPN316), e uma no éxon 14, que corresponde à posição 530 na cadeia de aminoácidos (CAPN530). As mesmas variações foram demonstradas como marcadores potenciais para auxiliar na seleção de melhoramento para maciez em populações comerciais de *B. taurus* nos Estados Unidos (PAGE et al., 2004). Alguns SNPs do *CAPN1* fazem parte de testes de DNA, fornecido por empresas particulares, que visam melhorar diversas características, dentre elas a maciez. O SNP CAPN316 e CAPN4751 fazem parte dos testes comerciais IGENITY *TenderGENE* (Merial Ltd., Atlanta, GA) e GeneSTAR *Tenderness 2 test* (Genetic Solutions Pty. Ltd., Albion, Austrália).

Casas et al. (2006) encontraram associação entre o SNP CAPN4751 e a maciez em populações taurinas ou em cruzamentos *B. taurus* x *B. indicus*. No entanto, quando analisaram apenas animais *B. indicus* não obtiveram resultados significativos. Inversamente, White et al. (2005) encontraram associação desse SNP com FC no dia 7, 14 e 21 após o abate, em uma população composta por animais da raça *B. indicus* Brahman.

Casas et al. (2005), estudando quatro SNPs na *CAPN1*, encontraram apenas o CAPN316 associado com maciez em uma população de *B. indicus*, porém,

não foram encontrados animais com o genótipo favorável e, para o CAPN530, verificaram o alelo desfavorável praticamente fixado. Corroborando esses resultados, Pinto et al. (2010) verificaram que esses SNPs não eram polimórficos em uma população de Nelore, encontrando o alelo favorável de ambos SNPs com frequência menor que 1%.

Pintos e Corva (2011) atribuíram a baixa frequência dos alelos favoráveis a maciez à associação entre os mesmos e menor DEPs para taxa de crescimento e tamanho corporal. Isso é plausível, já que durante anos o melhoramento animal deu ênfase à seleção para essas características e não para maciez, acarretando diminuição dos alelos favoráveis para maciez nas populações selecionadas.

Considerando a baixa frequência de alelos e as poucas associações dos SNPs do gene *CAPN1* em *B. indicus*, pode-se pensar que não são marcadores adequados para populações com essa composição, assim, são necessários novos estudos de prospecção de SNPs polimórficos em *B. indicus* e associação com maciez.

#### **4.6.2. CAST – Gene codificador da calpastatina**

O gene *CAST* mapeado em um QTL para maciez no cromossomo 7 de bovinos (DAVIS et al., 2008) é considerado candidato para maciez de carne (SCHENKEL et al., 2006), por codificar a calpastatina, o único inibidor endógeno da calpaína. Sua atividade reduz a taxa e a extensão da proteólise no músculo esquelético pela calpaína (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999). Portanto o aumento da atividade de *CAST* no período *post-mortem* tem sido relacionado com a redução da maciez da carne (PRINGLE et al., 1997).

A unidade inibitória da molécula da calpastatina é repetida quatro vezes, e cada uma delas inibe uma molécula de calpaína (MAKI et al., 1984). Sua atividade é específica para calpaínas, atuando em  $\mu$ -calpaína e m-calpaína de forma e intensidade similares.

Em estudos prévios foram detectadas associações entre SNP no gene *CAST* e a maciez da carne (MORRIS et al., 2006; CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006; PINTO et al., 2010). Morris et al. (2006) estudaram a substituição de A por G na posição 2959 do 3'UTR no gene *CAST*, constatando que os alelos AA

( $5,1 \pm 1,6\%$ ), quando comparado com AG ( $8,6 \pm 2,0\%$ ) apresentaram redução na força média de cisalhamento. Casas et al. (2006) encontraram resultados semelhantes para esse SNP em populações taurinas puras ou com influência de *B. indicus*, no entanto, para população exclusivamente *B. indicus*, o *CAST* não apresentou associação com maciez.

Segundo Schenckel et al. (2006), o SNP UOGCAST, contido no íntron 5, está associado à maciez da carne em grandes populações de bovinos mestiços taurinos. Foi verificado que a substituição de G por C, no SNP estudado, produziu bifes mais macios. Pinto et al. (2010) também estudaram o UOGCAST e encontraram efeito aditivo para FC nos dias 7, 14 e 21 e de desvios de dominância nos dias 7 e 21, sendo o alelo C favorável e o G dominante.

Há relatos na literatura da interação entre SNPs nos genes *CAST* e *CAPN1* (MORRIS et al., 2006; CASAS et al., 2006), sendo que já foi observado epistasia entre eles (BARENDSE et al., 2007; PINTO et al., 2010).

#### **4.6.3. *KCNJ11* – Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J, membro 11**

No cromossomo 15 de bovinos está localizado o gene *KCNJ11*, o qual é composto por apenas um éxon e codifica uma proteína com 388 aminoácidos. Essa proteína atua no transporte de íons de potássio através da membrana da célula (Gene Ontology, [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

A inativação do gene em ratos por Alekseev et al. (2010) ocasionou em fenótipo magro mesmo quando os animais foram submetidos à dieta rica em gordura. Atribuiu-se esse fato à perda de função do canal de KATP, fazendo com que reduzisse o depósito de glicogênio pelo músculo.

Em humanos o gene vem sendo amplamente estudado porque ele está intimamente ligado a diabetes *melitus* tipo II, e sua inativação pode estar envolvida com outros tipos de diabetes também. Esse gene é conservado entre bovinos, humanos e camundongos (Homologene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/homologene/441>).

Em estudos com bovinos da raça Charolês, Bernard et al. (2009) encontraram que o perfil de expressão desse gene, junto com outros 8, explicou grande parte da variabilidade na massa muscular e do conteúdo de lipídeos intramuscular (60% e 52%, respectivamente).

Em estudos no laboratório de Biotecnologia Animal na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, o gene *KCNJ11* foi sequenciado em animais da raça Nelore (dados não publicados), e encontrou-se grande número de SNPs os quais podem ser incluídos em estudos de associações com características de carcaça, tendo em vista o processo biológico em que ele está inserido.

#### **4.6.4. Obese – Gene codificador da leptina**

A leptina é uma proteína hormônio que contém 167 aminoácidos, produto sintetizado pelo gene *obese*, o qual foi mapeado no cromossomo 4 em bovinos (STONE et al., 1999). Predominantemente secretada pelos adipócitos brancos (NKRUMAH et al., 2005), a leptina alcança os receptores do hipotálamo, promovendo a redução do consumo de alimento e aumentando o gasto de energia e assim, influencia a deposição de gordura e o ganho de peso diário (KONONOFF et al., 2005).

Em alguns estudos a concentração de leptina no soro foi associada com deposição de tecido adiposo na carcaça e marmoreio em animais mestiços Red Angus e Charolês (GEARY et al., 2003). Outros cientistas associaram polimorfismos contidos no éxon 2 com características de qualidade de carne e de carcaça (NKRUMAH et al., 2004; SCHENCKEL et al., 2005).

O polimorfismo R25C, caracterizado por uma transição de citosina para timina, resulta na substituição de aminoácido arginina por cisteína. Essa substituição foi associada com a deposição de gordura subcutânea em bovinos (KONONOFF et al., 2005; NKRUMAH et al., 2005; SCHENCKEL et al., 2005; WU et al., 2005; FORTES et al., 2009)

Ao estudar cinco polimorfismos contidos no gene codificador da leptina em animais cruzados (Angus, Charolês, Limosin e Simental), Schenckel et al. (2005) encontraram associações de dois desses SNPs com produção de gordura e de carne magra, além de encontrarem interação entre os dois na maciez da carne ( $P < 0,01$ ). Anton et al. (2011) encontraram o genótipo TT apresentando maior porcentagem de gordura no músculo do que os demais genótipos. Todas essas associações podem ser explicadas em parte pelos estudos de Orrú et al. (2011), no qual polimorfismos presentes na região codificadora do gene *obese* afetam a desnaturação de ácidos graxos monoinsaturados.

Pelo exposto, é importante compreender completamente as atividades biológicas da leptina e suas influências nas características de importância econômica para a agropecuária, como a deposição de gordura subcutânea e o grau de marmoreio.

#### **4.6.5. *DGAT1*- Diacilglicerol O-aciltransferase**

O gene *DGAT1* foi considerado forte candidato a explicar um QTL mapeado na região centromérica do cromossomo 14 em bovinos, com efeito no marmoreio da carne (THALLER et al., 2003; MOORE et al., 2003). Esse gene codifica a enzima aciltransferase CoA:diacilglicerol, que é fundamental na síntese de triglicerídeos.

Polimorfismos nesse gene foram associados à marmorização (THALLER et al., 2003). Grisart et al. (2002) identificaram o SNP K232A no início do éxon 8 que resulta na substituição de lisina por alanina. Essa substituição não conservativa foi apontada por influenciar a produção e porcentagem de gordura no leite de vacas. O genótipo AA, contendo uma lisina, apresenta maior produção de gordura.

Em relação ao conteúdo de gordura intramuscular, Anton et al. (2011) encontraram que o genótipo AA/AA resultou em maiores valores. O teor de marmoreio da carne varia entre indivíduos, sendo que os zebuínos apresentam teor reduzido (SHACKELFORD et al., 1991), o que lhes confere uma carne menos suculenta e menos macia.

#### **4.6.6. *IGFBP3* - *Insulin-like growth factor binding protein 3***

O gene *IGFBP3* é composto por 7 éxons, está localizado no cromossomo bovino 4 e seu produto é uma proteína que se associa com alta afinidade às IGFs (fator de crescimento semelhante à insulina). Essa associação afeta a atividade do IGF aumentando ou diminuindo sua habilidade de ligar a seus receptores (DAYTON et al., 2008).

O IGF é um fator que regula o crescimento, a diferenciação e a manutenção da função diferenciada de inúmeros tecidos (LI et al., 2004). São componentes do sistema IGF as proteínas ligantes, as IGFBPs, que variam em 6

formas conhecidas e proteases que podem alterar a afinidade de IGF – IGFBPs (GIBSON et al., 1999).

Por estar localizado em uma região do cromossomo 4 dos bovinos que contém um QTL para marmoreio, esse gene é um forte candidato para ser testado em relação a essa característica. Esse gene foi pouco estudado em bovinos. Veneroni (2010) não encontrou associação significativa entre o gene e a característica em animais da raça Canchim. Mais estudos em diferentes raças e populações são necessários para comprovar esses achados.

#### 4.7. Expressão gênica

O genótipo e o fenótipo são interligados pela expressão dos genes, ou seja, a conversão do genótipo em fenótipo é mediada pela tradução do gene em proteína, e esta, por sua vez, irá atuar na caracterização e função das células, resultando no fenótipo. Portanto, variações na expressão gênica resultam em diversidade fenotípica, que é a base genética da evolução (WRAY et al., 2003). Já em 1975, King e Wilson afirmaram em seus estudos que as mudanças evolutivas são principalmente resultados das alterações nos mecanismos de controle da expressão gênica do que nas proteínas.

Como exemplo de que a variação da expressão gênica é a base genética da evolução, Oleksiak et al. (2002) estudaram a expressão de indivíduos pertencentes a uma mesma população de peixes do gênero *Fundulus*, ou seja, desenvolvidos no mesmo ambiente e sob as mesmas condições, e encontraram diferença de aproximadamente 18% na expressão dos genes entre os indivíduos. Além disso, Townsend et al. (2003) verificaram a existência de variação na expressão gênica em escala genômica em populações naturais de *Saccharomyces cerevisiae*. Em bovinos, animais com alto potencial de crescimento muscular apresentaram genes com diferentes perfis de expressão em relação a animais com baixo potencial (BERNARD et al., 2009)

Em geral, o estado natural dos genes em eucariotos é desativado, e são expressos quando necessários em determinados tecidos, condições ambientais ou em alguns estágios do desenvolvimento (LANDE-DINER et al., 2007). A regulação da expressão pode ser por meio de mecanismos como condensação da cromatina, metilação do DNA, regulação da iniciação da transcrição, *splicing*

alternativo, estabilidade do mRNA, controle da tradução, além de modificações pós-transcricionais e degradação das proteínas, e assim, entre outros benefícios, a célula evita gastos desnecessários. Contudo, o mecanismo de regulação gênica mais utilizada é o controle do início da transcrição (LEMON; TJIAN, 2000). Os genes são transcritos pelo complexo da holoenzima RNA polimerase, e essa maquinaria é estruturada no promotor basal (ORPHANIDES et al., 1996), o qual contém um elemento chamado TATA box, localizado aproximadamente 25 a 30 pares de base na direção 5' do sítio de início da transcrição. O TATA box é o sítio onde se liga a primeira proteína, a TBP (*TATA box Binding Protein*), que se associa ao fator TAF (do inglês *Transcriptional Associated Factors*) o qual guia a enzima RNA polimerase e seu complexo para se ligarem ao DNA, dando início ao processo de transcrição (LEE et al., 1997). Os fatores de transcrição (FT) e cofatores compõem o complexo da holoenzima RNA polimerase, interagindo com o promotor.

O perfil total da expressão gênica é resultado de uma somatória de eventos que ocorrem para iniciar a transcrição do gene alvo. A posição relativa ao promotor, a orientação e a sequência de nucleotídeos dos sítios de ligação dos TBP, TAF, FT e cofatores, assim como o perfil de expressão desses fatores são exemplos desses mecanismos.

#### **4.7.1. Epigenética**

Eventos epigenéticos são informações reversíveis introduzidas nos cromossomos que alteram a expressão dos genes, e conseqüentemente o fenótipo, sem modificar a sequência de nucleotídeos (KENDREW, 1994). Os eventos epigenéticos mais conhecidos são modificações das histonas e metilações do DNA (GREGORY et al., 2001).

A cromatina dos organismos eucariotos é composta pela eucromatina e a heterocromatina. Na eucromatina, as histonas são responsáveis por moldar a estrutura da cromatina e precisam sofrer modificações para permitir o acesso da maquinaria transcricional. Domínios de heterocromatina possuem estrutura condensada de tal forma a impedir o acesso do complexo da RNA polimerase II (LI et al., 2011). As modificações na estrutura da cromatina ocorrem por meio de alterações nas histonas (GUILLEMETTE et al., 2011), o que resulta na transição entre os estados ativo e inativo da transcrição da cromatina, influenciando a

expressão dos genes. Portanto, as modificações nas histonas podem interferir em processos biológicos fundamentais, sendo herdados de maneira não mendeliana (JENUWEIN; ALLIS, 2001; KOUZARIDES, 2007; GUILLEMETTE et al., 2011).

A metilação do DNA pode resultar em *imprint* genômico, no qual a atividade transcricional do gene é dependente da origem parental do alelo (MORISON et al., 2001; SLEUTELS et al., 2000), mediado por metilação do DNA, ocasionando expressão monoalélica, de acordo com a origem parental (MORISON et al., 2001; SLEUTELS et al., 2000; ZAINTOUN; KHATIB, 2008).

#### **4.7.2. Expressão alélica específica**

Segundo as leis da genética mendeliana, alelos paternos e maternos apresentam expressão e funções iguais em células somáticas. São conhecidos, no entanto, padrões de expressão que contradizem essa afirmação, caracterizados pela expressão de apenas um alelo, ou quando ambos são expressos, mas em níveis diferentes.

A diferença de expressão entre os alelos de um gene pode ser devido a polimorfismos distintos presente em cada alelo, mas que seguem as leis da herança mendeliana, ou então, essa variação pode estar relacionada a eventos epigenéticos que fogem às regras Mendelianas (YAN; ZHOU, 2004).

A expressão alelo específica parece estar amplamente e proporcionalmente distribuída no genoma humano (LO et al., 2003; CHEUNG et al., 2003; PALACIOS et al., 2009), e esse padrão pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento ou do tecido (KHATIB, 2005).

Em bovinos, pouco havia se estudado sobre esse mecanismo devido ao escasso conhecimento sobre as sequências dos genes, no entanto, na última década, grandes avanços na área do genoma bovino (*Bovine Hapmap Consortium*, 2009) permitiram ampliar o leque de genes conhecidos como *imprinted* nessa espécie.

#### 4.7.2.1. *Imprinting* genômico

O *imprinting* genômico é resultado da metilação do DNA em domínios com alta concentração de citosina-fosfato-guanina (CpG), o que pode silenciar parcial ou completamente a expressão do gene. Esse mecanismo tem início durante a gametogênese, estágio no qual a marca do *imprint* é removida nos gametas e posteriormente restabelecida de acordo com a origem parental do alelo, e então são transmitidos aos descendentes (REIK; WALTER, 2001).

Existe uma teoria para o surgimento do *imprinting* genômico descrita com base em estudos genéticos de sequências de origem externa ao organismo, como por exemplo, elementos repetitivos parasitários ou transgenes. Esses elementos são desligados por modificações epigenéticas como uma defesa do organismo (SUZUKI et al., 2007). A partir desse conhecimento, o *imprinting* genômico seria a evolução de uma adaptação do sistema de defesa do hospedeiro que apresentou vantagem seletiva e então essa metilação se estendeu aos genes vizinhos (ONO et al., 2001). Essa teoria é sustentada por estudos com o gene PEG10, derivado de retrotransposons, que é expresso paternalmente em camundongos (ONO et al., 2001; SUZUKI et al., 2007).

O primeiro catálogo de genes *imprinted* e de efeito de origem parental foi publicado em 1998 por Morison e Reeve. Desde então, efeito de origem parental sobre a expressão alélica vem sendo amplamente estudado em humanos e camundongos (MORISON et al., 2001; LO et al., 2003; KHATIB, 2007; PALACIOS et al., 2009), porém pouco se sabe sobre esses efeitos em bovinos. Isso fica claro quando se acessa o banco de dados de genes *imprinted* e de efeitos de origem parental (<http://www.otago.ac.nz/IGC>; MORISON et al., 2001). Cerca de 309 genes de humanos e 194 de camundongos já foram catalogados nessa base de dados, apresentando ou não efeito de origem parental, enquanto esse número diminuiu drasticamente para 32 em bovinos e 20 em ovinos.

Em mamíferos, alguns genes *imprinted* desempenham papel importante no crescimento e desenvolvimento (VAN LAERE et al., 2003; CHENG et al., 2008). O gene IGF-2 (*Insulin-like growth-factor 2*) foi um dos primeiros genes descrito como *imprinted* em diversos mamíferos, sendo a cópia materna inativa (JEON et al., 1999). Esse gene já foi associado com características quantitativas de desempenho em animais de produção, como crescimento muscular em suínos (VAN

LAERE et al., 2003) e área de olho de lombo em bovinos (GOODALL; SCHMUTZ, 2007).

Os genes *PI* (KHATIB, 2005), *TSSC4*, *PEG10* (ZAITOUN; KHATIB, 2008) e *NESP55* (KHATIB, 2004) são conhecidos como *imprinted* em bovinos, enquanto *CD81*, *OBPH1*, *ASB4*, *HTR2A* (ZAITOUN; KHATIB, 2008), *COPG2*, *DCN* e *SDHD* (KHATIB, 2005) foram estudados e classificados como genes de expressão bialélica.

#### **4.7.2.2. Expressão alélica preferencial (EAP)**

Existem casos em que genes *imprinted* apresentam expressão de ambos alelos, paterno e materno, mas em níveis diferentes de mRNA e de acordo com a origem parental do alelo (KHATIB, 2007). Esse padrão de expressão de genes *imprinted* é denominado expressão alélica preferencial (EAP).

Muitos genes descritos como *imprinted* foram reavaliados, devido à descoberta de que muitos deles apresentam EAP, de acordo com a origem parental do alelo, ao invés de expressão monoalélica (KHATIB et al., 2007). Khatib et al. (2007) estudaram o perfil de expressão de 50 genes de camundongos e humanos intitulados *imprinted* em estudos anteriores, e observaram que, desse total, apenas 24 apresentaram expressão monoalélica exclusiva, sendo que 26, portanto, foram reclassificados como genes com expressão alélica preferencial.

#### **4.7.2.3. Expressão alélica diferencial (EAD)**

Genes não-*imprinted* também podem apresentar expressão alélica específica, nesse caso conhecida como expressão alélica diferencial (EAD), a qual se refere a uma variação alélica na expressão gênica, envolvendo variação fenotípica, mas sem relação com a origem parental (KHATIB, 2007).

A expressão gênica alelo específica é relativamente comum em genes não-*imprinted* humanos e está distribuída amplamente no genoma e em processos biológicos. É um fator importante para a variabilidade fenotípica humana, apresentando influência sobre o desenvolvimento de doenças, razão pela qual vem sendo amplamente estudada nessa espécie (YAN et al., 2002; LO et al., 2003; PALACIOS et al., 2009).

A EAD é uma característica herdada de maneira mendeliana (YAN et al., 2002; PASTINEN; HUDSON, 2004; KURREEMAN et al., 2004) que pode ser resultado de variações em elementos regulatórios de DNA que atuam de forma CIS (MORLEY et al., 2004; PASTINEN; HUDSON., 2004).

Por exemplo, Wang et al. (1995) identificaram em algumas pessoas tolerantes à lactose que um dos alelos apresentava níveis de expressão muito baixos no intestino do que o outro, e essa diferença era coordenada por elementos regulatórios CIS e implicava em atividade intermediária da proteína lactose.

Um indivíduo heterozigoto para um polimorfismo que afeta de maneira CIS a transcrição do gene poderá apresentar níveis de expressão diferentes de mRNA (BRAY et al., 2003). Esses SNPs podem estar presentes em elementos regulatórios localizados no 5'UTR, ou em éxons, íntrons e regiões regulatórias 3'UTR (PARKER-KARTIRAEI et al., 2008).

Polimorfismos presentes em sítios alvo de micro RNAs (miRNA) podem influenciar a atuação do miRNA na regulação da tradução do mRNA (SUN et al., 2011). Esses elementos apresentam, em sua maioria, função de ligar à região 3' UTR e assim regular a expressão do gene (MCDANEL, 2009). Sun et al. (2011) atribuíram a responsabilidade da EAD do gene UGT2B15 a um SNP na região 3'UTR, como sendo um provável sítio alvo de miRNA, visto que eles verificaram que a EAD não era resultante de outros mecanismos como gênero e estágio de desenvolvimento.

#### **4.7.3. Prospecção de expressão alelo específica e sua aplicação no Melhoramento Animal**

A existência de expressão alelo específica pode ser verificada com a utilização de métodos de discriminação alélica, adotando um SNP como marcador para distinguir os transcritos derivados de cada alelo. A análise feita em um indivíduo heterozigoto compara a expressão entre os alelos de cada indivíduo, assim cada alelo atua como controle interno para o outro, eliminando a influência ambiental (YAN et al., 2002; BRAY et al., 2003, LO et al., 2003, PALACIOS et al., 2009).

Essa metodologia pode ser colocada em prática com a utilização de ensaios de discriminação alélica *TaqMan*<sup>®</sup> (LO et al., 2003; PALACIOS et al., 2009; NICIURA et al., 2012) e *SnapShot*<sup>®</sup> (PARKER-KATIRAEI et al., 2008) ambos da

*Applied Biosystem*. Além de poder ser aplicado em larga escala para compreender a distribuição genômica da variação na expressão alélica (LO et al., 2003; PALACIOS et al., 2009), lançando mão de arranjos de oligonucleotídeos.

Estudos recentes têm discutido as consequências da origem parental em programas de melhoramento e seus efeitos nas características quantitativas (PATTEN; HAIG, 2008; SPENCER, 2009) tentando entender como esses efeitos podem ser incorporados nos modelos (KONING et al., 2000; SPENCER, 2009).

A epigenética pode contribuir ao melhoramento animal por meio da elucidação da falta de explicação para resultados de casualidade e herdabilidade de caracteres complexos e doenças. Isso removerá o ruído existente na equação de decomposição do fenótipo (modelo infinitesimal) de maneira a aumentar a acurácia na estimativa dos parâmetros (GONZÁLEZ-RECIO, 2012).

É esperado que genes *imprinted* afetem os modelos estatísticos usados no melhoramento animal por causarem diferenças entre valores genéticos de fêmeas e machos, e produzirem desvios em efeitos genéticos aditivos e não aditivos (PATTEN; HAIG, 2008).

Assim, em caso de genes *imprinted*, a geração F1 se assemelhará ao progenitor do qual herdou o alelo funcional (SPENCER, 2009), ou o alelo mais expresso, no caso de genes não-*imprinted* com expressão alelo específica. Em características de carcaça, o *imprint* já foi demonstrado contribuir significativamente para a variância genética com proporções de 8 a 25% da variância genética aditiva total (NEUGEBAUER et al., 2010).

A escassez de estudos envolvendo efeitos de origem parental na expressão gênica e a denominação errônea de alguns genes como *imprinted* (KHATIB et al., 2007) têm justificado estudos que objetivam compreender melhor esses mecanismos epigenéticos.

Alguns genes associados com características de importância econômica apresentam expressão alelo específica. O gene que codifica a leptina apresenta controle da expressão tecido específica por meio da metilação do DNA (KREMENSKOY et al., 2006) e apresentou efeito de origem parental em tecidos bovinos fetais (NICIURA et al., 2012). Para o gene *DGAT1* foi relatado efeito de origem parental sobre a produção de leite (KUEHN et al., 2007) porém, em tecidos fetais de bovinos de corte, Niciura et al. (2012) não encontram efeito de origem parental nesse gene, por isso seria importante analisar em tecidos adultos. Também

existem estudos de efeitos de origem parental em QTLs relacionados a características de interesse econômico em animais de produção (NEZER et al., 1999; VAN LAERE et al., 2003; MORISON et al., 2001). Em relação ao gene *CAST*, fetos GG apresentaram o dobro da expressão observada em músculo de animais AG, demonstrando a existência de expressão alelo específica independente da origem parental (NICIURA et al., 2012).

As informações obtidas nos estudos de associação de polimorfismos com características de qualidade da carne e na verificação do padrão da expressão podem ser posteriormente combinadas em programas de seleção para aumentar a precisão na escolha dos animais com potencial genético para formar o grupo de progenitores (RUVINSKY, 1999; SPENCER, 2009; MAGEE et al., 2010).

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Animais**

#### **5.1.1. Touros**

A seleção dos touros para comporem a população dos progenitores 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, 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. Características fenotípicas não foram utilizadas como critério para escolha dos touros.

#### **5.1.2. Novilhos**

A criação dos animais utilizados, assim como sua produção e avaliação

fenotípica, foram realizadas no âmbito do projeto em rede Bife de Qualidade (BifeQuali) – Projeto Componente: “Genética quantitativa e molecular de características de qualidade da carne e de eficiência alimentar na raça Nelore”, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Para a realização deste experimento foram produzidos 635 novilhos machos, em duas estações de monta (2007 e 2008), descendentes dos touros registrados da raça Nelore, compondo famílias de meios-irmãos produzidas através de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Os animais foram criados na Embrapa Pecuária Sudeste e na Embrapa Gado de Corte, localizadas, respectivamente, na Fazenda Canchim em São Carlos e no município de Campo Grande-MS, além de propriedades particulares do Estado de Mato Grosso do Sul. O projeto BifeQuali foi composto por três safras de confinamento, porém os animais utilizados neste trabalho foram confinados e abatidos nas duas primeiras safras. Em cada safra os confinamentos ocorreram simultaneamente nas duas unidades da Embrapa, nas quais os animais foram avaliados para características de eficiência alimentar, crescimento e deposição de gordura. Após cerca de 100 dias de confinamento, e posteriormente abatidos em frigorífico.

### **5.1. Coleta das amostras de DNA, extração e quantificação do DNA**

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue dos novilhos, por punção da veia jugular, em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA potássico (K3). As amostras foram mantidas refrigeradas até o início do processo de extração.

Os protocolos utilizados nos processos de extração de DNA a partir de leucócitos do sangue e de sêmen são adaptações daqueles descritos em Regitano (2001).

#### **Extração de DNA de amostras de sangue dos novilhos**

Para obtenção de leucócitos, as células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (10 mM de Tris-HCl pH 7,6, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 10 mM de NaCl) com posterior centrifugação (700 g, 10 min) e descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por três vezes ou até a obtenção de um precipitado branco.

As células brancas do sangue foram ressuspensas em 500 µL de

uma solução composta por 10 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8,0, 100 mM de NaCl, 0,5% de SDS, 2 µg de proteinase K, e então incubadas a 55°C até a dissolução do pellet (por 4 a 6 horas ou durante a noite). Após a incubação adicionaram-se 240 µl NaCl 5M e 210µl de TE (10 mM de Tris HCl pH 7,6 e 1 mM de EDTA pH 8,0). Por inversão dos tubos, o material foi agitado até formar pequenos coágulos de proteína e centrifugado por 15 minutos a 16.000 g, promovendo a precipitação das proteínas.

O sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto gelado. Logo em seguida, foi lavado com etanol 70% gelado e, então secado em capela de fluxo laminar. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em 250 µl de solução TE + RNase (10 µg por ml de amostra) e incubado por uma hora a 37°C. Ao final do procedimento, as amostras foram armazenadas em freezer.

#### Extração de DNA de amostras de sêmen dos touros

Para a extração de DNA das amostras de sêmen, as palhetas foram descongeladas em microtubos de 1,5 ml, centrifugadas por 8 minutos a 5.000 g e os sobrenadantes descartados. O pellet, de cada amostra, foi lavado 4 vezes em 1 ml de solução PBS 1X pH 7,0 (2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM de NaCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). A seguir ressuspendeu-se o *pellett* em 100 µl de PBS 1X e foram adicionadas 400 µl de solução de lise (2% de 2-mercaptoetanol, 10 mM de Tris.HCl pH 8, 100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA pH 8.0 e 0,5% de SDS). Posteriormente foi incubado por 30 minutos a 50°C, a proteinase-K (200 µg/mL) foi adicionada, e as amostras foram vortexadas e incubadas por 16 horas a 50°C.

Para a precipitação das proteínas com sal, adicionou-se 90 µl de TE e 160 µl de NaCl 5M. Os tubos foram agitados por inversão, incubados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 16.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, acrescentando-se 1 ml de etanol absoluto a cada tubo, os quais foram agitados por inversão e centrifugados a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet lavado com etanol 70% e centrifugado a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet seco, ressuspendido em 100 µl de TE + RNase e incubado por 1 hora. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

### Quantificação do DNA

Para a análise da concentração e da pureza (razão absorvância  $A_{260}/A_{280}$ ) do DNA extraído, utilizou-se o NanoDrop<sup>®</sup>. Esse espectrofotômetro é sensível, conseguindo mensurar a concentração de uma amostra pequena (1µL a 2µL) e apresenta uma cobertura de 220 a 750 nm.

Sabendo-se que as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm, a relação  $A_{260}/A_{280}$  fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos e, valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína.

Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água para se obter uma concentração final de 40 ng/µl e conservadas em freezer – 20 C°.

## 5.2. Genotipagem dos polimorfismos

Os genes e os respectivos polimorfismos estudados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Localização e características de polimorfismos nos genes *CAPN1*, *CAST*, *DGAT1*, *KCNJ11*, *IGFBP3* e leptina, sequências no GenBank.

Gene	Gene ID	Localização	BTA	região	SNP	aminoácido
<i>CAPN1</i> <sup>a</sup>	281661	3379pb	29	éxon 5	G>A	-
<i>CAST</i> <sup>b</sup>	281039	2655 pb	7	30/3'UTR	A>G	-
<i>DGAT1</i> <sup>c</sup>	282609	707 e 708 pb	14	éxon 8	GC>AA	Lisina>Alanina
<i>KCNJ11</i> <sup>d</sup>	532060	2126 pb 2942 pb*	15	éxon 1 3'UTR	T>C C>T	- -
<i>IGFBP3</i> <sup>e</sup>	282261	4394 pb	4	éxon 4	T>C	Triptofano>Arginina
<i>Leptina</i> <sup>c</sup>	280836	120 pb	4	éxon 2	C>T	Arginina>Cisteína

<sup>a</sup>PAGE et al., 2002; <sup>b</sup>MORRIS et al., 2006; <sup>c</sup>WU et al., 2005; <sup>d</sup>ALEKSEEV et al., 2010; <sup>e</sup>VENERONI et al., 2010.\*SNP foi utilizado apenas na expressão.

a) *Touros*: as genotipagens dos SNPs contidos nos genes *CAST*, *DGAT1* e leptina foram realizadas em estudos simultâneos no laboratório da Embrapa Gado de Corte (sob responsabilidade da pesquisadora Fabiane Siqueira) através da técnica de PCR-RFLP.

Os genes *IGFBP3*, *CAPN1* e *KCNJ11* foram genotipados nos touros por discriminação alélica em PCR em tempo real, no equipamento Tempo Real 7500 (*Applied Biosystems*), a partir do DNA extraído de sangue e sêmen.

b) *Novilhos*: para todos os genes foi utilizado o sistema de discriminação

alélica em PCR em tempo real.

O sistema *TaqMan*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*) foi a ferramenta utilizada para a discriminação alélica em PCR em tempo real. Os *primers* que amplificam a região genômica de interesse e as sondas que permitem a identificação das variantes alélicas foram construídos pelo serviço *Assay-by-Design* (*Applied Biosystems*) e suas sequências encontram-se descritas na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas com 2,5µl de *TaqMan*<sup>®</sup> PCR *Genotyping Master Mix* (*Applied Biosystems*) 1X, 0,125 µl de ensaio *TaqMan*<sup>®</sup> 1X contendo 0,9 µM de cada *primer* e 0,25 µM de cada sonda *TaqMan*<sup>®</sup> e 15 ng de DNA genômico, exceto para os genes *CAPN1* e *KCNJ11* para os quais foram usados 7 ng de DNA, em reação final de 5 µl. O início da reação ocorreu com incubação a 50°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C por 10 min, seguidas por 40 ciclos de 95°C por 30 s e 60°C por 45s.

**Tabela 2.** Sequências (5'-3') dos *primers* e das sondas utilizados para a genotipagem dos polimorfismos nos genes *CAPN1*, *CAST*, *DGAT1*, *KCNJ11*, *IGFBP3* e leptina.

Gene	Primers (F e R)	Sondas*
<i>CAPN1</i>	AGCTACGAGGCCCTCTCA TTGCGCAGCTCGTACCA	VIC-AGGCAGCACGCTCTGA (G) FAM-AGGCAGCACATCTGA (A)
<i>CAST</i>	TTTGACATTCTCCCCACAGT CGTGAGGCATCGTTTTCCAAATG	VIC-AATAAGTGCAAATTGAAAAT (T) FAM-AGTGCAAATCGAAAAT (C)
<i>DGAT1</i>	GGCCAAGGCCAAGGCT CGCGGTAGGTCAGGTTGTC	VIC-TTGGCCGCCTTACCT (GC) FAM-CGTTGGCCTTCTTACCT (TT)
<i>KCNJ11</i> *	CCCAGCCTGCTGGATGT CCACGGTGCGCTTGC	VIC-CCTGACCCTTGTCCGC (T) FAM-CTGACCCTCGTCCGC (C)
<i>IGFBP3</i>	GAAGCCTGATGTGATGTCCTATGG CAGGAAGGCACGGGTGTATAA	VIC-TCCCATGTTGGACCC (T) FAM-CCATGTGGACCC (C)
Leptina	CTTTGGCCCTATCTGTCTTACGT TCTTGATGAGGGTTTTGGTGCA	VIC-CATCTGCAAGGTC(T) FAM-CATCCGCAAGGTC (C)

\*Identificação dos fluoróforos (VIC ou FAM), do alelo específico para a sonda e do sítio de anelamento ao SNP; *KCNJ11* SNP2126 pb.

Os genótipos foram obtidos a partir dos arquivos de saída e imagens do software SDS do equipamento Tempo Real 7500. O software genotipa os animais de acordo com a captação da fluorescência emitida na amplificação em tempo real de cada alelo.

#### 5.4. Sequenciamento

Foi realizado sequenciamento de amostras representativas dos três

genótipos do gene *CAST* que haviam sido genotipadas por ensaio *TaqMan*<sup>®</sup>, para confirmar os genótipos e a eficiência do ensaio. Para tanto, os *primers* (Tabela 3) foram desenhados com auxílio do software *primer3plus*, disponível na web (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Verificou-se a qualidade dos *primers* pelo software OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Foram escolhidos os melhores pares de *primers* desenhados, ou seja, os pares que apresentaram  $\Delta G$  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 600pb.

Também realizou-se o sequenciamento dos éxons do gene *CAPN1* com o intuito de encontrar um polimorfismo que apresentasse distribuição satisfatória de ambos os alelos e por fim pudesse ser utilizado na análise de expressão alélica. Ao todo, foram desenhados 14 pares de *primers* (Tabela 3) para sequenciamento a partir da sequência depositada no banco de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

**Tabela 3.** *Primers* utilizados para o sequenciamento de fragmentos do gene *CAPN1* e *CAST*, tamanho do produto de amplificação.

gene	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto em pb	Temperatura de anelamento
<i>CAST</i>	CAST3UF_Seq	TTG CCT TCA GTT GGG AGA GA	422	57°C
	CAST3UR_Seq	ACAAGGTGCGGAAGTCCTAA		
<i>CAPN1</i>	1F	GGG GAC TAC TCT GCC TTT GA	528	57°C
	1R	AGC TTG GGG GCT GAT AAG T		
<i>CAPN1</i>	2F	AGT GAA GAG GTG GGG AAA CC	518	56°C
	2R	TCC TGC AAG AGA CCC AGA GT		
<i>CAPN1</i>	3F	CCT GAG TGA GGA GTG GGA AT	554	56°C
	3R	ACT CCT TGT CCA AGG TGC AT		
<i>CAPN1</i>	4F	GGG ATC TCA AAG CAG GGA TT	509	56°C
	4R	GAT GGT GTG AGG CAA AGG AC		
<i>CAPN1</i>	5F	CCC CTC ACC AGC AGT ATC AT	361	56°C
	5R	TCC CTG GGA GAT AGG AAG GT		
<i>CAPN1</i>	6F	AGG CTT CTC AGC TGT GCT TC	417	56°C
	6R	CCA GTC CCA GGG GTT ATC TT		
<i>CAPN1</i>	7F	CCA GGG AAG GAC AGG CCC CA	522	64°C
	7R	ACC CCA CTC CCC AGG TCA CC		
<i>CAPN1</i>	8F	CGG TGG ACC CAG TGA TAC TT	496	56°C
	8R	TCA CTC ACT ATC CGC CTC CT		
<i>CAPN1</i>	9F	CAG CCT TTG GGT GAC TGA AC	527	56°C
	9R	TTG CTG GCT AGA GAC CAA GA		
<i>CAPN1</i>	10F	AGG AAG CGA GCA ATG TGA CT	560	56°C
	10R	TTG CTG GCTA GAG ACC AAG A		
<i>CAPN1</i>	11F	CCC TCA TCA TTG GGC TGT AT	543	56°C
	11R	GGA CTC TGA AAG GCA GTG GA		
<i>CAPN1</i>	12F	CTG CAC TTC CTT CCC TTC TG	430	56°C
	12R	GAA CTG GCC TGT CCA CAT CT		
<i>CAPN1</i>	13F	TAC TCA CTC ACC CAG CGT CT	553	64°C
	13R	ACT TCA CCA CCA CTG CCA TC		
<i>CAPN1</i>	14F	TTC TGG GTC CTC AAG CTT TC	549	64°C
	14R	CGG GTG AGA AAA ACC CAC T		

As concentrações dos reagentes para PCR específicas dos *primers* estabelecidas após testes foram: tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,165 µM de cada *primer*, 0,65 U da enzima Taq DNA polimerase e 80 ng de DNA. A temperatura de amplificação estabelecida para cada par de *primer* está na Tabela 3. Água miliQ autoclavada foi adicionada para completar o volume final de

15  $\mu$ L.

A amplificação iniciou-se com 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 à 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. A qualidade dos *amplicons* dos segmentos dos gene estudados foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2,0%.

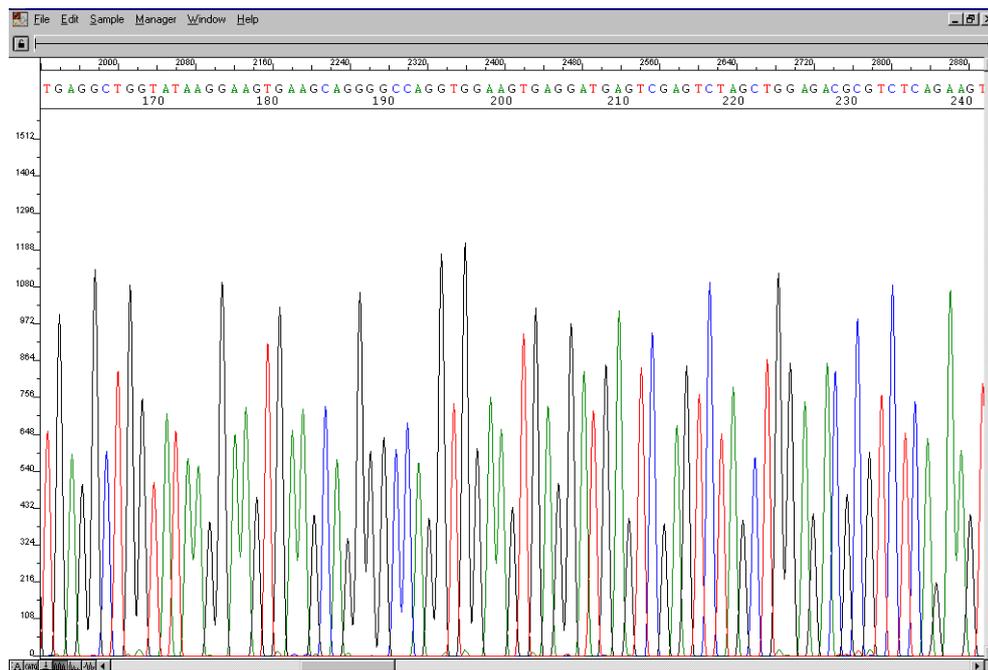
As reações de PCR foram purificadas através do kit *ExoSap*. Para purificação foram adicionados 2  $\mu$ L de *ExoSAP* a 5  $\mu$ L de produto da PCR, a mistura foi colocada no termociclador durante 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C .

Para as reações de sequenciamento seguiu-se o protocolo adaptado por Regitano (2001) utilizando o *Kit ABI PRISM® BigDye terminator v. 3.1 cycle sequencing* da *Applied Biosystem*. Foram adicionados 5 $\mu$ L de água, 1  $\mu$ L de *BigDye* (que contém DNA polimerase, ddNTPs marcados e dNTPs), 1  $\mu$ L de tampão (Mg<sup>+2</sup> e Tris-HCl), 2 pmol de cada *primer* e 1  $\mu$ L de produto de PCR, sob as seguintes condições: pré-incubação a 94°C por 2 min e 25 ciclos a 96°C por 20 seg, temperatura de anelamento do *primer* por 10 seg e 60°C por 4 seg.

Os produtos de sequenciamento foram purificados para evitar que os reagentes não incorporados interferissem na leitura do sequenciamento. Para isso foram adicionados 26  $\mu$ L de isopropanol 65% à temperatura ambiente (TA), homogeneizados e incubados no escuro à TA por 15 min. Passado esse tempo, centrifugou-se por 25 min a 16.000 g em TA, e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados 150  $\mu$ L de etanol 70%, à TA, centrifugou-se por 10 min a 2250 g e o sobrenadante foi descartado (a lavagem com etanol 70% foi repetida duas vezes). As reações ficaram no escuro para secar durante 1 h e depois foram armazenadas em freezer (-20°C). Após a reação de sequenciamento, o produto da reação foi ressuspensionado em formamida. Foi então desnaturado, a 95 °C por 5 min, e resfriado a 4° C por 5 min. Posteriormente a placa foi submetida à eletroforese capilar no equipamento *ABI 3100 Avant* da *Applied Biosystems*. Utilizou-se o polímero POP6, capilar de 50 cm e tampão de corrida (*Applied Biosystem*) e aplicou-se uma voltagem de 15 kV.

Os eletroferogramas (Figura 1), gerados pelo software *GenScan* (*Applied Biosystems*), foram submetidos à análise de qualidade através do programa

*Phred* (EWING et al., 1998), que atribui um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Em seguida, as sequências foram submetidas ao programa de montagem *Phrap* (*Phragment Assembly Program*; EWING; GREEN, 1998; PROSDOCIMI et al., 2002), que agrupa as sequências organizando-as em *contigs*. A visualização das sequências geradas e, conseqüentemente, dos SNPs (Figura 2) foi realizada através do programa *Consed* (GORDON, et al., 1998; PROSDOCIMI et al., 2002). A presença de 2 picos no eletroferograma foi interpretada como um SNP.



**Figura 1.** Eletroferogramas gerados pelo sequenciador para posterior análise nos programas *Phred/Phrap/Consed*



Figura 2. Imagem da saída do programa *Consed* que permite a visualização dos SNPs

## 5.5. Extração e quantificação do RNA

O RNA foi extraído de amostras de gordura subcutânea ou de tecido muscular, coletados na posição correspondente ao contrafile na linha de abate. As amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

Os tecidos pulverizados em nitrogênio líquido foram destinados à extração de RNA com Trizol (Invitrogen). O tecido foi macerado em nitrogênio líquido. Para cada 50 a 100mg de tecido adicionou-se 1mL de Trizol e, seguida pela homogeneização em vórtex. Posteriormente, foram incubados por 5 min em TA, acrescentado de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e agitados por 15 seg. Realizou-se novamente incubação por 5 min em TA, e então centrifugou-se a 16.000  $\text{xg}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. A parte aquosa foi removida para um microtubo limpo, ao qual foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e homogeneizado. Foi incubado por 10 min em TA e depois centrifugado a 13.000  $\text{xg}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em 1 mL de etanol 75% (feito com água DEPC). Centrifugou-se a 10.500  $\text{xg}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min e, então, o pellet foi seco por 15 min à

TA. O pellet foi ressuspendido em água DEPC e mantido à 55°C por 10 min e, por fim, a integridade de RNA foi avaliada por eletroforese e a quantidade, em espectrofotômetro.

Após a extração, 1µg do RNA total foi destinado à transcrição reversa (RT) para obtenção de cDNA.

### 5.6. Síntese de cDNA (RT-PCR)

A produção do cDNA foi realizada a partir do RNA extraído dos tecidos, utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen). Para tanto, os componentes do *mix RNA/primer* (1 µg de RNA total, 1 µL de dNTP *mix* 10nM, 1 µL de OligodT 0,5 µg/µL, em volume 10 µL) foram descongelados e homogeneizados. Incubou-se o *mixRNA/primer* a 65°C por 5 min que depois foi resfriado em gelo por 1 min. Posteriormente preparou-se 10 µL do *mix* da reação (2 µL de Buffer RT 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase Out 40 U/µL e 1 µL de *SuperScript™ III RT* 200U/µl) o qual foi incubado a 50°C por 50 min. Então foi incubado novamente a 85°C durante 5 min e centrifugado. E, por fim, adicionou-se 1µL de RNase H, e incubou-se por 20 minutos a 37°C e estocou-se em freezer a -20°C.

### 5.7. Avaliação da expressão gênica alelo específica

A expressão de cada alelo foi determinada por PCR em tempo real a partir de amostras de cDNA de animais heterozigotos, filhos de touros homozigotos para cada SNP. Nessas análises foram utilizados os mesmos ensaios *TaqMan*<sup>®</sup> usados na genotipagem, no equipamento PCR em tempo real 7500 (*Applied Biosystems*), segundo metodologia descrita por Lo et al. (2003). Considerando que os *primers* e sondas utilizadas nas genotipagens foram os mesmos que os utilizados para a avaliação de expressão gênica, foi preciso desenhá-los em éxons e foram evitadas as junções éxon-éxon.

As condições de reação utilizadas foram as mesmas descritas nos procedimentos de genotipagem por discriminação alélica, com exceção da utilização do *TaqMan Universal PCR Master Mix* e foi feita em duplicata para o gene *CAST* e em triplicata para os demais.

Para cada gene alvo (*CAPN1*, *CAST* e *KCNJ11*), foi utilizado DNA genômico de dois animais homocigotos (AA e BB) cujos genótipos haviam sido confirmados por sequenciamento. O DNA genômico desses animais foi misturado nas seguintes proporções: 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 (alelo FAM :alelo VIC) com o intuito de construir uma curva padrão (Figura 6), de acordo com o método descrito por Lo et al. (2003).

Os ensaios *TaqMan*<sup>®</sup> foram conduzidos e os dados de intensidade de fluorescência foram exportados do software SDS.

É esperado que as fluorescências dos alelos em uma amostra de DNA genômico de um heterocigoto sejam as mesmas se não houvesse diferença no comportamento das sondas VIC e FAM. Portanto, a construção de uma curva padrão com DNA genômico em diferentes diluições irá dizer qual seria a razão esperada entre os alelos em cada proporção.

Para cada proporção de um dado gene, foi calculado o  $\log_2$  (intensidade de FAM/ intensidade de VIC) no último ciclo de PCR (ciclo 40). Foi gerada uma curva padrão (reta de regressão linear, Figura 7),  $y = a + bx$ , onde  $y$  é o  $\log_2$  intensidade FAM/ intensidade VIC de uma dada proporção,  $x$  é o  $\log_2$  da proporção,  $a$  é o intercepto e  $b$  é o *slope*.

Após definida a curva padrão, foi medida a expressão alelo específica dos animais para cada gene utilizando o mesmo procedimento, porém com cDNA. Então a razão do alelo na expressão gênica foi extrapolada interceptando o  $\log_2$  (intensidade FAM/ intensidade VIC) na curva padrão.

## 6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 6.1. Escolha dos animais extremos para o sequenciamento

Para a determinação dos animais com fenótipos extremos de maciez foram utilizados os resíduos do modelo obtido na análise de variância realizada para determinar as fontes de variação da característica, que foram realizadas pelo procedimento GLM do software SAS (SAS INSTITUTE INC., 2000). 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, amostrando assim variabilidade.

Foram escolhidos 14 animais de cada extremo para maciez.

## 6.2. Análise de TagSNP para os genes *KCNJ11* e *CAPN1*

No intuito de escolher os SNPs dos genes *KCNJ11* e *CAPN1* a serem investigados nas análises de associação e expressão alélica, buscou-se um *TagSNP*, ou seja, um SNP que apresentasse um padrão de desequilíbrio de ligação com outros SNPs contidos no gene de tal forma que sua genotipagem revelaria genótipos desses outros SNPs. O *TagSNP* foi determinado com base nos resultados de análise pelo programa *Haploview* (BARRETT et al., 2005), o qual mostra o padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs, o que torna possível a escolha do principal *TagSNP* e possibilita o estudo de diversos SNPs simultaneamente.

## 6.3. Análise estatística da expressão alélica diferencial

Para verificar se as diferenças de expressão entre os alelos foram significativas, certificou-se que as razões alélicas de intensidade de fluorescência da sonda apresentaram distribuição normal pelo teste D'Agostino executado no BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) e então foi aplicado o teste-t de Student de uma amostra com intervalo de confiança (IC) de 5%. Para tal, adotaram-se as seguintes hipóteses:

$H_0$  = média das razões é igual a zero (Hipótese Nula);

$H_1$  = média das razões é diferente de zero (Hipótese Alternativa).

Foi calculada a média das razões de expressão alélica e o IC para cada gene, se o número 1 estivesse contido dentro do IC então a hipótese nula seria aceita e, portanto, a razão seria considerada estatisticamente igual a zero e o gene não apresentaria expressão alélica diferencial. Caso o IC calculado não abrangesse o número 1, a hipótese nula seria rejeitada, ou seja, a razão seria estatisticamente diferente de 1 e o gene apresentaria expressão alélica diferencial. O teste-t foi executado no software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Nos casos em que 2 SNPs do mesmo gene foram estudados, a interação de ambos na expressão alélica também foi avaliada. Para isso separou-se os animais heterozigotos para um SNP em dois grupos, de acordo com o genótipo no segundo SNP (homozigotos e heterozigotos) e então o teste-t independente foi

aplicado a esses dois grupos.

#### **6.4. Análise de efeito de origem parental**

Após análise da expressão alélica, para os genes nos quais se encontrou diferença de expressão alélica, foi avaliado se a EAD era influenciada pela origem parental do alelo. Para tanto, os animais foram separados de acordo com a origem parental do alelo escolhido e aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) para um critério utilizando o software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

### **7. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **7.1. Gene *CAST***

O SNP g.2959A>G do gene *CAST*, que é uma transição de uma adenina para uma guanina na região não traduzida 3' (3'UTR) descrita por Barendse (2002), foi escolhido para ser genotipado na população por ter sido previamente associado com maciez e características sensoriais da carne em populações *B. taurus* (BARENDSE, 2002; CASAS et al., 2006; MORRIS et al., 2006), além de compor testes de DNA comerciais para maciez (VAN EENENNAM et al., 2007). O principal papel biológico do *CAST* é na regulação da proteína calpaína, que atua no amaciamento da carne no período *post-mortem* (GEESINK; KOOHMARIE, 1999).

##### **7.1.1. Frequências alélicas e genotípicas**

Em prévia análise das frequências do SNP no gene *CAST* na população dos touros (Dra. Fabiane Siqueira – comunicação pessoal), observou-se que o SNP era polimórfico, portanto compatível para o estudo de expressão. Na Tabela 4 estão dispostas as frequências alélicas e genotípicas para o SNP do gene *CAST* nas populações de Nelore. Na população da raça Nelore avaliada neste trabalho, o SNP se demonstrou bastante polimórfico, com MAF (alelo de menor

frequência) de 44,57% para o alelo A. As frequências encontradas neste estudo são diferentes daquelas obtidas por Morris et al. (2006), Casas et al. (2006) e Pintos e Corva (2011), principalmente quando esses autores avaliaram populações *B. taurus*.

**Tabela 4.** Frequências alélicas e genotípicas encontradas para o SNP A>G éxon30/3'UTR do gene *CAST* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.

População	Número animais	Frequências (%)				
		Genotípica			Alélica	
		AA	AG	GG	A	G
Touros	24	30,76	57,69	11,55	59,61	40,38
Progênie	184	17,39	54,35	28,26	44,57	55,43

Os resultados de frequências alélicas foram próximos daqueles obtidos por Curi et al. (2009), no qual o alelo A apresentou frequência de 55,7% em uma população de Nelore. Contudo, Casas et al. (2006) encontraram frequência mais baixa para o alelo G, sendo 28,1% em população *B. indicus* e 19,8% em populações *B. taurus*. Morris et al. (2006) e Pintos e Corva, (2011) encontraram frequências baixas para o alelo G em animais *B. taurus* (1 a 16% e 21,2%, respectivamente).

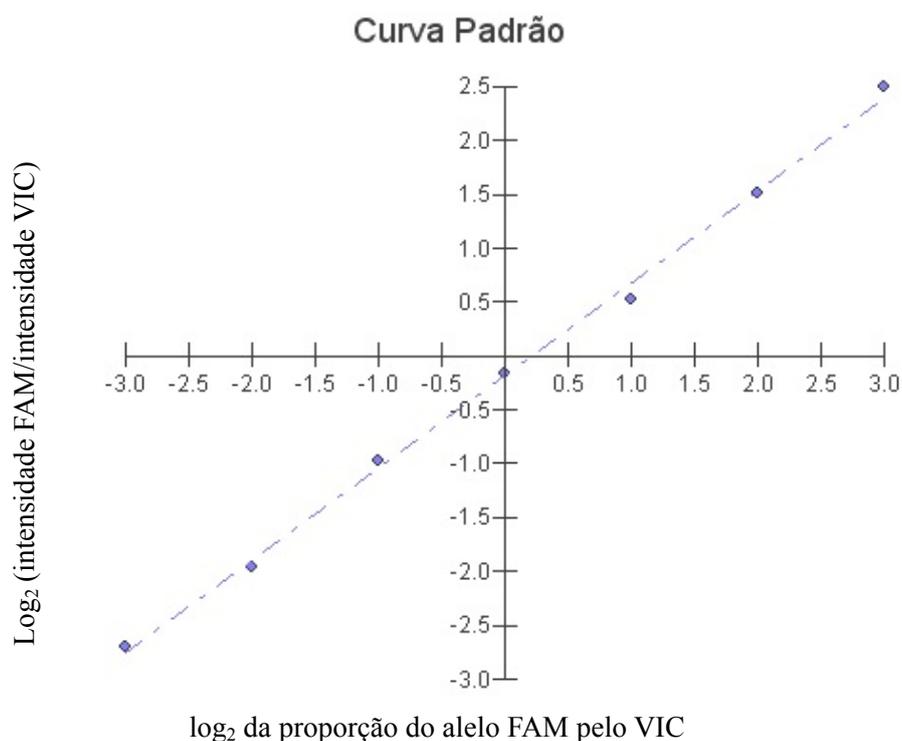
Em relação às frequências genotípicas, Morris et al. (2006), analisando população de animais *B. taurus*, encontraram o genótipo GG em somente 1% na população, outros autores encontraram resultados parecidos 2,2%, (CASAS et al., 2006), enquanto no presente trabalho, o genótipo GG foi encontrado a uma frequência de 28,26%. Considerando-se que animais *B. taurus* produzem notavelmente carne de melhor qualidade, mais macia se comparadas a do *B. indicus* (CROUSE et al., 1989), é admissível que em uma população *B. indicus* o alelo desfavorável G estivesse com maior frequência do que em uma população *B. taurus*. Em animais taurinos, Morris et al. (2006) e Casas et al. (2006) encontraram frequência do genótipo desfavorável abaixo de 5% enquanto, que na população Nelore aqui em estudo, foi encontrado 28,26% (Tabela 4).

Os programas de melhoramento no Brasil utilizaram por muitas décadas características de crescimento como critério de seleção. Contudo, em estudo recente, o alelo desfavorável G foi associado a altas DEPs para características de crescimento (PINTOS; CORVA, 2010), assim o direcionamento dos programas de melhoramento para características de crescimento pode ter contribuído para a maior frequência do alelo desfavorável.

### 7.1.2. Análise da expressão alelo específica

Os genes associados às características de maciez e carcaça em bovinos foram analisados quanto à expressão de seus alelos. Foi utilizado um SNP como marcador para distinguir entre os transcritos derivados de cada alelo de indivíduos heterozigotos (YAN et al., 2002; LO et al., 2003, PALACIOS et al., 2009). Cada alelo serviu como controle interno para o outro, eliminando diferenças de background genético e fatores ambientais.

A curva padrão para o gene *CAST* (Figura 3) foi construída a partir de diluições do DNA genômico de dois animais homozigotos AA e GG, o que permitiu avaliar quantas vezes um alelo foi mais expresso que o outro nas amostras.

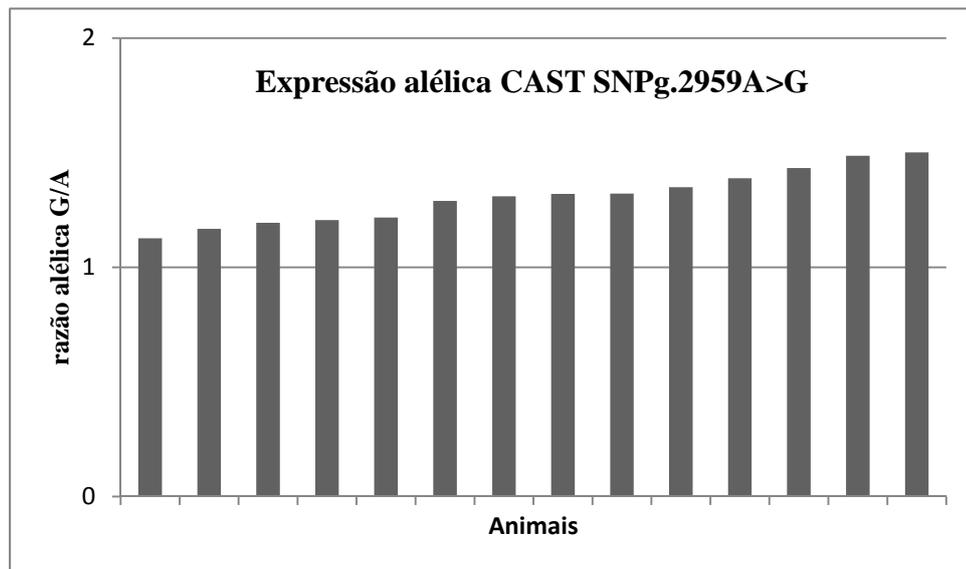


**Figura 3.** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo do gene *CAST*.  $\log_2$  da intensidade FAM/intensidade VIC plotado contra  $\log_2$  da razão alelo FAM/alelo VIC das 7 diluições (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 – alelo VIC:alelo FAM) dos DNAs de indivíduos homozigotos.

Após análise de expressão, os valores das fluorescências das sondas coletadas no ciclo 40 foram interpolados na curva por meio da equação  $Y = a + bX$ , na qual  $a$  assumiu o valor -0,1811 e  $b$  o valor 0,8578. O valor de  $X$ , correspondente à razão de expressão entre os alelos foi obtido a partir da equação, considerando o

valor de fluorescência observado para a amostra (Y) no ciclo 40.

Como mostra a Figura 4, todos os animais analisados apresentaram excesso do alelo G, e conseqüentemente um desvio da razão 1:1. A razão mínima foi 1,12 e a máxima 1,5, resultando em média e erro padrão de  $1,3 \pm 0,03$  enquanto que em tecido muscular fetal, Niciura et al. (2012) encontrou razão média  $1,57 \pm 0,09$  quando analisou o mesmo SNP para o gene *CAST*.

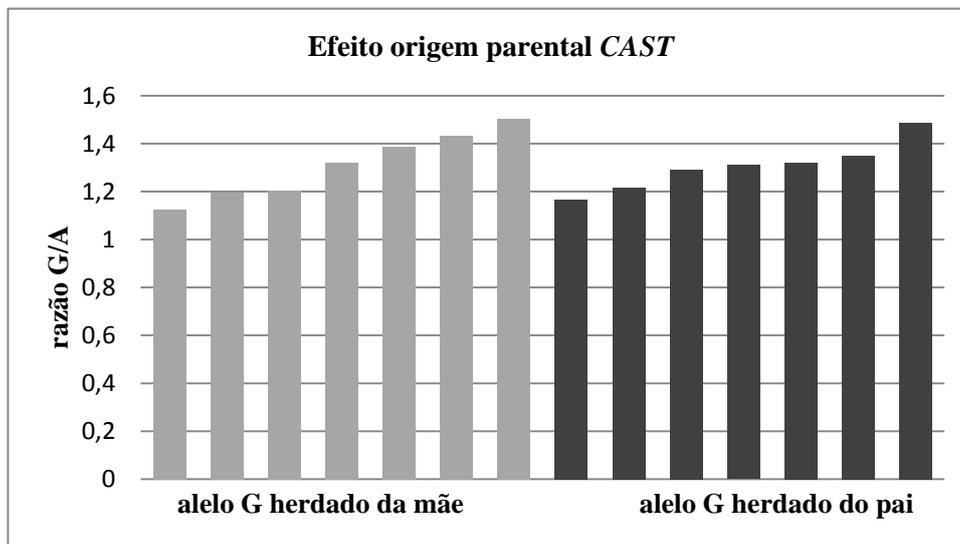


**Figura 4.** Razão da expressão dos alelos G/A do SNP g.2959A>G do gene *CAST* em amostras de músculos de novilhos da raça Nelore.

Na intenção de verificar se esse desvio da razão 1:1 era significativo foi aplicado o teste-t de *Student* de uma amostra. O intervalo de confiança 95% (limite inferior = 1,24; superior 1,37) não englobou o número 1, por isso a hipótese nula foi refutada concluindo que a razão 1,3 é diferente de 1.

O gene *CAST* apresentou expressão alélica diferencial (EAD) entre os alelos G e A, e com base nos genótipos paternos, foi possível determinar que não houve efeito da origem parental do alelo na expressão do gene. Na Figura 5 as barras cinza claro representam animais que herdaram o alelo G da mãe e as barras cinza escuro os que herdaram o alelo G do pai. Os dois grupos de animais apresentaram a mesma tendência de expressão alélica, demonstrando que o excesso de alelo G não é influenciado pela origem parental do alelo. Os 14 animais foram divididos em dois grupos de acordo com a origem parental do alelo G e submetidos à ANOVA para confirmar se não havia realmente efeito de origem parental. O valor de P não foi significativo ( $P > 0,05$ ), portanto não há influencia da

origem parental na diferença de expressão alélica para o gene *CAST*.



**Figura 5.** Razão da expressão alélica G/A do SNP g.2959A>G do gene *CAST* em amostras de músculos de animais Nelore, de acordo com a origem parental do alelo G.

Assim podem ser descartados *imprinting* genômico e expressão preferencial para o gene *CAST* em tecido muscular adulto de animais da raça Nelore.

Em trabalho analisando a diferença de expressão entre os três genótipos possíveis, Niciura et al. (2012) verificaram que o gene *CAST* é expresso o dobro em músculo de fetos GG do que AG. Esses resultados estão de acordo com o excesso de expressão do alelo G encontrados tanto em tecido muscular fetal (NICIURA et al, 2012) quanto em tecido adulto, razão G/A 1,59 e 1,3 respectivamente. Vale ressaltar que o alelo que teve maior expressão nesse trabalho foi o associado com menor maciez por outros autores.

O gênero do animal, idade, local e período de confinamento provavelmente não são a causa da EAD. Todos os animais analisados são machos, originados em uma única estação de monta por IATF (safra 1), portanto possuem aproximadamente a mesma idade, e confinados no mesmo local (Embrapa Pecuária Sudeste) e período semelhante.

Dentre os fatores epigenéticos e genéticos que poderiam estar atuando na expressão alélica do *CAST* estão a condensação da cromatina, a metilação do DNA, a regulação da transcrição por elementos CIS e TRANS, o RNA splicing, a estabilidade do mRNA e microRNAs. Contudo, elementos que atuam de maneira CIS na regulação da expressão gênica têm sido apontados por muitos autores como

a explicação plausível para a EAD (WITTKOPP et al., 2004; CHEUNG et al., 2010; SUN et al., 2011). Elementos CIS podem afetar de maneira alelo específica o início e a taxa da transcrição, além da estabilidade do transcrito, resultando em diferentes níveis de mRNA. Sun et al. (2010), ao estudar EAD em um SNP no gene *UGT2B15*, encontrou polimorfismos em elementos CIS na região promotora. Diversos autores utilizam a EAD como ferramenta para encontrar elementos CIS (PASTINEN; HUDSON, 2004; YAN; ZHOU, 2004; WITTKOPP et al., 2004).

Portanto, o SNP do gene *CAST* pode não ser a mutação causal, ou seja, pode estar em desequilíbrio de ligação (DL) com algum SNP situado em algum elemento CIS na região promotora ou distante do gene. Hoogendoorn et al., (2003) estudaram promotores humanos e verificaram que 10% daqueles analisados apresentaram variações funcionalmente relevantes na sua sequência, confirmando que polimorfismos dentro de promotores podem ser forte fonte de variação fenotípica. É conhecido que o promotor do *CAST* em bovinos é alvo da atividade da *PKA* (*cAMP-dependent protein kinase*) que parece aumentar a transcrição do gene da calpastatina e reduzir a proteólise da calpaína (CONG et al., 1998), sendo assim, polimorfismos nessas regiões podem estar associados à regulação da calpaína e por consequência, com a maciez da carne.

Contudo, o SNP estudado no gene *CAST* está localizado na região 3'UTR do gene e pode estar em uma região alvo de miRNA. Os miRNAs se ligam à região 3' UTR influenciando a regulação da expressão do gene (MCDANEL, 2009).

Considerando a posição do SNP na região 3'UTR, foi utilizado o *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>) (LEWIS et al., 2005) com o intuito de verificar se o SNP faz parte de uma região alvo de miRNA, alterando a afinidade entre mRNA e miRNA. Nenhum miRNA conhecido cujo sítio alvo envolvesse a posição do SNP no mRNA foi encontrado, no entanto o sítio alvo de dois miRNAs bovinos (*bta-miR-19a* e *bta-miR-19b*) inicia no segundo nucleotídeo após o SNP. Ainda, esse SNP pode estar em desequilíbrio de ligação com algum outro SNP alvo de miRNA. Estudos com miRNA ainda estão caminhando e o banco de dados de miRNA bovinos conhecidos ainda é pequeno, portanto esse SNP poderia ser alvo de algum miRNA ainda desconhecido.

Tendo em vista essas observações, não se pode afirmar que o SNP influencia ou não interações com miRNA. Mais estudos envolvendo miRNA e análise de elementos CIS e TRANS são necessários para elucidar o verdadeiro motivo de o

CAST apresentar EAD.

## **7.2. Gene *CAPN1***

A atividade biológica da calpaína sugere que ela seja um gene candidato para maciez. Ela atua na degradação das miofibrilas do músculo esquelético no período *post-mortem* e isso está relacionado com o amaciamento da carne (KOOHMARAIE, 1996; GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; PAGE et al., 2002; WHITE et al., 2005).

SNPs identificados nesse gene compõem os principais testes genéticos para maciez disponíveis no mercado *IGENITY TenderGENE* (Merial Ltd., Atlanta, GA) e *GeneSTAR Tenderness 2 test* (Genetic Solutions Pty. Ltd., Albion, Austrália).

Por esses motivos o gene *CAPN1* foi selecionado para estudo de expressão alelo específica e associações de SNPs com maciez da carne bovina.

### **7.2.1. SNPs identificados no gene *CAPN1***

Foram identificados 37 SNPs nos segmentos do gene *CAPN1* estudados. Do total, 9 SNPs estavam localizados em éxons, 2 na região 5'UTR e os 26 restantes em íntrons (Tabela 5). Todos os SNPs apresentaram frequência superior a 3,5%.

**Tabela 5:** Polimorfismos e frequências alélicas do gene *CAPN1* de animais da raça Nelore.

Número	Localização no gene pb	Região do gene	Sequência	Nucleotídeo o consenso	Frequência do n. consenso	Nucleotídeo Mutante	Frequência do n. mutante	Número NCBI
SNP1	16	5'UTR	GAGCCCG	C	92,90%	T	7,10%	-
SNP2	589	5'UTR	CCTCTGT	C	50,00%	T	50,00%	-
SNP3	925	Íntron 1	TGGGAAT	G	95,00%	C	5,00%	-
SNP4	1084	éxon 2	GGGCGCA	C	92,90%	T	7,10%	-
SNP5	1330	íntron 2	GACGGGG	G	53,60%	A	46,40%	-
SNP6	3379	éxon 5	CACGTCT	G	67,90%	A	32,10%	rs17872099
SNP7	3406	éxon 5	CGGTGGA	T	28,60%	C	71,40%	rs17872093
SNP8	4310	íntron 5	ACAGCGG	G	92,90%	A	7,10%	-
SNP9	4419	éxon 6	CAAACAG	A	53,80%	G	46,20%	rs17870630
SNP10	4474	íntron 6	TGCCTCT	C	80,80%	T	19,20%	rs17870629
SNP11	4744	íntron 6	AGGCGCT	C	73,10%	T	26,90%	-
SNP12	4751	íntron 6	GACGTGA	G	7,70%	A	92,30%	-
SNP13	4866	íntron 7	TCCATGG	A	92,30%	C	7,70%	-
SNP14	4976	íntron 7	CTGCGTG	C	96,20%	T	3,80%	-
SNP15	5096	íntron 7	GACTGGG	T	7,70%	C	92,30%	-
SNP16	5487	éxon 9	CGCGCTC	G	95,80%	A	4,20%	-
SNP17	5529	éxon 9	GTACGAG	C	12,50%	T	87,50%	rs134439483
SNP18	17976	íntron 10	CCCACCA	A	85,70%	T	14,30%	-
SNP19	21432	íntron 11	GCAACTC	A	80,00%	G	20,00%	-
SNP20	21705	íntron 12	GTAGAAA	G	91,70%	C	8,30%	-
SNP21	21810	éxon 13	TGACCAG	C	89,30%	T	10,70%	rs17871050
SNP22	21814	éxon 13	CAGGTCC	G	89,30%	A	10,70%	rs17871051
SNP23	22614	íntron 15	GAGCGTC	C	89,30%	A	10,70%	-
SNP24	23528	íntron 15	GACACTG	A	50,00%	G	50,00%	rs17872033
SNP25	23552	íntron 15	AGACTGG	C	85,70%	T	14,30%	-
SNP26	23560	íntron 15	CTTTCTT	T	88,50%	C	11,50%	-
SNP27	23587	éxon 16	CACGGGC	G	96,20%	A	3,80%	-
SNP28	24177	íntron 17	GCGGCGG	G	87,50%	A	12,50%	rs17872152
SNP29	24199	íntron 17	ACCAGCT	A	17,90%	G	82,10%	rs17872153
SNP30	24208	íntron 17	GTGTTTC	T	42,90%	G	57,10%	rs110896665
SNP31	24250	íntron 17	CACGTGT	G	89,30%	A	10,70%	-
SNP32	24259	íntron 17	CAGTGGC	T	82,10%	C	17,90%	-
SNP33	24298	íntron 17	CCACGCT	C	96,40%	T	3,60%	-
SNP34	24330	íntron 17	TGCCGAG	C	89,30%	T	10,70%	-
SNP35	24504	íntron 18	TGACAGC	C	88,50%	T	11,50%	-
SNP36	25413	Íntron19	GGAATGG	A	87,50%	G	12,50%	-
SNP37	25435	íntron 20	CAGGCTG	G	87,50%	A	12,50%	-

Ao todo 13 SNPs já estavam descritos no banco de dados do ENSEMBL e NCBI, entre os quais 6 em éxons e 7 em íntrons.

Os SNPs do gene *CAPN1* mais estudados em bovinos são CAPN316 e o CAPN530, ambos identificados por Page et al. (2002), no entanto, nesta população de extremos pra maciez o SNP316 não foi identificado e o CAPN530 (SNP 22) apresentou MAF 10,7%.

Esses resultados estão de acordo com os achados por Casas et al. (2005) e Pinto et al. (2010). Casas et al. (2005) não encontraram o genótipo favorável na população *B. indicus* para o SNP CAPN316 e, para o SNP CAPN530, o alelo desfavorável (A) estava praticamente fixado. Pinto et al. (2010) não encontraram polimorfismos para esses SNPs em uma população Nelore.

### 7.2.2. Escolha do SNP do *CAPN1* para as análises de expressão

Para a genotipagem da população e análise de expressão foi preciso selecionar um dentre os 37 SNPs. Adotou-se como critérios de escolha que o SNP apresentasse distribuição satisfatória dos dois alelos na população, que estivesse localizado na região mediana de éxon e que carregasse a maior quantidade de informações de outros SNPs, ou seja, o melhor *Tag*SNP.

Para encontrar o *Tag*SNP, foi utilizado o programa *Haploview* (BARRETT et al., 2005) que possibilitou verificar o padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs. Na Tabela 6 seguem descritos os *Tag*SNP e os SNP que eles capturam.

**Tabela 6.** *Tag*SNP, nas respectivas posições no gene e os SNP que eles capturam.

<b>TagSNP</b>	<b>Região do gene</b>	<b>SNPs capturados</b>
<b>SNP26</b>	íntron 15	SNP34,SNP25,SNP31
<b>SNP37</b>	íntron 20	SNP28,SNP22,SNP36
<b>SNP13</b>	íntron7	SNP15,SNP12
<b>SNP21</b>	éxon 13	SNP35,SNP23
<b>SNP12</b>	íntron 6	SNP6
<b>SNP8</b>	íntron 5	SNP4
<b>SNP9</b>	éxon 6	SNP5
<b>SNP27</b>	éxon 16	SNP33
<b>SNP30</b>	íntron 17	SNP24

Os polimorfismos que não estão na Tabela 6 não capturam nenhum outro SNP. O SNP9, que é *Tag*SNP para o SNP5, está localizado na parte final do

éxon 6, portanto não era apropriado para ser utilizado na análise de expressão. Isso porque não sobraria espaço no éxon para ser desenhado o *primer reverse* do ensaio *TaqMan*<sup>®</sup> e teria que ser desenhado na região intrônica impossibilitando o uso da sonda em mRNA que não contém os íntrons. O inverso acontece com o SNP27, que está na parte inicial do éxon 16, não havendo espaço para o desenho do *primer forward* o que, portanto, foi também descartado.

O SNP21 está posicionado quatro bases antes do SNP22 (CAPN530), o qual foi bastante estudado em bovinos e associado com maciez em diversas populações (PAGE et al., 2004; CASAS et al., 2005). Entretanto, essa proximidade impossibilitou os estudos de genotipagem e expressão por atrapalhar o anelamento da sonda e gerar genótipos errôneos. Testes prévios realizados com sondas *TaqMan*<sup>®</sup> para o SNP22 mostraram a ineficiência do ensaio para esse *locus* (MELLO et al., 2010), além de não terem sido encontrados animais homocigotos para ambos os alelos, necessário para construção da curva padrão. Esse SNP foi encontrado em baixo polimorfismo em outras populações também. Pinto et al. (2010) encontraram frequência de 8% para o alelo A em população de Nelore, e Casas et al. (2005) encontraram o alelo G fixado em uma população de *B. indicus*, mas quando autores analisaram esse polimorfismo em populações *B. taurus*, ele se mostrou mais polimórfico. Page et al. (2004), analisando diferentes grupos genéticos, encontraram frequências variáveis para o alelo A, em Simental foi observada 58%, em Charolês 45%, enquanto em Angus foi encontrado apenas 7%, ressaltando que esses grupos são *B. taurus*. Nessas populações, o SNP foi associado com variação na força de cisalhamento.

Page et al. (2002) identificaram o polimorfismo CAPN316 no éxon 9, que é uma substituição de uma citosina por uma guanina na posição 5709 (AF252504) associada com maciez. Gill et al. (2009) encontraram o genótipo CC resultando em carne mais macia em *B. taurus*, enquanto que em Nelore, Pinto et al. (2010) não encontraram animais cujo genótipo fosse CC, e Curi et al. (2010) não encontraram segregação adequada do SNP. No presente trabalho, o SNP CAPN316 não foi identificado a partir do sequenciamento dos 14 animais extremos para maciez. O alelo G, relatado como sendo desfavorável à maciez, foi associado com altas DEPs para características de crescimento em outros trabalhos (PINTOS e CORVAS, 2011), então a forte ênfase da seleção em características de crescimento poderia explicar em parte as altas frequências alélicas do SNP CAPN316

desfavorável para maciez. Essa associação do sistema calpaína-calpastatina com características de crescimento é explicada pelo seu papel na migração de células musculares e diferenciação nos estágios iniciais do desenvolvimento (BARNOY et al., 2005).

O SNP 4751 também apresentou seu alelo desfavorável associado com altas DEPs de crescimento (PINTOS e CORVAS, 2011), o que explica a alta frequência desse alelo (76,5%) em Angus argentino (PINTOS e CORVAS, 2011) e em cruzados Nelore (89,5%, CURTI et al., 2009) mas, nos animais Nelore extremos para maciez desse estudo, esse SNP não foi identificado, portanto está fixado.

Diante desses resultados, o polimorfismo escolhido foi o SNP6, cuja posição no éxon 5 era apropriada ao desenho das sondas e *primers*, além dos alelos estarem bem distribuídos na população (MAF 32,10%) e terem sido encontrados os três genótipos possíveis nos 14 animais sequenciados.

Esse SNP foi nomeado nesse experimento como 3379G>A, caracterizando a troca de uma guanina por uma adenina na posição 3379 pb do gene, sem troca de aminoácido.

### 7.2.3. Frequências alélicas e genotípicas

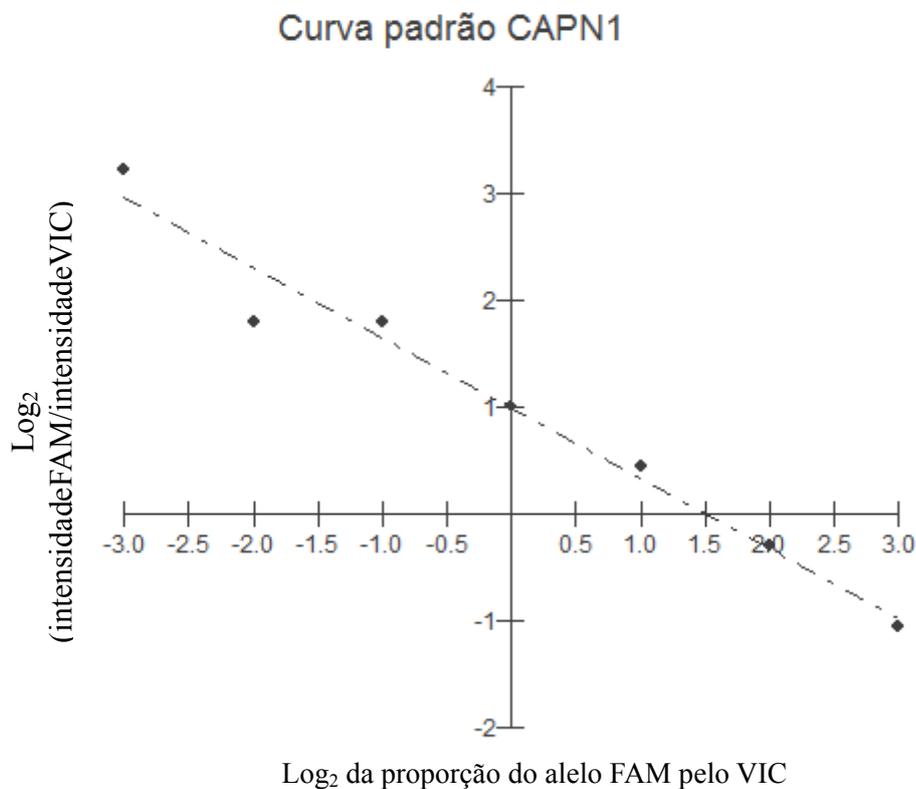
Na progênie e nos touros, as frequências dos alelos do SNP foram bastante equilibradas, como descrito na Tabela 7, mas as frequências genotípicas mostraram muitos animais homozigotos AA, e o genótipo GG com 4,2% e 0%, respectivamente. Foram utilizados 476 animais para genotipagem na progênie e 29 touros.

**Tabela 7:** Frequências alélicas e genotípicas encontradas para o SNP 3379G>A do gene *CAPN1* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.

População	Número animais	Frequências (%)				
		Genotípica			Alélica	
		AA	GA	GG	A	G
Touros	29	58,62	41,37	0	79,31	20,68
Progênie	476	64,29	31,51	4,20	80,04	19,96

#### 7.2.4. Análise da expressão alelo específica

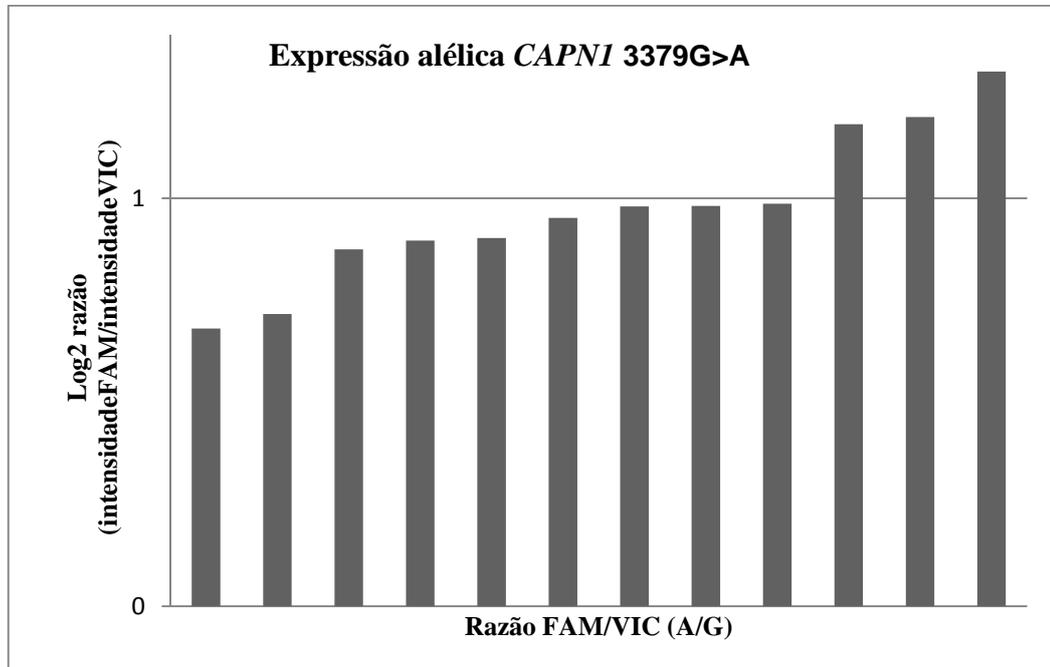
A análise da expressão alélica específica do gene *CAPN1* foi realizada de acordo com o protocolo adotado para o *CAST*, iniciando com a construção da curva padrão (Figura 6) para normalizar as sondas, seguido da expressão alélica dos 12 animais heterozigotos, filhos de pais homozigotos, e a interpolação dos resultados na curva padrão por meio da equação  $Y = a + bX$ , na qual  $a$  foi 0,9927 e  $b$  foi -0,6573. Então, o valor de  $X$  foi obtido o que possibilitou verificar a razão de expressão entre os alelos.



**Figura 6:** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo. Log<sub>2</sub> da intensidadeFAM/intensidadeVIC foi plotado contra o log<sub>2</sub> de aleloFAM/aleloVIC das diluições dos DNAs de indivíduos homozigotos em 7 proporções (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 - aleloVIC:aleloFAM), para o SNP do gene *CAPN1*.

Como mostra a Figura 7, a maioria dos animais apresentaram excesso do alelo G e apenas 3 mostraram o inverso. Aparentemente houve um desvio da razão 1:1 (média e erro padrão  $0,97 \pm 0,05$ ), mas aplicando as análises estatísticas verificou-se que 0,9716 é estatisticamente igual a 1, concluindo que não há EAD

para o gene *CAPN1* em tecido muscular adulto, pois o número 1 estava contido dentro do IC (0,8534 a 1,0898).



**Figura 7:** Razão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 3379G>A, do gene *CAPN1*.

### 7.3. Gene *KCNJ11*

O *KCNJ11* até o presente momento foi pouco estudado em bovinos (BERNARD et al., 2009), por isso há a necessidade de pesquisas visando sua aplicação no melhoramento animal, mas principalmente pesquisas fundamentais que desvendem sua estrutura e biologia. Sendo assim, ele foi selecionado para integrar o conjunto de genes estudados neste trabalho, tanto no estudo de estrutura e biologia quanto na sua aplicação no melhoramento animal, visto que ele foi relacionado à deposição de glicogênio pelo músculo em camundongos (ALEKSEEV et al., 2010) e, em bovinos, explicou parte da variabilidade na massa muscular e conteúdo de lipídeos (BERNARD et al., 2009).

### 7.3.1. Escolha do SNP, Estudo de *Tag*SNP e *Haploview*

As regiões 5'UTR e 3'UTR, e o único éxon que compõe o gene foram sequenciados em 14 novilhos com fenótipos extremos para maciez (como parte do projeto de doutorado de Polyana C. Tizioto; dados não publicados). Entre os 22 SNPs detectados, pretendia-se escolher para o presente trabalho um *Tag*SNP que apresentasse boa distribuição dos dois alelos na população e que carregasse informações do maior número de SNPs possível.

Para encontrar o *Tag*SNP, foi utilizado o programa *Haploview* (BARRETT et al., 2005) que possibilitou ver o padrão de desequilíbrio de ligação entre os SNPs. O SNP que carrega informações de um maior número de SNPs foi o T>C, localizado na região codificadora, posição 2126 pb, que contém informações de outros 5 SNPs distribuídos ao longo do gene, sendo um deles na região 5'UTR, um na região codificadora e três na região 3'UTR.

### 7.3.2. Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas encontradas nos touros e na progênie foram semelhantes, e estão dispostas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Frequências alélicas e genotípicas encontradas para o SNP 2126T>C do gene *KCNJ11* nos touros e progênie de animais da raça Nelore.

População	Número animais	Frequências (%)				
		Genotípica			Alélica	
		TT	TC	CC	T	C
<b>Touros</b>	28	0	32,14	67,86	16,07	83,93
<b>Progênie</b>	614	2,45	26,38	71,17	15,64	84,36

Na progênie, os três genótipos possíveis para o SNP 2126T>C foram encontrados, mas o TT representou apenas 2,44% da população cujo tamanho era 614 animais, produzidos nas duas estações de monta. A MAF foi 15,75% para o alelo T.

Em bovinos, Bernard et al., (2009) encontraram que o perfil de expressão desse gene, junto com outros 8, explicaram parte da variabilidade na massa muscular e do conteúdo de lipídeos intramuscular (60% e 52%,

respectivamente), entretanto, não existem relatos de associação desse gene com maciez da carne.

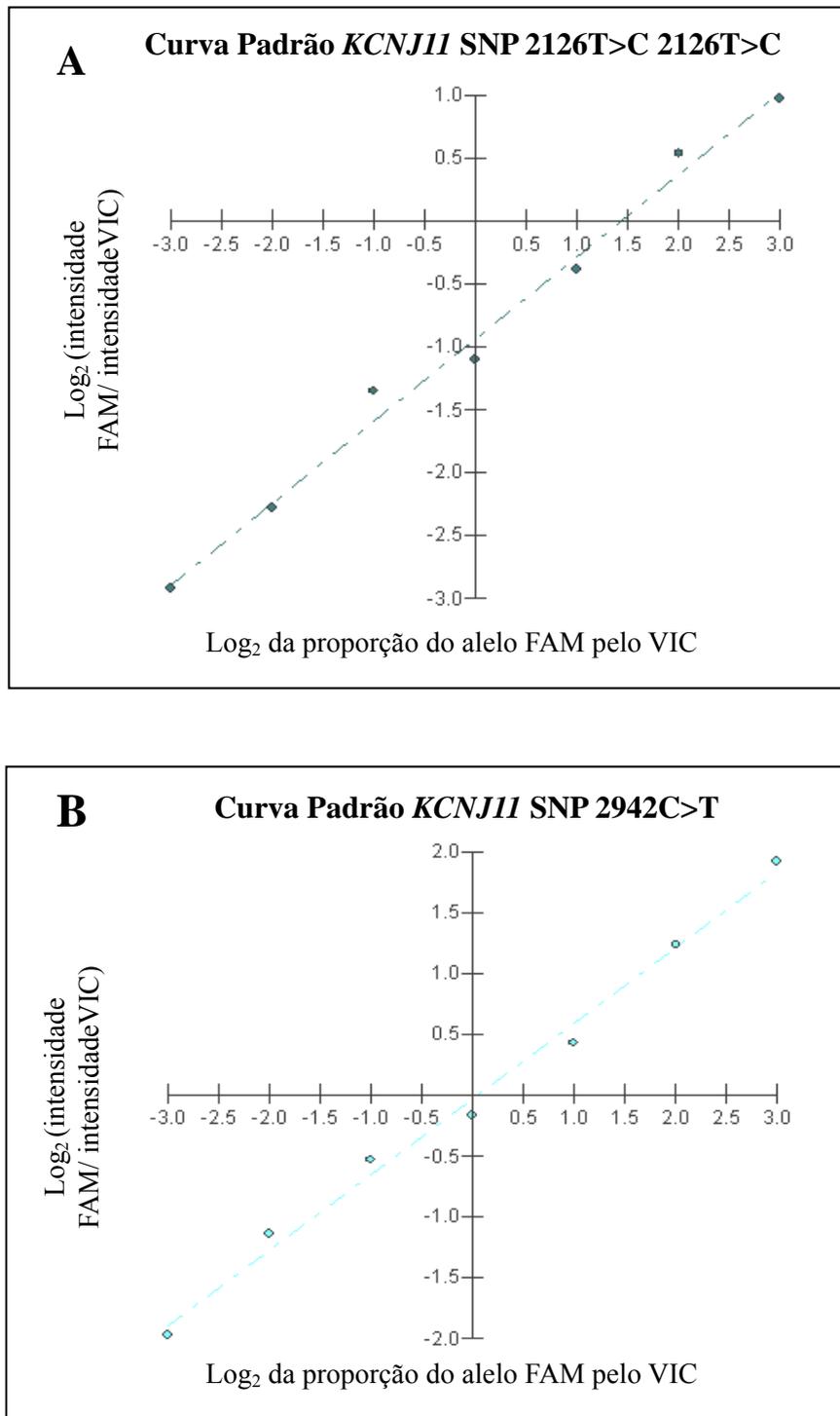
A possível associação do gene *KCNJ11* com maciez é explicada em parte pelas vias metabólicas nas quais ele está envolvido. Alekseev et al. (2010) demonstraram que a inativação do gene em ratos ocasionou em fenótipo magro mesmo quando os animais foram submetidos à dieta rica em gordura. Atribuiu-se esse fato à perda de função do canal de KATP, fazendo com que reduzisse o depósito de glicogênio pelo músculo. Portanto, os canais sarcolemais KATP governam economia de energia muscular, e sua baixa regulação em um tecido específico pode apresentar uma antiobesidade estratégica, ao tornar o músculo cada vez mais termogênico no repouso e diminuindo a eficiência de combustível durante o exercício. Além disso, é conhecido que o teor de gordura do músculo pode estar intimamente relacionado com maciez, já que muitos autores associaram gordura intramuscular com maciez (SEIDEMAN et al., 1987; SMITH et al., 2001).

### 7.3.3. Análise da expressão alelo específica

Não há relatos na literatura de estudos de expressão alélica com ou sem efeito de origem parental para o gene *KCNJ11* em bovinos, então os dados obtidos nesse trabalho são inéditos para a raça.

Para verificar se o gene *KCNJ11* apresenta diferença de expressão entre alelos resultante ou não de efeito de origem parental, foi utilizado o mesmo SNP da genotipagem, além de um adicional, localizado na posição 2942 pb na região 3'UTR, resultante de uma troca de citosina por timina (C>T). Uma análise prévia de teste de Fisher utilizando as frequências encontradas nos 14 extremos para maciez, sugeriu associação entre esse segundo SNP (2942C>T) e maciez da carne ( $P < 0,05$ ). Então ele foi genotipado na população (parte do projeto de doutorado da aluna Polyana C. Tizioto) e sua expressão alélica foi avaliada junto com o SNP 2126T>C.

Para normalizar as sondas de cada ensaio *TaqMan*<sup>®</sup> foi construída a curva padrão separadamente para cada SNP (Figura 8). Para ambas realizaram-se as diluições com animais CC e TT. Na curva padrão do SNP 2126T>C, a sonda FAM equivalia ao alelo C e a sonda VIC ao alelo T, e o inverso para o SNP 2942C>T.



**Figura 8:** Curva padrão da intensidade de fluorescência produzida por diferentes proporções dos produtos de cada alelo do gene *KCNJ11*. Log<sub>2</sub> da intensidadeFAM/intensidadeVIC foi plotado contra o log<sub>2</sub> de aleloFAM/aleloVIC das diluições dos DNAs de indivíduos homocigotos em 7 proporções (8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 - alelo VIC:aleloFAM). **A)** Curva padrão SNP 2126T>C. **B)** Curva padrão SNP 2942C>T.

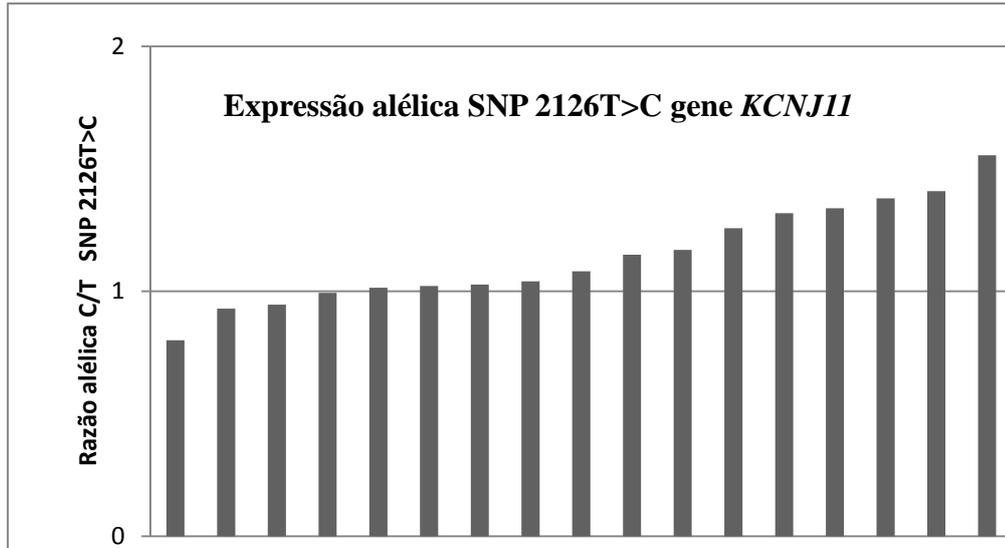
Na análise da expressão do RNA extraído de tecido muscular e tecido adiposo verificou-se que não houve expressão do gene no tecido adiposo, portanto foi utilizado apenas o tecido muscular para análise da expressão alélica.

Os valores das fluorescências das sondas coletadas no ciclo 40 foram interpolados na curva através da equação  $Y = a + bX$ . Os valores de  $a$  e  $b$  estão descritos na Tabela 9. Assim o valor de  $X$  foi obtido, para cada valor de  $Y$  (fluorescência no ciclo 40) o que possibilitou verificar a razão de expressão entre os alelos. Ao todo, foram analisados 17 animais para o SNP 2126T>C e 18 animais para o 2942C>T.

**Tabela 9:** Valores de  $a$  e  $b$  na equação obtida para a curva padrão  $Y = a + Bx$  para os dois SNPs do gene *KCNJ11*.

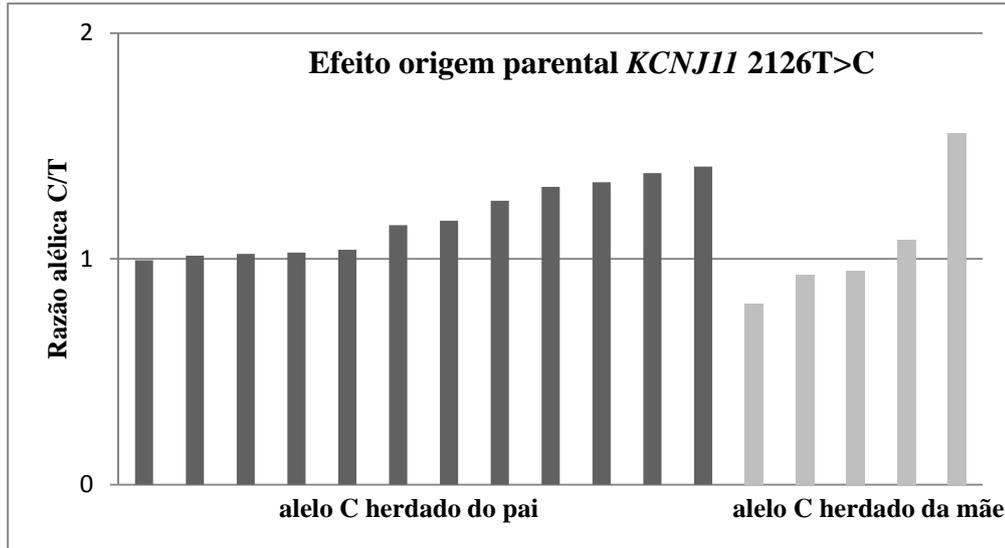
SNP	a (intercepto)	b (coef. de regressão)
2126T>C	-0,9315	0,6537
2942C>T	-0,032	0,622

Quatro animais apresentaram excesso do alelo C para o SNP 2126T>C, com a menor razão sendo 0,801. As razões dos demais animais variaram entre 1,01 e 1,55, demonstrando excesso do alelo T (Figura 12). No teste-t de *Student*, a média e erro padrão foram  $1,20 \pm 0,04$ , com limite inferior 1,04 e superior 1,35 compondo o IC (95%). Como o número 1 não está contido no IC, a hipótese nula foi rejeitada e conclui-se que a média 1,2 é estatisticamente diferente de 1, então há diferença de expressão para esse SNP.



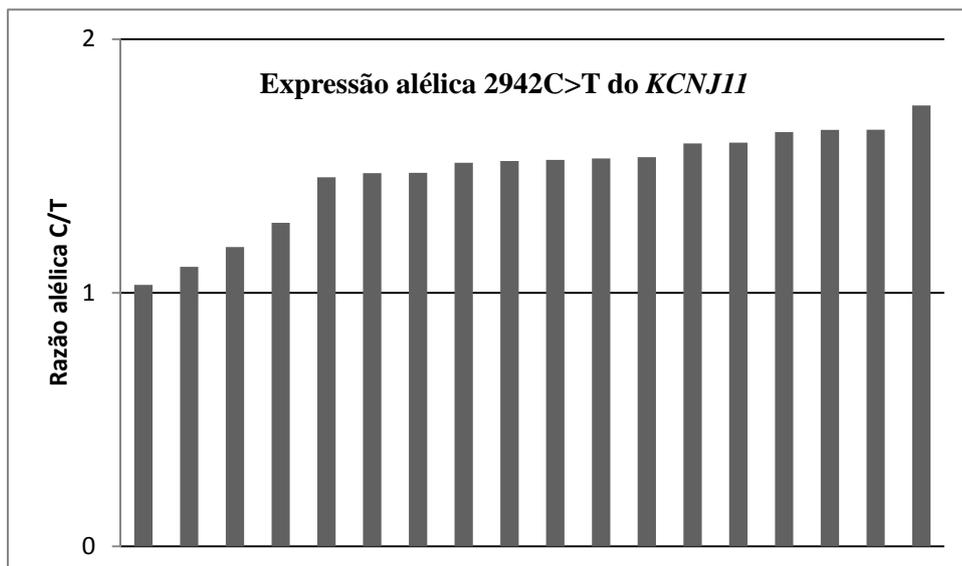
**Figura 9:** Razão da expressão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 2126T>C, gene *KCNJ11*.

Foi verificado também se a EAD do SNP 2126T>C era influenciada pela origem parental do alelo (Figura 13). Para isso os 17 animais foram divididos em dois grupos considerando a origem parental do alelo C e então realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o resultado não foi significativo ( $P>0,05$ ), sugerindo portanto, que a EAD no SNP 2126T>C não sofre efeito da origem parental do alelo. Entretanto, a amostra de 17 animais possuía um maior número de indivíduos nos quais o alelo C tinha origem paterna (10), observando-se na Figura 11 uma tendência de comportamento semelhante nas amostras em que o alelo C foi herdado da mãe.



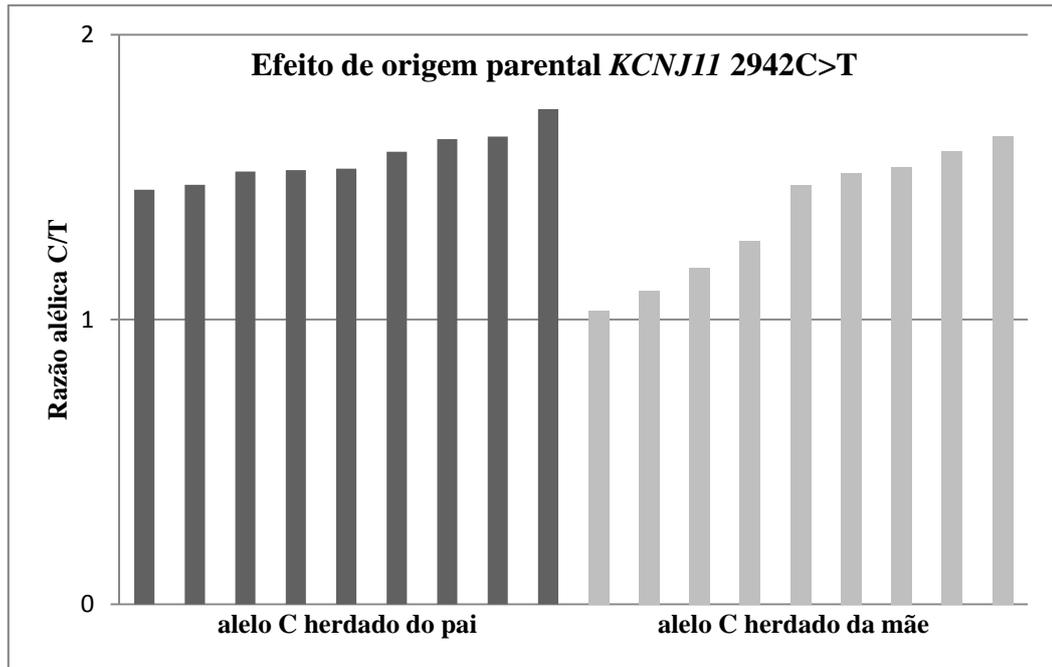
**Figura 10:** Razão da expressão alélica C/T do SNP 2126T>C do gene *KCNJI1* em amostras de músculos de novilhos da raça Nelore, de acordo com a origem parental do alelo C.

Para o 2942C>T, também foi encontrada EAD. Todos os animais apresentaram razão maior que 1, o que significa que o alelo C foi expresso em maior quantidade se comparado ao T (Figura 11). A razão mínima foi 1,03 e a máxima 1,73, resultando em uma média e erro padrão de  $1,46 \pm 0,04$ . O IC 95% (limite inferior = 1,37; superior 1,56) passou longe de englobar o número 1, por isso a hipótese nula (a qual diz que a razão 1,46 é igual a 1) foi refutada.



**Figura 11:** Razão da expressão alélica C/T do SNP 2942C>T do gene *KCNJI1* em amostras de músculos de animais da raça Nelore.

Para testar se a EAD do SNP 2942C>T era influenciada pela origem parental do alelo, realizou-se análise de variância (ANOVA) com os animais e foi encontrado efeito significativo ( $P < 0,05$ ). Portanto o SNP 2942C>T apresenta expressão alélica diferencial e essa variação entre os alelos é influenciada pela origem parental do alelo (Figura 12).



**Figura 12:** Razão alélica C/T em amostras de músculos, SNP 2942C>T do gene *KCNJ11* de acordo com a origem parental do alelo C.

A análise dos dois SNPs do gene *KCNJ11* revelou a existência de diferença de expressão entre os dois alelos de ambos os SNPs. O SNP 2126T>C apresentou EAD mais fraca se comparado ao SNP 2942C>T, isso porque os limites do primeiro (1,37 a 1,56) distanciam-se mais de 1 do que os do SNP 2942C>T (1,04 a 1,35).

A EAD encontrada para esse gene pode ser resultante de diversos fatores genéticos. Estudos com indivíduos não relacionados, irmãos e gêmeos monozigóticos sugeriram que essa variabilidade dos níveis de expressão é determinado geneticamente (CHEUNG et al., 2003). Dentre esses fatores estão a influencia da origem parental (KHATIB 2005), elementos reguladores CIS (BRAY et al., 2003; CHEUNG et al., 2010) ou miRNA (SUN et al., 2011).

Apenas o SNP 2942C>T apresentou efeito significativo de origem

parental sobre a EAD, caracterizando assim expressão alélica preferencial (EAP). Em virtude do desbalanço no número de indivíduos que apresentam alelo C de origem materna e paterna, a ausência de efeito de origem parental para o SNP 2126T>C deve ser melhor investigada. Estudos indicam que a variação na expressão alélica pode ser herdada de maneira Mendeliana também (PASTINEN; HUDSON, 2004; YAN et al., 2002), o que provavelmente é o caso da EAD do SNP 2126T>C.

Parker-Katirae et al. (2008) encontraram EAD analisando células embrionárias murinas e perceberam que essa variação na expressão pode mudar de forma dinâmica ao longo do desenvolvimento. Assim fica evidente a necessidade de estudar o gene *KCNJ11* em diversas fases de desenvolvimento.

O efeito de origem parental precisa ser estudado por interferir nos valores genéticos de fêmeas e machos nas análises quantitativas do melhoramento animal (MAGEE et al., 2010). No caso do SNP 2942C>T, foi descrito que a diferença de expressão alélica diminui quando o alelo C é herdado da mãe e o alelo T herdado do pai. Portanto em populações que esse SNP esteja associado com características de interesse, é importante considerar esse efeito de origem parental nas análises quantitativas.

Considerando que ambos os alelos afetaram a expressão do gene, foi feita uma análise para verificar se o SNP 2942C>T estava influenciando a EAD no SNP 2126T>C, e vice versa, como sugerido por Sun et al. (2011). Em seu trabalho, eles encontraram razão média de 0,75 para um SNP no gene *UTG2B15*, caracterizando EAD, e em estudos recentes eles haviam encontrado outro SNP, situado no promotor que também afetava a expressão do gene. Em uma análise de teste-t independente eles verificaram se o SNP no promotor poderia influenciar a expressão do outro. Para isso classificaram os indivíduos em homozigotos e heterozigotos para ambos os alelos, e compararam as médias dos dois alelos do primeiro SNP, mas não encontraram diferença significativa entre esses dois grupos, portanto o SNP do promotor não afetava o SNP alvo do estudo. No presente estudo, essa metodologia foi adotada para o gene *KCNJ11*. Para isso os animais foram classificados como homozigotos (CC e TT) em um grupo e heterozigotos (TC) em outro grupo, separadamente para cada SNP.

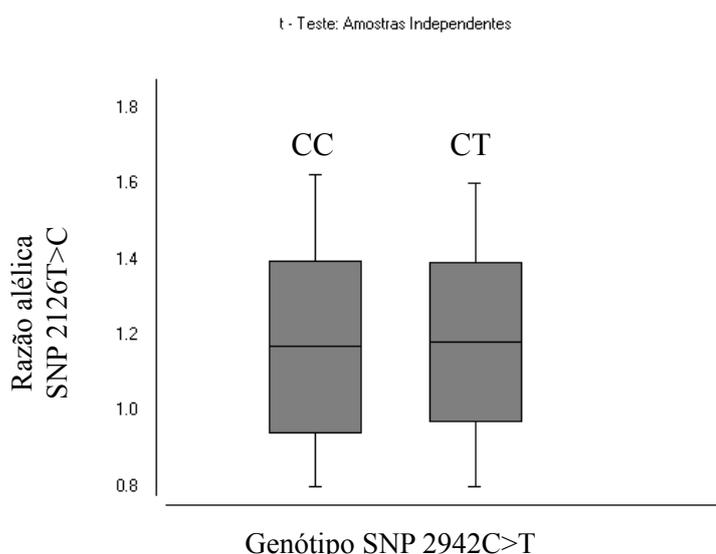
Primeiro foi analisado se o SNP 2942C>T influenciava a EAD apresentada pelo SNP 2126T>C. Com os animais heterozigotos para o 2126T>C

formou-se dois grupos de acordo com o genótipo no SNP 2942C>T, os heterozigotos (CT, n=11 com média 1,18) e homozigotos (CC, n=10 com média 1,26). Então o teste-t independente foi aplicado a esses dois grupos, considerando as seguintes hipóteses:

$H_0$ = não há diferença entre as médias de EAD no SNP 2126T>C dos animais com genótipo CC ou CT no SNP 2942C>T.

$H_1$ = há diferença entre as médias de EAD no SNP 2126T>C dos animais com genótipo CC ou CT no SNP 2942C>T.

Foi obtido o valor de  $t$  sendo -0,1144 e o IC (95%) compreendendo -0,2104 a 0,1886. Como o  $t$  está contido no IC, a  $H_0$  é aceita, portanto não há influência do SNP2942C>T sobre a EAD do SNP2126T>C (Figura 13).

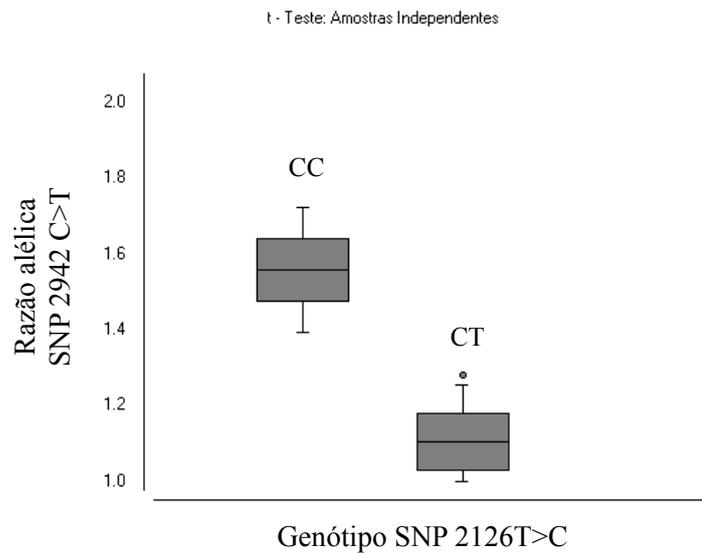


**Figura 13:** Efeito do genótipo do SNP 2942C>T sobre EAD do SNP 2126T>C do gene *KCNJ11*.

Também foi analisado se o SNP 2126T>C influenciava a EAD apresentada pelo SNP 2942C>T. A mesma metodologia foi utilizada, separando os animais heterozigotos para o 2942C>T em dois grupos de acordo com o genótipo no SNP 2126T>C, os heterozigotos (TC, n=4 com média 1,14) e homozigotos (CC, n=14 com média 1,56).

Foi encontrado que o SNP2126T>C influencia a EAD do SNP2942C>T. O valor de  $t$  (8,3) não está contido no IC (95%, 0,3067 a 0,5169), portanto a  $H_0$  é

rejeitada (Figura 14). Quando o genótipo no SNP 2126T>C é CC então a diferença de expressão entre os alelos do SNP2942C>T é maior do que quando o genótipo é CT (1,56 e 1,14, respectivamente). Não foram encontrados animais heterozigotos para o SNP2942C>T cujo genótipo no SNP 2126T>C foi TT.



**Figura 14:** Efeito do genótipo do SNP 2126T>C sobre a EAD do SNP 2942C>T do gene *KCNJ11*.

Em ovinos Texel, uma mutação na região 3'UTR no gene da miostatina criou um sítio alvo para os miRNAs mir1 e mir206, que são altamente expressos no músculo, inibindo translacionalmente o gene miostatina o que contribui pra hipertrofia muscular (CLOP et al., 2006).

Como o SNP 2942C>T está contido na região 3'UTR, assim como 3 dos SNPs cujas informações são carregadas pelo *Tag*SNP 2126T>C, e estes podem ser alvos de miRNA, foi realizada busca por sítios-alvo de miRNA na região dos SNPs semelhante aquela com o gene *CAST*.

Diferentemente, no presente trabalho nenhum sítio alvo de miRNA envolveu os dois SNPs estudados, nem os SNPs cujas informações são reveladas pelo *Tag*SNP2126T>C. Assim não foi possível relacionar variações da expressão à efeitos de miRNAs.

#### 7.4. Genes da leptina, *DGAT1* e *IGFBP3*

Na análise das frequências dos genes *DGAT1* nos touros (genotipado pela Dra. Fabiane Siqueira), nenhum animal apresentou polimorfismo e o gene *IGFBP3* (Dra. Gisele Veneroni) apresentou baixa frequência do polimorfismo proposto. Considerando que a frequência alélica e genotípica nesses é uma estimativa para as principais linhagens da raça Nelore que, portanto, representa uma estimativa da distribuição alélica na raça, optou-se por não realizar a genotipagem destes polimorfismos em toda a população.

Nos touros, a leptina (Dra. Fabiane Siqueira) mostrou baixo polimorfismo para o SNP proposto com 92,6% de CC, 7,4% de CT e nenhum animal TT. Apesar da baixa distribuição, uma pequena amostra da progênie foi genotipada para análise da distribuição desse polimorfismo pelo interesse de se estudar esse gene, principalmente o padrão de expressão, porque, além de se tratar de um gene associado à deposição de gordura (KONONOFF et al., 2005; NKRUMAH et al., 2005; SCHENKEL et al., 2005; WU et al., 2005; FORTES et al., 2009), existem relatos que ele apresenta controle da expressão tecido específica por possuir um sítio de metilação do DNA (KREMENSKOY et al., 2006). Assim 30 novilhos foram genotipado por sonda *TaqMan*<sup>®</sup> sendo todos homozigotos CC, portanto o gene foi descartado para estudo de expressão.

## 7. CONCLUSÃO

A partir da análise de distribuição das frequências alélicas dos SNPs contidos nos genes *CAPN1*, *DGAT1* e gene da leptina, na população de touros representativa da raça Nelore no país, concluiu-se que é preciso investigar polimorfismos específicos de *Bos indicus* nesses genes, pois os descritos em *Bos taurus*, estavam praticamente fixados na amostra. A variabilidade dos SNPs contidos no gene *CAST*, descritos em *Bos taurus*, e dos genes *CAPN1* e *KCNJ11*, encontrados a partir de sequenciamento de animais *Bos indicus*, indicaram a viabilidade de estudos de associação entre esses marcadores e características de maciez da carne, para posterior utilização como ferramentas de auxílio aos programas de melhoramento animal.

A análise da expressão alélica no presente trabalho permitiu demonstrar a existência de variações do modelo mendeliano clássico. A expressão alélica diferencial encontrada nos genes *CAST* e *KCNJ11* pode resultar de diversos eventos tanto genéticos quanto epigenéticos, cujo entendimento pode auxiliar nos modelos estatísticos de programas de melhoramento animal, elucidando ruídos nas equações de decomposição fenotípica, adicionando precisão na estimativa do mérito genético. O gene *CAPN1* não apresentou diferença de expressão entre seus alelos, no entanto esse padrão de expressão, assim como dos demais genes estudados no presente trabalho, precisa ser confirmado em diferentes populações, tecidos e estágios de desenvolvimento para que então tais efeitos sejam incluídos nos modelos estatísticos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSEEV, A. E.; et al. Sarcolemmal ATP-Sensitive K<sup>+</sup> 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.

ALVES, D. D.; TONISSI, R.H.; GOES, B.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.

AMIGUES, Y.; et al. Genetic characterization of the Blonde d'Aquitaine cattle breed using microsatellite markers and relationship with three other French cattle populations. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 128, n. 3, p. 201-208, 2011.

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

ANTON, I.; et al. Effect of Leptin, DGAT1 and TG Gene Polymorphisms on the Intramuscular Fat of Angus Cattle in Hungary. **Livestock Science**, v. 135, p. 300-303, 2011.

ANUALPEC 2010. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Agra FNP, 2010. Cap. 2, p. 51 – 78.

AYRES, M.; et al. **BioEstat 5.0 – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 364 p.

AZAM, A.; et al. DNA typing of Pakistani cattle breeds Tharparkar and Red Sindhi by microsatellite markers. **Molecular Biology Reports**, 2011. DOI: 10.1007/s11033-011-0807-1.

BARENDSE, W.; et al. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v. 6, n. 3, p. 227-35, 1994.

INTERNATIONAL PATENT PUBLICATION. WO 02/064820 A1. Barendse, W. J. **DNA markers for meat tenderness**. N. PCT/AU02/00122. 2002.

BARENDSE, W.; et al. Epistasis between Calpain 1 and its inhibitor Calpastatin within breeds of cattle. **Genetics**, v. 176, p. 2601–2610, 2007.

BARNOY, S.; MAKI, M.; KOSOWER, N. S. Overexpression of calpastatina inhibits L8 myoblast fusion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, p. 697-701, 2005.

BARRETT, J.C.; et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 2005.

BECKMANN, J.S.; et al. Restriction fragment length polymorphism among Israeli-Holstein-Friesian dairy bulls. **Animal Genetics**, v. 17, n. 1, p. 25- 38, 1986.

BENNETT, S. Solexa Ltda. **Pharmacogenomics**, v. 5, n. 4, p. 433-438, 2004.

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.  
BIANCHINI, W.; et al. Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos super precoces. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2109-2117, 2007.

BONILHA, S. F. M.; et al. Evaluation of carcass characteristics of *Bos indicus* and tropically adapted *Bos taurus* breeds selected for post weaning weight. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1770-1780, 2008.

BOUTON, P. E.; HARRIS, P. V.; SHORTOSE, W. R. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. **Journal of Food Science**, v. 36, n. 3, p. 435-439, 1971.

BOVINE HAPMAP CONSORTIUM. A Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 528-532, 2009.

BRAY, N. J.; et al. *Cis*-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. **Human Genetics**, v. 113, p. 149-153, 2003.

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

CAÑÓN, J.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I.; CARLEOS, C.; CARRETERO, Y.; DUNNER, S.; FERRAN, N.; GARCIA, D.; JORDANA, J.; LALOË, D.; PEREIRA, A.; SANCHEZ, A.; GOUDARZI, K. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. **Genetics Selection Evolution**, v. 33, p. 311-332, 2001.

CARNEIRO, P. L. S.; et al. Seleção tradicional e associada a marcadores moleculares na avaliação genética animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 615-621, 2006.

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 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. 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. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 2-6, 2004.

CASAS, E.; et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13-19, 2005.

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

CASAS, E.; et al. Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p.2807-2814, 2007.

CHARDON, P.; et al. Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the pig. **Immunogenetics**, v. 21, n. 2, p. 161-71, 1985.

- CHENG, H. C.; et al. Isolation and imprinting analysis of the porcine DLX5 gene and its association with carcass traits. **Animal Genetics**, v. 39, n. 4, p. 395-399, 2008.
- CHEUNG, V. G.; et al. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. **Nature Genetics**, v. 33, p. 422–425, 2003.
- CHEUNG, V. G.; et al. Polymorphic *Cis*- and *Trans*-regulation of human gene expression. **PLOS Biology**, v. 8, n. 9, p. e10000480.
- CLOP, A.; et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 813-8, 2006.
- CONG, M.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E.; ANTIN, P. B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 660-666, 1998.
- CROSS, H. R.; MOEN, R.; STANFIELD, M. S. Training and testing of judges for sensory analysis of meat quality. **Food technology**, v. 32, p. 48, 1978.
- CROUSE, J. D.; et al. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 2661-2668, 1989.
- CURI, R. A.; et al. Assessment of GH1, *CAPN1* and *CAST* polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus-Bos indicus* cross beef cattle. **Meat Science**, v. 86, n. 4, p. 915-920, 2010.
- CURI, R. A.; et al. Effect of single nucleotide polymorphisms of *CAPN1* and *CAST* genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, n. 4, p. 456-462, 2009.
- DANNA, K.; NATHANS, D. Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease of Hemophilus Influenzae. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 68, n. 12, p. 2913-2917, 1971.
- DANNA, K. J.; SACK JR, G. H.; NATHANS, D. Studies of Simian virus 40 DNA: VII.

A cleavage map of the SV40 genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 78, n. 2, p. 363-368, 1973.

DARIO, C.; SELVAGGI, M. Study on the STAT5A/Aval polymorphism in Jersey cows and association with milk production traits. **Molecular Biology Reports**, 2011. DOI: 10.1007/s11033-011-0691-8.

DAVIS, G. P.; et al. QTL for meat tenderness in the *M. longissimus lumborum* of cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 1, p. 40-45, 2008.

DAYTON, W. R., WHITE, M. E. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. E217-E225, 2008.

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

DEKKERS, J. C. M.; F. HOSPITAL. The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 22-32, 2002.  
DODDS, K. G.; et al. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 966-975, 1996.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. IV - Role of calpain and calpastatin in conditioning. **Meat Science**, v. 34, n. 2, p. 217-234, 1993.

DRANSFIELD, E. Modeling postmortem tenderization. V. Inactivation of calpains. **Meat Science**, v. 37, p. 391-409, 1994.

DRINKWATER, R. D.; et al. Detecting quantitative trait loci affecting beef tenderness on bovine chromosome 7 near calpastatin and lysyl oxidase. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 46, p. 159-64, 2006.

EDWARDS, C. J.; et al. Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European cattle breeds as analyzed with 20 microsatellite loci. **Animal Genetics**, v. 31, n. 5, p. 329-332, 2000.

EWING, B.; et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer using phred. II Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

FORTES, M. R. S.; et al. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 75-82, 2009.

GEARY, T. W.; et al. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1–8, 2003.

GEORGES, M.; et al. Genetic variation of the bovine thyroglobulin gene studied at the DNA level. **Animal Genetics**, v. 18, n. 1, p. 41-50, 1987.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by -calpain under postmortem conditions. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2685–2692, 1999.

GIBSON, C. A.; STALEY, M. D.; BAUMRUCKER, C. R. Identification of IGF binding proteins in bovine milk and the demonstration of IGFBP-3 synthesis and release by bovine mammary epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1547-1557, 1999.

GILL, J. L.; BISHOP, S. C.; McCORQUODALE, C.; WILLIAMS, J. L.; WIERNER, P. 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. 36-47, 2009.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 5, p. 759-769, 2011, doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x.

GOODALL, J. J.; SCHMUTZ, S. M. IGF2 gene characterization and association with rib eye area in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 38, n. 2, p. 154-161, 2007.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GREGORY, R. I.; et al. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes *Snrpn* and *U2af1-rs1*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 5426-5436, 2001.

Gonzales recio

GRISART, B., et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v. 12, p. 222–231, 2002.

GUILLEMETTE, B, D. P.; et al. H3 lysine 4 is acetylated at active gene promoters and is regulated by H3lysine 4methylation. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 3, p. e1001354, 2011.

GUT, I. G. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. **Human Mutation**, v. 17, p. 475-492, 2001.

HACIA, J.; et al. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. **Nature Genetics**, v. 22, n. 2, p.164-167, 1999.

HEATON, M. P.; et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 272–281, 2002.

HILL, W. G., SALISBURY, B. A.; WEBB, A. J. Parentage identification using single nucleotide polymorphism genotypes: application to product tracing. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2508–2517, 2008.

HOOGENDOORN, B.; et al. Functional analysis of human promoter polymorphisms. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2249-2254, 2003.

HUTCHISON, C. A. DNA sequencing: bench to beside and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 18, p. 6227-6237, 2007.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KGWATALALA, P.; ZHAO, X.A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v. 19, p. 591–617, 2008.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, p. 1074-80. 2001.

JEON, J. T.; et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. **Nature Genetics**, v. 21, n. 155–156, 1999.

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.

JOHNSTON, D. J.; et al. Genetic and phenotypic characterization of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds. 3. Meat quality traits. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 135 – 147, 2003.

JORDAN, B.; et al. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **PNAS**, v. 99, n. 5, p. 2942–2947, 2002.

KEELE, J. W.; et al. A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1364-1371, 1999.

KENDREW, J. **The encyclopedia of molecular biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 790-794.

KHATIB, H. Imprinting of *Nesp55* gene in cattle. **Mammalian Genome**, v. 15, n. 8, p. 663-672, 2004.

KHATIB, H. Monoallelic expression of the protease inhibitor gene in humans, sheep, and cattle. **Mammalian Genome**, v. 16, p. 50–58, 2005.

KHATIB, H. Is it genomic imprinting or preferential expression? **Bioessays**, v. 29, p. 1022-1028, 2007.

KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; KIM, E. S. Comparative analysis of sequence characteristics of imprinted genes in human, mouse, and cattle. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 538–547, 2007.

KING, M. C.; WILSON, A. C. Evolution at two levels: molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees. **Science**, v. 188, p. 107–116, 1975.

KINGHORN, B.; WERF, J. V. D.; RYAN, M. **Melhoramento animal: uso de novas tecnologias**. Piracicaba: FEALQ, 2006. 367p.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat ageing. **Meat Science**, n. 36, p.

93-104, 1994.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. **Meat Science**, v. 43, p. 193-201, 1996.

KONING, D.J.; et al. Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 7947-7950, 2000.

KONONOFF, P. J.; et al. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 927-932, 2005.

KOOTS, K.R.; et al. Analyses of published genetic Parameters estimates for beef production traits.1.Heritability. **Animal Breeding Abstract**, v. 62, p. 309-338, 1994.

KOURY FILHO, W.; et al. Estimativas de herdabilidade e correlações para escores visuais, peso e altura ao sobreano em rebanhos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2362-2367, 2009.

KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KREMENSKOY, M.; et al. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine Fetuses. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, p. 277-285, 2006.

KUEHN, C.; et al. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (*DGAT1*) gene on milk production traits in German Holstein cows. **BMC Genetics**, v. 8, p. 62, 2007.

KURREEMAN, F. A.; et al. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 1755-1762, 2004.

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, p. 235-258, 2001.

KWOK, P. Y.; CHEN, X. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 5, p. 43-60, 2003.

LANDE-DINER, L; et al. Role of DNA methylation in stable gene repression. **Journal of Animal Science**, v. 282, p. 12194-12200, 2007.

LARKIN, D.M. Status of the Cattle Genome Map. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 1-8, 2011.

LAUREANO, M. M. M.; et al. Estimativas de herdabilidade e tendências genéticas para características de crescimento e reprodutivas em bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 143-152, 2011.

LEE, D. K.; WANG, K. C.; ROEDER, R. G. Functional significance of the TATA element major groove in transcription initiation by RNA polymerase II. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 21, p. 4338-45, 1997.

LEMON, B.; TJIAN, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. **Genes & Development**, v. 14, p. 2551-2569, 2000.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human gene are microRNA targets. **Cell**, v. 120, p. 15-20, 2005.

LI, C.; et al. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1-7, 2004.

LI, F.; MARTIENSSEN, R.; CANDE, W. Z. Coordination of DNA replication and histone modification by the Rik1–Dos2 complex. **Nature**, v. 475, p. 244–248, 2011.

LIGHT, N.; et al. The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture in six bovine muscles. **Meat Science**, v. 13, p. 137 – 149, 1985.

LIVAK, K. J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and 5' nuclease assay. **Genetics analysis: biomolecular engineering**, v. 14, p. 143-149, 1999.

LO, H. S.; et al. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. **Genome Research**, v. 13, p. 1855-1862, 2003.

LÔBO, R. B.; et al. **Princípios e resultados de pesquisas científicas no Programa Nelore Brasil**. Ribeirão Preto: ANCP, 2008. p. 15-26.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. **Biologia Celular e Molecular**. 5.ed. São Paulo: ARTMED, 2005. p. 390-394.

LOENING, U. E. The Fractionation of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 251-257, 1967.

LONG, T.E.; JOHNSON, R.K.; KEELE, J.W. Effects of errors in pedigree on three methods of estimating breeding value for litter size, backfat and average daily gain in swine. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4069-4078, 1990.

LOPES, M. A.; SANTOS, G. Principais dificuldades encontradas pelas certificadoras para rastrear bovinos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1552-1557, 2007.

LUCHIARI, F. A. Produção de carne bovina no Brasil, qualidade, quantidade ou ambas? In: SIMBOI. Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, 2006, Brasília, **Anais...** DF. Brasília, DF: SIMBOI, 2006.

LUSK, J. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1865-1872, 2007.

LV, Y.; et al. Association between polymorphisms in the *SLC27A1* gene and milk production traits in Chinese Holstein cattle. **Animal Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2011.

McDANIEL, T. G. MicroRNA: Mechanism of gene regulation and application to livestock. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. E21-E28, 2009.

MAEDA, M.; et al. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**, v. 34, n. 5, p. 290-298, 1989.

MAGEE, D. A.; et al. DNA sequence polymorphisms in a panel of eight candidate bovine imprinted genes and their association with performance traits in Irish

Holstein-Friesian cattle. **BMC Genetics**, v. 11, p. 93, 2010.

MAGNABOSCO, C. U.; CORDEIRO, C. M. T.; TROVO, J. B. F.; MARIANTE, A. S.; LÔBO, R. B. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1997.

MAKI, M., et al. Repetitive region of calpastatin is a functional unit of the proteinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 143, p. 300–308, 1987.

MARGULIES, M.; et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

MARQUES, D.C. **Criação de bovinos**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1976.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **PNAS.**, v. 74, p. 560–564, 1977.

MCDANEL, T. G. MicroRNA: Mechanism of gene regulation and application to livestock. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. E21-E28, 2009.

MENEZES L. F. G.; et al. Composição Física da Carcaça e Qualidade da Carne de Novilhos de Gerações Avançadas do Cruzamento Alternado entre as Raças Charolês e Nelore, Terminados em Confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**; v. 34, n. 3, p. 946-956, 2005.

MOORE, S. S.; et al. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1919-1925, 2003.

MORISON, I. M.; REEVE, A. E. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 10, p. 599-1609, 1998.

MORISON, I. M.; PATON, C. J.; CLEVERLEY, S. D. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 1, p. 275-276, 2001.

MORLEY, M.; et al. Genetics analysis of genomic-wide variation in human gene expression. **Nature**, v. 430, p. 743-747, 2004.

MORRIS, C. A.; et al. Genotypic effects of *calpain 1* and *calpastatin* on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. **Animal Genetics**, v. 37, p. 411-414, 2006.

NEUGEBAUER, N.; et al. Evidence for parent-of-origin effects on genetic variability of beef traits. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 523-532, 2010.

NEZER, C.; et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. **Nature Genetics**, v. 21, n. 2, p. 155-156, 1999.

NICIURA, S. C. M.; et al. Polymorphism and parent-of-origin effects on gene expression of *CAST*, leptin and *DGAT1* in cattle. **Meat Science**, v. 90, p. 507-510, 2012.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: Effect of marbling on beef tenderization. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 93-104, 1999.

NKRUMAH, J. D.; et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feed behavior, carcass quality and body composition. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 211-219, 2004.

NKRUMAH, J. D.; et al. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 20-28, 2005.

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.

O'KELLY, J.C.; SPIERS, W.C. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in genetically different types of calves in early life. **The Journal of parasitology**, v. 62, p. 312-317, 1976.

OLEKSIK, M. F.; CHURCHILL, G. A.; CRAWFORD, D. L. Variation in gene expression within and among natural populations. **Nature Genet.** v. 32, p. 261-266, 2002.

ONO, R.; et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. **Genomics**, v. 73, n. 2, p. 232-237, 2001.

ORPHANIDES, G., LAGRANGE, T.; REINBERG, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. **Genes & Development**, v. 10, p. 2657-2683, 1996.

ORRÚ, L.; et al. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. **Meat science**, v. 87, n. 4, p. 344-348, 2011.

PAGE, B. T.; et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.

PAGE, B. T.; et al. Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3474–3481, 2004.

PANETO, J. C. C.; et al. Causas de variação nos preços de bovinos Nelore elite no Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 215-220, 2009.

PALACIOS, R.; et al. Allele-specific is widespread across the genome and biological processes. **Plos One**, v. 4, n. 1, e4150, 2009.

PARKER-KATIRAE, L.; et al. Dynamic variation in allele-specific gene expression of Paraoxonase-1 in murine and human tissues. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 21, p. 3263–3270, 2008.

PASTINEN, T.; HUDSON, T. J. Cis-acting regulatory variation in the human genome. **Science**, v. 306, p. 647-650, 2004.

PATTEN, M. M.; HAIG, D. Reciprocally imprinted genes and the response to selection on one sex. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1389-1394, 2008.

PEÑA, C. D. O.; QUEIROZ, S. A.; FRIES, L. A. Comparação entre Critérios de Seleção de Precocidade Sexual e a Associação destes com Características de Crescimento em Bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 93-100, 2001.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 703-702, 2002.

PINTO, L. F. B.; et al. Association of SNPs on *CAPN1* and *CAST* genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1432-1442, 2010.

PINTOS, D.; CORVA, P. M. Association between molecular markers for beef tenderness and growth traits in Argentinian Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 42, p. 329-332, 2011.

PIPER, E. K.; et al. Immunological Profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle Infested with the Cattle Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p. 1074-1086, 2009.

POLAQUINI, L. E. M.; SOUZA, J. G.; GEBARA, J. J. Transformações técnico-produtivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 321-327, 2006.

PRINGLE, T. D.; et al. Carcass characteristics, the Calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955–2961, 1997.

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

REGITANO, L. C. A. Introdução ao uso de marcadores moleculares In: Regitano, L. C. A; Coutinho L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p. 12-24.

REGITANO, L. C. A., et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**, on-line. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.

RESTLE, J.; QUADROS, R. B.; VAZ, F. N. Terminação em confinamento de novilhos de diferentes genótipos de Hereford x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.125-130, 2000.

RESTLE, J.; et al. Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterneiradas aos três ou sete meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 499-507, 2001.

RISCH, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, v. 405, p. 847-56, 2000.

ROHRER, G. A.; et al. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 231-45, 1994.

ROSSATO, L. V.; et al. Parâmetros físico-químicos e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Angus e Nelore terminados em pastagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1127-1134, 2010.

RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 228-237, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHADT, E. E.; TURNER, S.; KASARSKIS, A. A window into third-generation sequencing. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 2, p. 227-240, 2010.

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.

SCHENKEL, F. S.; et al. W. 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.

SEIDEMAN, S. C.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J. D. Factors associated with tenderness in young bulls. **Meat science**, v. 20, p. 281-291, 1987.

SHACKELFORD, S. D.; et al. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69 p. 171, 1991.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatina activity,

intramuscular fat content, Warner- Brastzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 4, p. 857-863, 1994.

SILVA, A. M.; et al. Herdabilidades e correlações genéticas para peso e perímetro escrotal de machos e características reprodutivas e de crescimento de fêmeas, na raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 2223-2230, 2000.

SLEUTELS, F. BARLOW, D. P.; LYLE, R. The uniqueness of the imprinting mechanism. **Genes & Development**, v. 10, p. 229-233, 2000.

SMITH, H. O.; WELCOX, K. W. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 51, n. 2, p. 379-391, 1970.

SMITH, T. P. L.; et al. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2589–2594, 2000.

SMITH, G.C. Factors affecting the palatability of beef. In: FUTURE BEEF OPERATIONS SEMINAR. 2001. Proceedings... Disponível em: <<http://ansci.colostate.edu/ran/beef/ndex.html>> Acesso em: 19/09/2011.

SPENCER, H. G. Effects of genomic imprinting on quantitative traits. **Genetica**, v. 136, p. 285-293, 2009.

SOLBERG, T. R.; et al. Genomic selection using different marker types and densities. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2447-2454, 2008.

STONE, R. T.; et al. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1379–1384, 1999.

STONE, R. T. 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.

SUN, C.; et al. Allelic imbalance (AI) identifies novel tissue-specific cis-regulatory variation for human UGT2B15. **Human Mutation**, v. 31, n. 1, p. 99-107, 2010.

SUN, C.; et al. Differential allelic expression of c.1568C>A at UGT2B15 is due to variation in a novel cis-regulatory element in the 3'UTR. **Gene**, v. 481, n. 1, p. 24-28, 2011.

SUZUKI, S.; et al. Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting. **PLoS Genetic**, v. 3, n. 4, p. e55, 2007.

TAMBASCO, D. D.; et al. Molecular characterization of a Nellore beef cattle sample using microsatellites and candidate genes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1044-1049, 2000.

TANG, K.; FU, D. J.; et al. Chip-based genotyping by mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 18, p. 10016-20, 1999.

TELLES, M. P. C.; et al. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 87-95, 2001

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.

TOWNSEND, J. P.; CAVALIERI, D.; HARTL, D. L. Population Genetic Variation in Genome-Wide Gene Expression. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 6, p. 955-963, 2003.

VALOUEV, A.; et al. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. **Genome Research**, v. 18, n. 7, p. 1051-1063, 2008.

VAN EENENNAM, A. L.; et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 891-900, 2007.

VAN LAERE, A. S.; et al. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, v. 425, p. 832-836, 2003.

VAZ, F. N.; et al. Qualidade e Composição Química da Carne de Bovinos de Corte Inteiros ou Castrados de Diferentes Grupos Genéticos Charolês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 518-525, 2001.

VAZ, F. N.; et al. Efeitos de Raça e Heterose na Composição Física da Carcaça e na Qualidade da Carne de Novilhos da Primeira Geração de Cruzamento entre Charolês e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 376-386, 2002.

VENERONI, G. B. **Associação de SNPS em genes candidados e de regiões cromossômicas com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim**. 2010, 138p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2010.

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.

VERBEKE, W.; et al. European beef consumers interest in a beef eating-quality guarantee: insights from a qualitative study in four EU countries. **Appetite**, v. 54, p. 289-96, 2010.

VILLANUEVA, B.; et al. Benefits from marker-assisted selection under an additive polygenic genetic model. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1747-1752, 2005.

WANG, Y.; et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 4, p. 657-662, 1995.

WEAVER, A. D.; BOWKER, B. C.; GERRARD, D. E. Sarcomere length influences postmortem proteolysis of excised bovine semitendinosus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1925-1932, 2008.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **The American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

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.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J. D. Effects of calcium chloride injection and hot boning on the tenderness of round muscles. **Journal of Animal**

**Science**, v. 69, p. 4871–4875, 1991.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement.**

1995. Disponível em:

<<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/54380530/protocols/ShearForceProcedures.pdf>>. Acesso em: 30/9/2011.

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.

WIGGANS, G. R.; et al. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3431–3436, 2009.

WITTKOPP, P.; HAERUM, B.; CLARK, A. G. Evolutionary changes in cis and trans gene regulation. **Nature**, v. 430, p. 85-88, 2004.

WRAY, G. A.; et al. The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 1377-1419, 2003.

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

YAN, H.; et al. Allelic variation in human gene expression. **Science**, v. 297, p. 1143, 2002.

YAN, H.; ZHOU, W. Allelic variations in gene expression. **Current Opinion in Oncology**, v. 16, p. 39-43, 2004.

ZAITOUN, I.; KHATIB, H. Comparative genomic imprinting and expression analysis of six cattle genes. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 25-32, 2008.

ZANINE, A. M.; SILVA, C. C. Mercado internacional da carne bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** -Garça, ano 3, n. 06, p. 1-9, jan/jun. 2006.

ZHANG, F. W.; et al. *Imprinted* status of pleomorphic adenoma gene-like I and paternal expression gene 10 genes in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 4, p. 886-90, 2007.