

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

ASSOCIAÇÃO DA REGIÃO CENTROMÉRICA DO
CROMOSSOMO 14 COM ESPESSURA DE GORDURA EM
BOVINOS DA RAÇA CANCHIM

GISELE BATISTA VENERONI

SÃO CARLOS – SP

2007

GISELE BATISTA VENERONI

(Bióloga)

**ASSOCIAÇÃO DA REGIÃO CENTROMÉRICA DO CROMOSSOMO 14 COM
ESPESSURA DE GORDURA EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM**

ORIENTADORA:

Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

2007

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

V456ar

Veneroni, Gisele Batista.

Associação da região centromérica do cromossomo 14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim / Gisele Batista Veneroni. -- São Carlos : UFSCar, 2007. 68 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Biologia molecular. 2. Marcador molecular. 3. Bovino de corte. 4. Gordura subcutânea. 5. Seleção assistida por marcadores - MAS. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

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

“ASSOCIAÇÃO DA REGIÃO CENTROMÉRICA DO
CROMOSSOMO 14 COM ESPESSURA DE GORDURA EM
BOVINOS DA RAÇA CANCHIM”.

Gisele Batista Veneroni

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Submetida a defesa pública no dia 26 / 02 /2007,

Tendo sido? **APROVADA**

Presidente: Profa. Dra. Luciana C. de Almeida Regitano
Luciana C. de Almeida Regitano

Membros: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama
Sílvia Nassif Del Lama

Prof. Dr. Paulo Bahiense Ferraz Filho
Paulo Bahiense Ferraz Filho

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, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
Homologado na Reunião Ordinária da CPG,
em / /2007.

Presidente:.....

Membros:.....

.....

.....

.....

SÃO CARLOS – SP
2007

À Leandro de Souza Santos,

Pelo incentivo,

Apoio,

Compreensão,

Carinho

e Atenção

Com Amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano** pela orientação, paciência, apoio e amizade;

Agradeço o **Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar** pelos ensinamentos, apoio e auxílio nas análises estatísticas assim como ao **Prof. Dr. Henrique Nunes Oliveira**;

À **CAPES** pelo apoio financeiro para a realização do trabalho;

Aos **professores** do programa de pós-graduação de Genética e Evolução da UFSCAR pelos ensinamentos, assim como as **secretárias** do programa pela atenção e amizade;

Aos meus pais, **Paulo e Lourdes** e, às minhas irmãs **Fernanda e Jéssica** por acreditar em mim;

À minha “vizinha de kit” e amiga **Viviane** por todo o apoio, amizade e auxílios;

À todos do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Em especial à **Sarah** pela grande amizade e auxílio em todos os momentos, ao **Gustavo** pelos ensinamentos, amizade e auxílio bancada, ao **João José e Marcelo** também pelos ensinamentos, amizade e momentos de descontração, à **Liliane, Rogério, Adriana, André e Rodrigo** pelo companheirismo e pelas risadas. Amo muito todos vocês !

Ao **Leandro** pelo amor e apoio, talvez o maior incentivador e motivador de minhas realizações.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Bovinocultura.....	13
1.2. Importância da cobertura de gordura na carcaça de bovinos.....	17
1.3. Utilização da ultra-sonografia para predição de características de carcaça....	19
1.4. Utilização de marcadores moleculares no melhoramento animal.....	21
1.5. Marcadores genéticos.....	23
1.5.1. Marcador morfológico.....	24
1.5.2. Marcador molecular.....	25
1.5.2.1. Marcadores de proteínas.....	25
1.5.2.2. Marcadores de DNA.....	26
1.6. QTL e Genes Candidatos para deposição de gordura	33
2. HIPÓTESES	39
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Amostra.....	40
4.2. Obtenção da espessura de gordura.....	41
4.3. Obtenção das amostras de sangue e sêmen.....	41
4.4. Extração de DNA.....	42
4.4.1. Extração de DNA de amostras de sangue.....	42
4.4.2 Extração de DNA de amostras de sêmen.....	43
4.5. Quantificação do DNA.....	44
4.6. Marcadores moleculares.....	44
4.7. Genotipagem para o marcador <i>Tg5</i>	45
4.7.1. Amplificação.....	45
4.7.2. Digestão dos produtos amplificados.....	46
4.7.3. Análises dos genótipos.....	47

4.8. Genotipagem para os microssatélites <i>CSSM066</i> e <i>ILTS011</i>	48
4.8.1. Amplificação.....	48
4.8.2. Análises dos genótipos.....	49
4.9. Análises estatísticas.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Animal da raça Canchim.....	16
Figura 2- Imagem gerada pelo aparelho de ultra-som para medida de espessura de gordura subcutânea lombar.....	20
Figura 3- Ilustração de parte da região centromérica do BTA14 com a localização dos marcadores utilizados no estudo.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência alélica dos marcadores <i>CSSM066</i> , <i>TG</i> e <i>ILSTS011</i> consideradas nas análises.....	52
Tabela 2. Resultados das análises de máxima verossimilhança restrita para espessura de gordura, de acordo com o marcador.....	53
Tabela 3. Frequência genotípica do marcador microssatélite <i>CSSM066</i> , médias e erros padrões de espessura de gordura de animais com diferentes genótipos de <i>CSSM066</i>	54
Tabela 4. Resultados da análise de efeito de substituição alélica do microssatélite <i>CSSM066</i> sobre a espessura de gordura em Canchim.....	55

Associação da região centromérica do cromossomo 14 com espessura de gordura em bovinos da raça canchim

RESUMO

Canchim é uma raça sintética que tem sido usada na indústria de gado de corte como uma alternativa para intensificação da produção. No entanto, esta raça possui pouca gordura de cobertura. Desse modo pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a deposição de gordura nessa raça. Essas pesquisas incluem a procura por marcadores moleculares que podem auxiliar a identificação de animais com maior potencial genético para a característica. Em várias populações bovinas a região centromérica do cromossomo 14 foi associada com deposição de gordura. O gene da *tireoglobulina* está localizado à 4,46 Mb nesse cromossomo e relatos descrevem a influência de um polimorfismo na seqüência 5' líder desse gene sobre o marmoreio e espessura de gordura. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito desse polimorfismo no gene da *tireoglobulina*, assim como de dois marcadores microssatélites que flanqueiam esse gene, *CSSM066* (2,95 Mb) e *ILSTS011* (6,93 Mb) sobre a espessura de gordura em bovinos da raça Canchim. Quinhentos e setenta e dois animais, de dois grupos genéticos (MA e CA), criados em duas fazendas e pertencentes à 64 famílias de meio-irmãos foram avaliados. Associações dos genótipos dos marcadores com as medidas fenotípicas (espessura de gordura) foram analisadas por um modelo misto. Os resultados mostraram que o marcador microssatélite *CSSM066* teve efeito significativo sobre a espessura de gordura nas populações estudadas. No

entanto, esta característica não foi significativamente associada com o polimorfismo do gene da *tireoglobulina* e com o marcador microssatélite *ILSTS011*, o que sugere que outro gene situado na região centromérica do cromossomo 14 de bovinos deva ser responsável pela variação da característica. Novos estudos merecem ser realizados próximos ao marcador *CSSM066*, que indicou associação com espessura de gordura em nosso estudo, a fim obter informações que possam ser incorporadas em programas de melhoramento.

**Association of centromeric region of chromosome 14 with backfat
thickness in Canchim cattle**

ABSTRACT

Canchim is a synthetic breed that has been used in the beef cattle industry as an alternative for production intensification. However, this breed has poor fat deposition. Therefore researches have been done with the objective of increasing the fat deposition in this breed. These efforts include search for molecular markers that could aid the identification of animals with greater genetic potential for this trait. In several bovine populations the centromeric region of chromosome 14 was related with fat deposition. The *thyroglobulin* gene is located at 4.46 Mb in that chromosome and reports describe the influence of a polymorphism in the 5' leader sequence of that gene on marbling and fat thickness. The scope of this work was to analyze the effect of this polymorphism in the *thyroglobulin* gene as well as of two flanking microsatellite markers, *CSSM066* (2.95 Mb) and *ILSTS011* (6.93 Mb) on backfat thickness of Canchim beef cattle. Five hundred and seventy two animals of two groups genetic (CA and MA), raised in two farms and pertaining to 64 half-sib families were evaluated. Associations of marker genotypes with phenotypic measures (backfat thickness) were analyzed by a mixed model. The results showed that microsatellite marker *CSSM066* had a significant effect on fat thickness in the studied populations. However, this trait was not significantly associated with the polymorphism of the *thyroglobulin* gene and with the microsatellite marker *ILSTS011*, what suggests that another gene located in the centromeric region

of chromosome 14 of bovine can be responsible for the variation on this trait. The genome region close to CSSM066 marker, that indicated association with fat thickness in our study, should be further investigated to produce information that may be incorporated in improvement programs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bovinocultura

No cenário mundial o Brasil apresenta o segundo maior rebanho comercial de bovinos (170 milhões de animais) e é o segundo maior produtor de carne bovina (8,4 milhões de toneladas de equivalente-carcaça) (ANUALPEC, 2005). Atualmente a cadeia produtiva da pecuária nacional vem influenciando de forma significativa a economia do país, sendo que no primeiro semestre de 2006 as exportações brasileiras totalizaram 709.659 toneladas, com receita cambial de US\$ 1.716,89 milhão no geral, entre carne bovina *in natura*, industrializada e miúdos (Negrelli, Fonte: Secex/MDIC, elaboração Beef Point 2006).

No Brasil o gado zebu (*Bos indicus*) compõe a maior parte dos rebanhos (cerca de 110 milhões) se comparado com o gado europeu (*Bos taurus*), que é representado por cerca de 60 milhões de cabeças no país e, se restringe à região sul, além de algumas áreas das regiões sudeste e centro-oeste que apresentam climas de altitude. Este contexto pode, talvez, ser explicado pelo fato de que o gado zebu tenha suas origens em lugares cujo clima é parecido com o clima do Brasil, sendo assim não há necessidade de adaptações nos sistemas de produção, o que poderia inviabilizar o negócio.

O Zebu foi trazido para o Brasil no século passado e adaptou-se muito bem ao nosso país. A origem do gado zebu ainda é bastante discutida. Muitos autores (Epstein H. 1971, Payne W. J. A. 1991) acreditam que a maioria das

raças de bovinos são oriundas do extinto *Bos primigenius*, o qual possuía três raças: *Bos primigenius namadicus* (Ásia), *Bos primigenius opisthonomus* (Norte da África), e *Bos primigenius primigenius* (Europa). É amplamente aceito que os taurinos foram domesticados a partir do *Bos primigenius namadicus* (Clutton-Brock J. 1989). Muitos autores acreditam que as raças zebuínas se desenvolveram a partir de raças taurinas após o evento de domesticação. Algumas características do *Bos indicus* (como por exemplo, características de resistência) podem ter sido desenvolvidas durante a permanência dos bovinos em desertos do Irã (Epstein H. 1971, Payne W. J. A. 1991). No entanto, Loftus *et al.* (1994) em um estudo com DNA mitocondrial observaram resultados inconsistentes com a teoria de uma única origem para todas as raças de bovinos. Nesse mesmo estudo de Loftus *et al.* (1994) não foi encontrada diferenciação entre raças zebuínas e taurinas africanas. Ambas apresentaram baixa divergência de raças taurinas europeias e alta divergência em relação às raças indianas.

Sabe-se que os representantes dos grupos *Bos indicus* e *Bos taurus* possuem características e exigências contrastantes, que fazem com que os representantes de cada classe apresentem seu maior grau de produção em ambientes também contrastantes. Segundo Marques (1976), algumas das principais diferenças entre o gado Zebu e o gado europeu são:

_ *Bos indicus*: alta capacidade de tolerância ao calor, alta capacidade de resistência a ecto e endoparasitas, alta fertilidade (mesmo em climas quentes), aparelho digestivo com menor capacidade, boa cobertura de gordura subcutânea e níveis inferiores de qualidade de carne, principalmente relacionados à maciez das fibras musculares.

Bos taurus: baixa capacidade de tolerância ao calor tropical, baixa capacidade de resistência aos ecto e endoparasitas, exigente quanto às pastagens e seu valor nutritivo, aparelho digestivo com maior capacidade e elevados índices de qualidade de carne.

Uma ferramenta que visa aproveitar as qualidades econômicas do gado europeu e a comprovada resistência do gado Zebu é o cruzamento, cujo objetivo seria criar um bovino altamente produtivo e resistente às condições tropicais. Esse foi um dos pressupostos que levou à criação da raça Canchim. A formação dessa raça foi iniciada em 1940, por iniciativa do médico veterinário e zootecnista Dr. Antônio Teixeira Vianna e, consiste no cruzamento da raça Charolesa (*Bos taurus*) com animais de raças zebuínas (*Bos indicus*). Por meio de cruzamentos alternados, obtiveram-se mestiços com 5/8 Charolês e 3/8 Zebu, de cujo acasalamento resultou o Canchim (Alencar, 1985).

Animais da raça Canchim (Figura 1) são bovinos dóceis, de temperamento ativo, precoces, rústicos, bastante resistentes aos ectoparasitos e ao calor, elevada capacidade digestiva para aproveitamento de forragens grosseiras, boa adaptação ao regime exclusivo de campo, conformação ideal para o corte, produção abundante de carne e pouca gordura de cobertura (Marques, 1976).



Figura 1. Animal da raça Canchim

Atualmente no Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (EMBRAPA – CPPSE) existem duas linhagens da raça Canchim, que diferem quanto às raças parentais e composição genética. O grupo genético denominado MA começou a ser formado a partir de 1987. Ele é um mestiço resultante do cruzamento Charolês X $\frac{1}{2}$ Canchim + $\frac{1}{2}$ Nelore e possui 65,6% de Charolês. O grupo genético no presente trabalho denominado CA, começou a ser formado a partir de 1953, através de cruzamentos entre $\frac{5}{8}$ charolês + $\frac{3}{8}$ zebu X $\frac{5}{8}$ charolês + $\frac{3}{8}$ zebu. A partir de 1987, o zebuino utilizado passou a ser somente Nelore, o qual, das raças zebuínas brasileiras, é das que apresentam maior produtividade. Hoje em dia existem animais CA que podem ser provenientes de três tipos de cruzamentos: MA x MA que produz um animal CA com 65,6% Charolês, MA x CA que produz um animal CA com 64,05% Charolês e CA x CA que produz um animal CA com 62,5% Charolês.

1.2. Importância da cobertura de gordura na carcaça de bovinos

Segundo Perotto *et al.* (1999), um conjunto de características determina o valor comercial da carcaça bovina, dentre as quais se destacam: peso, gordura de cobertura (gordura subcutânea) e gordura intramuscular (marmoreio). Espessura de gordura, quantidade total e distribuição de gordura têm grande impacto sobre a qualidade de carcaça e de carne em gado de corte (Wheeler *et al.* 1994, Lozeman *et al.* 2001) e são fatores importantes na determinação de tipos de carcaça. A maioria dos mercados, apesar de preocupados com a saúde e com os riscos potenciais do consumo excessivo de gordura, demanda carcaças com teores de gordura variando de 20%-22% a 36%-38%. O padrão de espessura de gordura desejável pela indústria frigorífica é da ordem de 3 a 6 mm de gordura, com uma espessura mínima de 2 mm.

Uma quantidade insuficiente de cobertura de gordura (abaixo de 3 ou 2 mm) pode gerar problemas, depreciando a qualidade da carne, como por exemplo, o escurecimento da parte externa dos músculos causado pelo resfriamento nas câmaras frigoríficas, o encurtamento das fibras musculares e a maior perda de água pelo frio (geralmente quando a carcaça é resfriada em alta velocidade), que podem contribuir de modo significativo para a redução da maciez da carne (Felício & Norman 1978, Sainz 1996). É sabido também, que a gordura é importante componente do sabor da carne bovina. Aalhus *et al.* (2001) observaram que as grandes diferenças na maciez da carne entre animais com diferentes graus de acabamento foram devido ao fato de que a gordura de cobertura e marmoreio reduziram a dissipação de calor, evitando o choque pelo frio durante o processo de resfriamento.

Os principais atributos de qualidade da carne bovina valorizados pelo consumidor, segundo Leidenz (2000) e Fava Neves *et al.* (2003), são a palatabilidade (representada por maciez, sabor e suculência), a aparência (cor, firmeza e marmorização), a conveniência (produto cortado ou fatiado), a nutrição e a saúde (teores de ferro, zinco, colesterol, etc.) e a segurança alimentar (ausência de patógenos e de resíduos). No Brasil, apesar de todos estes fatores terem importância no ato da compra de alimentos, o quesito preço ainda é o forte balizador do consumo.

A quantidade de gordura na carne influencia a maioria das características que o consumidor valoriza. No entanto, a cobertura de gordura em excesso (acima de 7 mm), é indesejável e praticamente sem valor comercial, uma vez que um excesso de gordura na carne diminui a porção comestível desta e não agrada aos padrões de saúde e dieta adotados no mundo atual, desagradando o consumidor. Nichos de mercado muito pequenos, como o mercado japonês, se interessam por cortes cárneos com gordura excessiva (Sainz 1996).

Além das características citadas acima que podem interferir na qualidade e maciez da carne, existem outros fatores que também o fazem, como a idade de abate do animal, o tipo de manejo e alimentação e, um dos fatores mais significativos, o genótipo ou raça. Tratando-se deste último aspecto, as raças zebuínas e seus cruzamentos são reconhecidos por produzirem carne mais rígida do que as raças taurinas (Moletta & Restle 1996, Vaz *et al.* 2002). No que diz respeito aos rebanhos brasileiros, sabe-se que em sua maioria são compostos de gado zebu e cruzados destes. Segundo Oliveira (2000) este fato, aliado a globalização e a ampliação da possibilidade de exportação de carne fresca, pode fazer com que o problema de maciez da carne coloque o Brasil

em risco de ficar conhecido como grande produtor de carne de baixa qualidade (dura, escura, etc.). De acordo com Thompson (2002), quando a genética e manejo são bem conhecidos e controlados, o marmoreio é uma fonte importante de variação na maciez e sabor da carne.

Diante deste contexto, fica evidente que o Brasil necessita investir em pesquisas que envolvam melhoria da qualidade da carne bovina, para que não fique de fora do mercado, principalmente, do mercado internacional.

1.3. Utilização da ultra-sonografia para predição de características de carcaça

Em um programa de melhoramento de características de carcaça é necessário o conhecimento sobre a característica em questão, se existe variação dessa característica na população em estudo e avaliação fenotípica da característica nos indivíduos. Uma forma de determinação de algumas características, de maneira rápida, não invasiva e com boa acurácia, pode ser obtida por ultra-sonografia. Vários pesquisadores empregaram esta técnica para medir características de composição corporal de animais vivos (Kempster & Owens 1981, Simm 1983). Segundo Wilson (1992) a utilização da ultra-sonografia para estimar quantidade de gordura (Figura 2) e a proporção de músculo é mais acurada que o peso vivo e outras características de fácil mensuração.

A técnica de ultra-sonografia pode auxiliar a identificação de animais com melhor cobertura de gordura, cuja informação pode ser utilizada em programas

de avaliação genética, que visam a identificação de indivíduos superiores para uma dada característica.

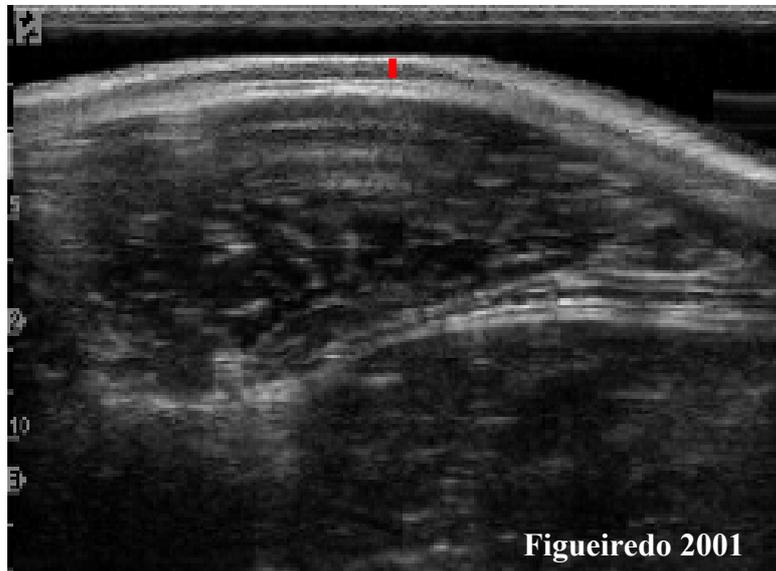


Figura 2. Imagem gerada pelo aparelho de ultra-som para medida de espessura de gordura subcutânea lombar. ■ = medida de espessura de gordura

A utilização da ultra-sonografia para a avaliação de qualidade de carcaça apresenta muitas vantagens, como a análise precoce de animais para seleção sem necessidade de abate, os resultados podem estar disponíveis antes da primeira estação de monta e ainda, o custo da avaliação individual é inferior ao custo do teste de progênie, com resultados equivalentes. Em processos de seleção, para o cálculo de herdabilidade de algumas características, como por exemplo, área de olho de lombo e cobertura de gordura, as medidas de ultra-som são até superiores às medidas diretas (Sainz & Araújo 2002).

1.4. Utilização de marcadores moleculares no melhoramento animal

A biologia molecular vem complementando os métodos tradicionais de melhoramento que têm por objetivo selecionar e cruzar indivíduos visando aumentar a frequência de alelos associados às características fenotípicas desejáveis, ocasionando um aumento da produção.

A maioria das características de interesse econômico é quantitativa e, supostamente, determinada por muitos genes. Apesar da existência de genes principais, a maioria da variação deve ser controlada por um grande número de genes, cada um com pequeno efeito sobre o caráter (Massey & Georges 1992).

Uma das ferramentas utilizadas pela biologia molecular na localização de regiões cromossômicas que contribuem para a variação de um caráter quantitativo é o uso de marcadores genéticos. O uso de marcadores em desequilíbrio de ligação com genes que influenciam características de interesse econômico (Williams 2005) ou o uso de marcadores diretos, pode auxiliar no processo de seleção. Uma prática que se utiliza dessa ferramenta é a Seleção Assistida por Marcadores (MAS).

A Seleção Assistida por Marcadores pode aumentar a acurácia da seleção realizada com base em princípios de genética quantitativa. As principais vantagens da MAS são predição do valor genético para características difíceis de mensurar precocemente, não sendo necessário aguardar o desenvolvimento completo do indivíduo para que se possa realizar seleção; determinação do efeito individual de cada loco de um caráter quantitativo, além de determinação do quanto desse caráter é explicado por um ou mais

marcadores; seleção para características difíceis de serem medidas ou de conseguir progresso genético, por possuírem baixa herdabilidade (Davis & Denise, 1998) e identificação e descarte de animais portadores de doenças deletérias ou que diminuam a produção. Características como habilidade materna, resistência a doenças, rendimento e qualidade de carcaça, fertilidade, eficiência reprodutiva e características limitadas pelo sexo são alguns exemplos para aplicação da MAS (Eenennam 2004).

A Seleção Assistida por Marcadores deve ser realizada concomitantemente com a Seleção Tradicional, uma vez que dar ênfase a somente um ou poucos marcadores pode ocasionar perda da variabilidade em outros *loci*, o que poderá dificultar e impedir futuras seleções e ainda, ocasionar efeito “carona” e fixação de alelos desfavoráveis em outros *loci*.

Atualmente existem disponíveis no mercado alguns testes comerciais baseados em marcadores moleculares para características economicamente importantes (Eenennaam 2004) como o teste TenderGENE™ (Frontier Beef Systems) que analisa duas variações na região codificadora do gene da calpaína, enzima responsável pela degradação das fibras musculares e, o teste GeneSTAR Tenderness (Genetic Solutions) que se baseia em um polimorfismo da calpastatina, proteína responsável pela modulação da degradação pos-mortem das fibras musculares pela calpaína, que são testes indicativos de maciez. A combinação dos dois testes é oferecida pela última empresa com o nome de GeneSTAR Tenderness 2.

Antes da utilização desse tipo de teste deve ser feita uma avaliação da eficácia do teste no rebanho em estudo, uma vez que os efeitos desses genótipos podem variar entre as populações, pois os efeitos de substituição de

alelos de um QTL (Quantitative Trait *Loci*) são parâmetros intrínsecos de cada população assim como a fase de ligação. Deve-se também verificar se há variação para o marcador em questão na população em que se pretende aplicar o teste e, ainda considerar a existência de interações não alélicas com os demais genes que compõem o genoma da espécie, que podem exibir combinações diferentes daquelas em que o QTL foi descrito. A interação do genótipo com o ambiente deve ser analisada com cautela, pois os QTLs mapeados em experimentos conduzidos no hemisfério norte podem não ser importantes para as condições ambientais de criação nos trópicos, que são distintas do ponto de vista climático, de incidência de doenças e de manejo nutricional (Regitano *et al.* 2006).

A identificação de marcadores associados à caracteres quantitativos tem sido feita de duas maneiras: utilização de marcadores aleatórios para construção de mapas genéticos saturados, que são empregados em análises de intervalos na identificação de QTLs (Geldermann 1975) ou detecção de polimorfismos em genes que podem estar diretamente relacionados com a característica de produção, denominados genes candidatos.

1.5. Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos são características que permitem a inferência do genótipo do indivíduo com base em seu fenótipo. De preferência devem ser neutros com relação à adaptação e a sobrevivência do indivíduo, possuir variabilidade dentre os indivíduos da população em estudo, preferencialmente

codominantes, estáveis ao longo do desenvolvimento e possuir herança mendeliana simples (Regitano 2001).

Segundo Liu (1998) há três tipos de marcadores genéticos: marcadores morfológicos, marcadores baseados em proteínas e marcadores baseados em ácido desoxirribonucleico (DNA). Já para Ramalho *et al.* (2001) os marcadores genéticos são divididos em apenas duas classes: morfológicos e moleculares. Por motivos didáticos adotaremos a segunda classificação.

1.5.1. Marcador morfológico

Marcadores morfológicos foram os primeiros tipos de marcadores utilizados por geneticistas, como Sax (1923). Este tipo de marcador consiste em um fenótipo de fácil identificação, geralmente determinado por um único gene e herdabilidade próxima de 1,0, podendo estar intimamente ligado ao gene de interesse ou constituir tal gene.

A utilização de marcadores morfológicos possui baixo custo, no entanto, apresenta a limitação de acontecer na natureza em número reduzido, conseqüentemente não são suficientes para marcar alelos de interesse dos vários genes de uma espécie.

1.5.2. Marcador Molecular

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados (Lopes *et al.* 2002). Os marcadores moleculares mais utilizados são variações observadas nas proteínas ou no próprio DNA.

Estes marcadores podem ser utilizados, dentre outras coisas, para inferência de processos demográficos, testes de paternidade, aplicações de cunho forense, estudos de associação de marcadores com um dado fenótipo e estudos de mapeamento (Schlötterer 2004).

Dependendo do objetivo e do capital disponível, há um marcador mais adequado para ser utilizado. O importante é que o marcador atenda às necessidades do estudo pois, às vezes, um marcador cujo custo de análise é maior, que acabou de ser descoberto e está recebendo maior atenção da comunidade científica pode não ser a melhor escolha, e a utilização de um marcador de menor custo poderia proporcionar o mesmo tipo de resultado que uma técnica mais sofisticada.

1.5.2.1. Marcadores de Proteínas

Os marcadores de proteínas (ou bioquímicos) mais comuns são representados por isoenzimas e proteínas de reservas de sementes. As isoenzimas foram populares nos anos de 1960 e 1970. O modo de utilização destes marcadores consiste na extração da proteína e no uso de técnicas apropriadas que identifiquem suas variantes (Ramalho *et al.* 2001).

As vantagens da utilização destes marcadores são que possuem baixo custo e os protocolos são universais. No entanto requerem material fresco ou congelado, alguns *loci* apresentam instabilidade protéica, são potenciais alvos diretos de seleção e possuem reduzida variabilidade (Schlötterer 2004).

1.5.2.2. Marcadores de DNA

Os marcadores de DNA geralmente correspondem a uma pequena região do genoma que apresenta seqüência polimórfica entre indivíduos de uma espécie. Possuem alta variabilidade dentre os indivíduos de uma espécie e grande quantidade de *loci* polimórficos, no entanto requerem técnicas laboratoriais mais caras. Basicamente, pode-se apontar duas classes de marcadores de DNA: polimorfismos na seqüência do DNA, como é o caso dos polimorfismos de um nucleotídeo (SNP) e variação de DNA repetitivo, por exemplo, minissatélites e microssatélites (Schlotterer 2004). Polimorfismos na seqüência de DNA podem ser detectados por diversas técnicas como RFLP, RAPD, AFLP entre outras.

_SNP (Single Nucleotide Polymorphisms ou Polimorfismos de um Nucleotídeo)

Um marcador SNP clássico focaliza a variação de um único nucleotídeo no genoma (Schlotterer 2004). Os recentes avanços de sequenciamento

automático têm permitido a comparação dos ácidos nucleicos, que constituem o genoma, entre vários indivíduos (Regitano 2001). Com isso variações individuais, advindas de mutações de ponto (substituições, adições ou deleções de nucleotídeos) podem ser identificadas e tal informação utilizada na constituição de SNPs. Para ser considerado um SNP, o polimorfismo tem que possuir frequência acima de 1% na população, pois uma frequência menor pode indicar que a variação é consequência do acaso ou erro experimental.

As principais vantagens desse tipo de marcador são baixa taxa de mutação, elevada abundância no genoma, facilidade de automação. Podem servir de base para informações de distribuição de frequência alélica, desequilíbrio de ligação e têm grande potencial para utilização em mapeamentos de desequilíbrio de ligação de características complexas além de, poder ser utilizado para inferências de eventos demográficos. No entanto apresentam as desvantagens de serem geralmente bialélicos, o que confere a um loco de SNP limitada informação, sua caracterização possui elevado custo e podem estar localizados em sítios hipermutáveis (Schlotterer 2004).

_ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)

Em 1960, Arber, Smith e Nathans descobriram e isolaram endonucleases de restrição (Botstein et al. 1980). Esse fato abriu caminho para a classe de marcadores cujo polimorfismo é revelado pelo padrão de restrição obtido com uma endonuclease específica, analisados pela técnica RFLP.

Esta técnica permite a análise de marcadores, como SNPs, porque alterações de base única na seqüência de reconhecimento de uma enzima de restrição alteram o padrão de fragmentos de restrição. Análises de seqüências não codificantes, mutações silenciosas em seqüências codificantes e pesquisas de seqüências codificantes começaram a poder ser efetuadas com o surgimento dessa tecnologia.

O primeiro mapa genético baseado em DNA e o primeiro estudo de associação foram baseados em RFLP's (Kerem *et al.* 1989). Análises de DNA mitocondrial e DNA ribossomal com essa técnica têm sido usadas para genética de populações, pesquisas de biogeografia e filogenéticas (Avisé 1994).

A técnica RFLP foi originalmente desenvolvida para ser utilizada aliada à técnica de Southern Blotting, antes do advento da reação em cadeia da polimerase (PCR), quando não se tinha controle e conhecimento das seqüências desejadas. Segundo Liu (1998) esta técnica (RFLP - Southern Blotting) consiste basicamente de 3 passos:

Primeiro o DNA é digerido com uma enzima de restrição e os fragmentos são separados por eletroforese. Sob suporte físico e meio adequados e, com a aplicação de uma corrente elétrica, os fragmentos de DNA, que possuem carga negativa, movem-se de um eletrodo negativo para outro positivo e, os fragmentos pequenos se movem mais rapidamente do que fragmentos maiores.

As enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, reconhecem uma seqüência específica de bases em uma molécula de DNA, e clivam a molécula naquela seqüência ou próximo dela. A seqüência

de reconhecimento é chamada de sítio de restrição. Diferentes enzimas de restrição reconhecem e clivam diferentes sítios de restrição. Uma característica marcante de muitos desses sítios de clivagem é que eles possuem uma dupla simetria rotacional, isto é, a seqüência de reconhecimento é palindrômica e os sítios de clivagem são simetricamente posicionados. As endonucleases de restrição são ativas sob condições de temperatura e ambiente adequadas (Berger *et al.* 2002)

O próximo passo é desnaturar a dupla hélice de DNA dos fragmentos, colocando o gel em um meio alcalino. Os fragmentos de DNA desnaturados (agora em fita simples), são transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou nylon e imobilizados sobre a mesma. Este procedimento é conhecido por blotting e foi inicialmente aplicado para análise de DNA por E. Southern, motivo pelo qual passou a ser referido como Southern Blotting (Southern 1975).

O terceiro passo é a hibridização, de uma sonda de DNA marcada, com os fragmentos imobilizados no blot. Tal sonda é um fragmento de DNA que pode variar em tamanho (de várias centenas de pares de base a 50 kb), pode constituir-se de DNA clonado com seqüência conhecida ou desconhecida e pode ter função conhecida ou desconhecida. A sonda também pode ser obtida por síntese artificial de oligonucleotídeos, possuindo tamanho reduzido (menos de 100 nucleotídeos). Esta sonda é marcada com alguma molécula detectável, radioativa, fluorescente ou cromogênica, e adicionada à membrana para hibridização, aonde irá se ligar aos fragmentos de DNA imobilizados que contenham seqüências complementares (Lodish *et al.* 2000).

A etapa final consiste na visualização da banda hibridizada usando filme de raio-X para sondas marcadas com radioatividade ou usando um tratamento

de luz ou imagem especial para sondas marcadas quimicamente com fluorescência ou corantes.

Em 1983 Mullis (Mullis 1990) desenvolveu a técnica de PCR e, logo depois sua importância foi demonstrada com a publicação de trabalhos de aplicação da PCR em diagnósticos de doenças (Saiki *et al.* 1985). Este fato abriu espaço, deu forças ao aprimoramento de marcadores baseados em DNA e abriu caminho para a descoberta de novos tipos desses marcadores. Essa técnica consiste na amplificação de regiões específicas de DNA, situadas entre dois sítios definidos por pequenas moléculas de DNA fita-simples complementares ao DNA alvo (primers específicos) e as reações são automatizadas.

Com o advento da técnica de PCR, a análise por RFLP não obrigatoriamente necessita ser realizada com a utilização de sondas marcadas e complementares à região desejada, uma vez que as extremidades da sonda em que se observou polimorfismo podem ser sequenciadas e tal informação utilizada para síntese de primers complementares. Assim, de posse de primers específicos para a região que se deseja amplificar, é realizada uma PCR, em seguida o produto desta amplificação específica é tratado com a endonuclease de restrição adequada para gerar os fragmentos polimórficos de DNA. Por último, os fragmentos gerados pela digestão do produto de amplificação são separados em gel (como agarose), marcados (por exemplo, com brometo de etídeo) e visualizados sob iluminação adequada (por exemplo, luz ultra-violeta).

Análises por RFLP's identificam variação em seqüências de DNA's dos sítios de restrição. Esta variação pode ser originada por mutações de ponto ou por mutações estruturais. As mutações de ponto podem criar ou destruir sítios

de restrição, o que diminui ou aumenta o tamanho padrão dos fragmentos de restrição e, isto é detectado por RFLP. Inserções ou deleções de fragmentos de DNA podem ocorrer entre dois sítios de restrição, fato que também modifica o padrão de tamanho dos fragmentos de restrição. Geralmente um polimorfismo detectado por RFLP consiste em um marcador dialélico (Liu 1998).

Segundo Regitano (2001) uma das limitações no uso desta técnica encontra-se no fato de detecção de apenas polimorfismos dialélicos, o que dificulta sua utilização para mapeamento genético em populações segregantes, devido ao número de cruzamentos informativos. Outra limitação é a presença de alelos raros em muitas populações, o que ocasiona um padrão praticamente monomórfico nas mesmas.

_RAPD, ISSR, IRAP e AFLP

Segundo Schlotterer (2004) RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA ou Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso), ISSR (Inter-Simple-Sequence-Repeat ou repetição inter-sequência simples), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism ou amplificação de polimorfismos inter-retrotransposon) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou polimorfismos de tamanho de fragmentos amplificados) são técnicas baseadas em PCR, caracterizadas pela utilização de primers que podem se ligar a sítios múltiplos do genoma. A amplificação produz bandas múltiplas que apresentam variação ou não em cada indivíduo.

São técnicas de custo relativamente baixo, produzem alta quantidade de bandas, que podem depois ser transformadas em marcadores de *locus* único. A principal vantagem de RAPDs, ISSRs e AFLPs é que elas não requerem um conhecimento a priori sobre as seqüências dos primers nas espécies alvos. No entanto, principalmente RAPDs, possuem baixa reprodutibilidade, são predominantemente dominantes, difíceis de analisar e difíceis para automatizar.

RAPD é uma técnica que utiliza primers de seqüência curta na PCR, já em ISSR os primers utilizados são complementares a elementos repetitivos como microssatélites e em IRAP utiliza-se primers complementares a retrotransposons. Em AFLP fragmentos de restrição são amplificados seletivamente após a ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos de restrição, pela utilização de primers complementares aos adaptadores.

_ Mini e Microssatélites

Segundo Liu (1998), minissatélites são repetições em tandem de um conjunto de nucleotídeos, cujas seqüências variam de 9 a 100 pares de bases. O número de repetições não excedem 1000 pares de bases. São também denominados de VNTR (Variable Number of Tandem Repeats, número variável de repetições em tandem).

Microssatélites constituem-se de repetições em tandem de um mono, di, tri ou tetranucleotídeo, encontrados dentro de regiões de seqüência única, sendo que cada bloco de repetições normalmente é menor do que 100 pares

de bases (Tautz 1989). Esta variação no número de repetições pode ser resultado de erros no deslocamento da DNA polimerase durante o processo de replicação.

As principais vantagens desses marcadores são a alta informatividade (devido ao grande número de alelos e alta heterozigosidade que possuem) e isolamento relativamente simples. No entanto suas desvantagens são a alta taxa de mutação e o comportamento de mutação complexo.

Estes marcadores podem ser analisados por amplificação específica através da PCR, com utilização de primers para a região de cópia única que flanqueia a repetição e depois tal produto pode ser aplicado em um gel (como poliacrilamida) ou em um sistema de eletroforese capilar.

1.6. QTL e Genes Candidatos para deposição de gordura

Muitos estudos que objetivaram a detecção de QTL's para características de crescimento e composição de carcaça obtiveram êxito, contribuindo com programas de seleção que envolvem características difíceis ou de custo elevado para mensuração, como por exemplo características de composição de carcaça e qualidade de carne (Keele *et al.* 1999, Stone *et al.* 1999, Casas *et al.* 2000, Casas *et al.* 2001, MacNeil & Grosz 2002, Kim *et al.* 2003).

Taylor *et al.* (1998) detectaram um QTL para espessura de gordura subcutânea entre 60 e 80 cM no BTA19 (cromossomo 19 de bovinos). Casas *et al.* (2000) encontraram um QTL para deposição de gordura na região de 40 a 80 cM do BTA5. Casas *et al.* (2003) identificaram um QTL significativo para

marmoreio no BTA2, assim como Stone *et al.* (1999). Li *et al.* (2004), identificaram nove regiões cromossômicas com associações significativas para EBV (valor genético estimado, do inglês, Estimated Breeding Values) de espessura de gordura subcutânea, sendo uma região no BTA5 (65,4 a 70 cM), 3 regiões no BTA6 (8,2 a 11,8 cM; 63,6 a 68,1 cM e 81,5 a 83,0 cM), uma região no BTA21 (46,1 a 53,1 cM) e uma região no BTA23 (45,1 a 50,9 cM) em uma linha comercial de *Bos taurus*. e Mizoguchi *et al.* (2006) encontraram em uma população de Japanese Black, três regiões de QTL para marmoreio, localizadas no BTA6 (68-89 cM), BTA4 (59-67 cM) e BTA21 (75-84 cM).

Vários autores (Coppieters *et al.* 1998, Heyen *et al.* 1999; Riquet *et al.* 1999) identificaram um QTL para produção e porcentagem de gordura no leite na região centromérica do BTA14 (cromossomo 14 de *Bos taurus*), em rebanhos de gado de leite. Uma mutação no gene *diacylglycerol aciltransferase* (DGAT1) foi apontada como possível causa da variação atribuída a este QTL (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002).

A região centromérica do BTA14 foi descrita como contendo um QTL para espessura de gordura (Casas *et al.* 2000, Moore *et al.* 2003). O gene da *tireoglobulina* foi mapeado nessa região do BTA14 (Threadgill *et al.* 1990, Daskalchuk & Schmutz 1997) (Figura 3) e ele tem sido apontado como um gene candidato para características de deposição de gordura em gado de corte. Nessa região de QTL para espessura de gordura estão localizados, dentre outros, os microssatélites *CSSM066* e *ILSTS011* (Figura 3).

A tireoglobulina é uma glicoproteína hormonal sintetizada pelas células foliculares da tireóide e secretada para dentro do lúmen folicular. É uma

proteína de 19S, tem peso molecular de 660.000 dáltons e cada molécula contém 115 resíduos de tirosina (Carvalho *et al.* 1987).

Segundo Cunningham (1999), a glândula tireóide está localizada caudalmente à traquéia e é composta de dois lobos. O tecido glandular é chamado folículo, possui células distribuídas em arranjo circular e são preenchidos por uma substância denominada colóide, que é a principal forma de armazenamento dos hormônios da tireóide.

A tirosina (que faz parte da tireoglobulina) e o iodeto (iodo convertido em iodeto no trato intestinal e transportado para a tireóide, onde as células foliculares retêm o iodeto através de um processo de transporte ativo) são duas moléculas importantes na síntese do hormônio tireóideo.

Ao passar pela parede apical da célula, o iodeto se liga às estruturas anelares das tirosinas, que podem receber um ou dois iodetos, sendo chamada respectivamente de monoiodotirosina e diiodotirosina. O acoplamento entre duas moléculas de diiodotirosina forma a tetraiodotironina (hormônio T₄) e, se uma molécula de monoiodotirosina e uma de diiodotirosina se acoplam resultam na formação da triiodotironina (hormônio T₃). A enzima tiroperoxidase catalisa a iodação dos resíduos tirosil e a formação de T₃ e T₄. Uma vez sintetizados, tais hormônios ficam armazenados no lúmen dos ácinos extracelularmente até que sejam liberados (Cunningham 1999).

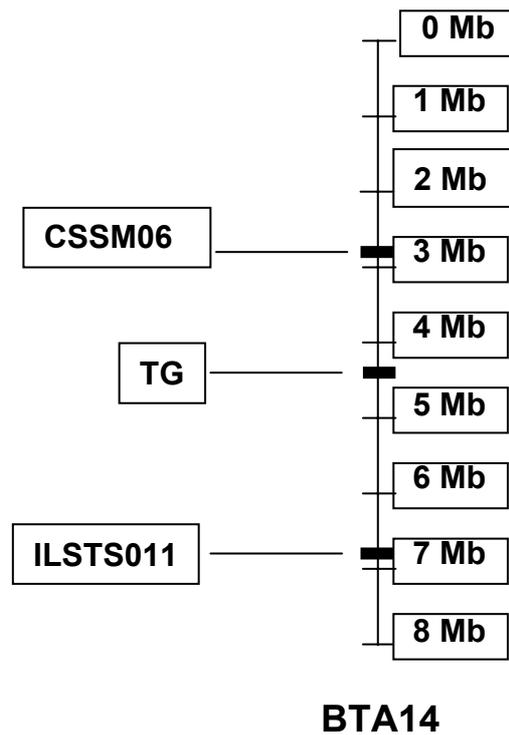


Figura 3. Ilustração de parte da região centromérica do BTA14 com a localização dos marcadores utilizados no estudo

Estimulada por THS (hormônio estimulador da tireóide), porções de tireoglobulina são capturadas pelas células foliculares por um processo de pinocitose. A fusão das porções de tireoglobulina com lisossomos resulta na hidrólise das moléculas de tireoglobulina e liberação dos hormônios T_3 , T_4 e das tirosinas e tironinas iodadas. As tironinas passam livremente através da membrana celular, monoiodotirosina e diiodotirosina são iodadas pela enzima iodotirosina-desalogenase e, o iodeto e as moléculas de tirosinas restantes são reciclados para formar novos hormônios em associação com a tireoglobulina (Nussey *et al.* 2001).

Os hormônios tireóideos, embora sejam compostos de aminoácidos, são lipofílicos. Muitas ações desses hormônios são mediadas por ligação deles a receptores nucleares, que têm afinidade preferencial por T_3 . Sendo assim,

esses hormônios interagem diretamente com o núcleo para iniciar a transcrição do RNA mensageiro (Nussey *et al.* 2001).

Acredita-se que os hormônios tireóideos sejam os determinantes do metabolismo basal e aumentam o consumo de oxigênio dos tecidos, resultando em um aumento da produção de calor (efeito calorigênico). No sistema nervoso central, esses hormônios são essenciais para o desenvolvimento do feto e do neonato, sendo que a deficiência desses hormônios nessas fases provoca retardo mental. São também importantes para a manutenção da atividade contrátil do músculo cardíaco, incluindo a transmissão de impulsos nervosos. Em situações de hiper-atividade da tireóide ocorre um aumento da frequência cardíaca, assim como da pressão sistólica (mas não a diastólica) causando um aumento do débito cardíaco (Cunningham 1999).

Esses hormônios estão envolvidos na regulação das vias glicolíticas (Hoch 1962), gliconeogênicas (Freedland & Krebs 1967) e da pentose fosfato (Glock *et al.* 1956).

A síntese, mobilização e degradação dos lipídeos são afetadas pelos hormônios tireóideos, sendo que a degradação é mais influenciada do que a síntese. Dentre os principais efeitos destes hormônios sobre o metabolismo de lipídeos estão o aumento da utilização de substratos lipídicos, aumento na síntese e mobilização de triglicerídeos estocados no tecido adiposo, aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados e, aumento da atividade da lipoproteína lípase. Os efeitos desses hormônios sobre processos metabólicos (metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos) geralmente são catabólicos (Pucci *et al.* 2000).

A tireotrofina (TSH) é o mais importante regulador da atividade da tireóide e, a secreção desta é regulada pelos hormônios da tireóide por meio de inibição por feedback negativo da síntese do hormônio liberador de tireotrofina no hipotálamo e por inibição da atividade da tireotrofina na hipófise (Cunningham 1999).

Um polimorfismo na sequência 5' líder do gene da tireoglobulina foi associado com marmoreio (Barendse *et al.* 2001). Observou-se que animais que possuem o alelo `3`, isto é, ambos os genótipos `23` e `33` têm maior marmoreio em relação à média, do que os animais que possuem genótipo `22`. O alelo `3` é definido como sendo delta T (-537 pb; GATT) enquanto que, o alelo `2` é definido como sendo delta C (-537 pb; GATC), sendo a localização dos deltas definidos a partir do início do primeiro éxon (Barendse 1997). Adicionalmente, o animal que exibe o alelo delta T tem um aumento na performance de crescimento e deposição de marmoreio.

Este polimorfismo da sequência 5' líder do gene da tireoglobulina é a base do teste comercial GeneStar MarblingTM (Genetic Solution). Ele foi testado em confinamentos da Austrália e confirmado nos Estados Unidos em cruzamentos Simental X Angus pelo Consórcio de Avaliação Nacional de Gado de Corte (NBCEC).

2. HIPÓTESES

- Existe um (ou mais) QTL para espessura de gordura segregando na região centromérica do BTA14 em animais da raça Canchim;
- Parte ou toda a variação fenotípica associada a esse QTL pode ser atribuída à variações no gene da tireoglobulina.

3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Como a qualidade da carne e o valor da carcaça de bovinos são influenciados pela proporção de gordura, o objetivo do presente trabalho foi analisar a associação de dois marcadores microssatélites, *CSSM066* e *ILSTS011*, localizados respectivamente a 2,95 Mb (Mega base) e 6,93 Mb no BTA14, flanqueando o gene da tireoglobulina (4,46 Mb), e do polimorfismo na sequência 5' líder do gene da tireoglobulina, com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra

Animais da raça Canchim (5/8 Charolês + 3/8 Zebu) de genealogia conhecida, provenientes de 64 famílias de meio-irmãos, criados em regime de pastagem, foram avaliados para espessura de gordura subcutânea aos 18 meses de idade. As seguintes combinações de grupos genéticos de touros e vacas deram origem aos animais em estudo: progênies de Charolês x ½ Canchim + ½ Nelore foram classificados como grupo genético MA, o grupo genético CA foi composto dos produtos dos pares de acasalamentos MA x MA, CA x MA e CA x CA.

Um total de 572 animais foi avaliado, compreendendo machos e fêmeas, nascidos nos anos de 2003 e 2004. Os animais foram criados em duas fazendas, na fazenda Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste localizada na cidade de São Carlos (21° 57' S, 47° 50' W) no estado de São Paulo, e na fazenda Ipameri localizada no município de Jussara (15° 55' S, 50° 50' W) no estado de Goiás, Brasil.

Baseado no grupo genético e origem, eles foram considerados representantes de quatro populações: animais do grupo genético CA criados na fazenda da Embrapa (população 1), animais do grupo genético MA criados na fazenda da Embrapa (população 2), animais do grupo genético CA criados na fazenda Ipameri (população 3) e animais do grupo genético MA criados na fazenda Ipameri (população 4).

4.2. Obtenção da espessura de gordura

Para os animais nascidos em 2003 as medidas ultra-sonográficas foram realizadas nos dias 9 e 10 de março de 2005 na fazenda da Embrapa, em São Carlos-SP, e no dia 31 de março de 2005 na fazenda Ipameri, em Jussara-GO. Para os animais nascidos em 2004 as medidas ultra-sonográficas foram realizadas nos dias 3 e 5 de março de 2006 na fazenda da Embrapa, em São Carlos-SP e nos dias 6 e 7 de abril de 2006 na fazenda Ipameri, em Jussara-GO. Os animais estavam com aproximadamente 18 meses de idade pois, depois desta idade, os processos transversos das vértebras tornam-se mais pronunciados e impossibilitam o encaixe correto da sonda do ultrassom para uma medida acurada. As medidas de espessura de gordura foram realizadas pelo Dr. Henrique Nunes de Oliveira (UNESP-Botucatu).

Foi utilizado um equipamento de ultra-som Piemedical Scanner 200 Vet, com transdutor linear de 18 cm e 3,5 MHz. As imagens foram obtidas na região entre a 12^a e 13^a costela do animal, logo acima do músculo *longissimus dorsi*. Essas imagens foram analisadas para obtenção da espessura de gordura (EG).

4.3. Obtenção das amostras de sangue e sêmen

Amostras de 5 ml de sangue foram coletas por punção da veia jugular em tubos para coleta a vácuo contendo 50 µl EDTA potássico (K3) a 15% e mantidas refrigeradas até o início do processo de extração.

Sempre que possível, amostras de sêmen dos reprodutores foram fornecidas pelas fazendas já em palhetas, que foram mantidas congeladas até o processo de extração de DNA.

4.4. Extração de DNA

4.4.1. Extração de DNA de amostras de sangue

As células vermelhas do sangue foram gradualmente desintegradas em tampão apropriado (Tris-HCl 10 mM pH 7,6, MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM), e o resíduo celular peletizado por centrifugação (700 g, 10 min). A desintegração foi repetida três vezes ou até que um precipitado branco fosse obtido.

As células brancas do sangue foram ressuspensas com uma solução que continha 500 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 0,5% SDS, 2 µg de proteinase K e então incubadas a 55°C até que o pellet fosse dissolvido (por 4 a 6 horas ou overnight). Após a incubação foram adicionados 240 µl NaCl 5M e 210µl de TE (Tris HCl 10mM pH 7,6 + EDTA 1mM pH 8,0). O material foi agitado por inversão dos tubos até formar pequenos coágulos de proteína e centrifugado por 15 minutos a 16.000 g, para promover a precipitação das proteínas.

O sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado. Logo em seguida foi lavado com etanol 70% gelado e, depois secado em capela de fluxo laminar.

Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em 250µl de solução TE + RNase (10 µg por ml de amostra) e incubado por uma hora a 37 °C. Em seguida as amostras foram armazenadas em freezer.

4.4.2 Extração de DNA de amostras de sêmen

Amostras de sêmen obtidas em palhetas foram descongeladas em microtubos de 1,5 ml, centrifugadas por 8 minutos a 5.000 g e os sobrenadantes foram descartados. O pellet, de cada amostra, foi lavado 4 vezes em 1 ml de solução PBS 1X (KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; pH7,0). A seguir o pellet foi ressuspensionado em 100 µl de PBS 1X e adicionou-se 400 µl de solução de lise (2-mercaptoetanol 2%, Tris.HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA pH 8.0 10 mM; SDS 0,5%). Incubou-se por 30 minutos a 50°C. Foi adicionada Proteinase-K (200 µg/ml) e as amostras foram vortexadas e incubadas por 16 horas a 50°C.

Para a precipitação das proteínas com sal foram adicionados 90 µl de TE e 160 µl de NaCl 5 M. Os tubos foram agitados por inversão, incubados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, acrescentou-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 desprezado, o pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, secou-se o pellet, ressuspendeu-se em 100 µl de TE + RNase e o incubou por 1 hora. As amostras foram armazenadas em freezer.

4.5. Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA foi utilizado um espectrofotômetro. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para estimar a concentração de DNA utilizou-se a seguinte relação: 1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml DNA dupla-hélice. Dessa forma a concentração de DNA na amostra, foi obtida pelo seguinte cálculo: [DNA] = Valor da leitura em O.D. X 50 X Fator de diluição.

As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação A₂₆₀/A₂₈₀ fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. 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 – 30 C°.

4.6. Marcadores Moleculares

Os três marcadores moleculares analisados foram escolhidos por sua localização nos mapas disponíveis no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os dois marcadores microssatélites, *CSSM066* e *ILSTS011*, localizados a 2,95 e 6,93 Mb, respectivamente, no BTA14, foram escolhidos por flanquear o gene da *tireoglobulina* (4,46 Mb). O outro marcador escolhido foi *Tg5*, um

polimorfismo (substituição de uma citosina por uma timina) que ocorre na seqüência 5' líder do gene da *tireglobulina* (Barendse, *et al.* 2001).

Touros e progênies foram genotipados, os touros para confirmação de paternidade nas famílias de meio-irmãos e as progênies para as análises de associações.

4.7. Genotipagem para o marcador *Tg5*

4.7.1. Amplificação

Foi amplificada parte da região 5' líder do gene da *tireoglobulina*, a qual possui 545 pares de bases, utilizando os primers TG5U2 5' GGGGATGAC TACGAGTATGACTG 3' e TG5D1 5' GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA 3', como descrito por Barendse (1997).

As PCR's foram realizadas em um aparelho termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorff) a partir de 100 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 25 µl contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,95 mM, KCl 50 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,165 µM de cada primer e 0,65 unidades de Taq DNA Polimerase.

A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos.

Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 10 minutos.

Para a verificação de amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídeo. Para isso utilizou-se tampão TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) e foi aplicada uma voltagem de 3 V/cm. Um volume de 5 µl de cada produto de amplificação foi aplicado no gel, acrescido de 1 µl de loading buffer (glicerol, TBE 10X, azul de bromofenol 1%, água deionizada). Ao término da eletroforese os produtos de amplificação foram visualizados sob iluminação ultravioleta.

4.7.2. Digestão dos produtos amplificados

Os produtos de amplificação da seqüência 5' líder do gene da *tireoglobulina* foram digeridos com a enzima *Mbol*. O volume final da reação de digestão foi de 17 µl sendo 15 µl de produto de amplificação e 2 µl de Emix de digestão. Este último consistiu de 1 unidade da endonuclease de restrição *Mbol*, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), MgCl₂ 10 mM, 0,1 mg/ml de BSA, acrescidos ou não de KCl 100 mM, dithiothreitol 1mM, NaCl 50mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, dependendo do fabricante do conjunto endonuclease de restrição e tampão utilizado. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 3 horas em aparelho termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorff).

4.7.3. Análises dos genótipos

A enzima de restrição *MboI* reconhece a seqüência GATC e a cliva, assim animais portadores da variante delta T (nesse caso substituição da citosina por uma timina) perdem um sítio de restrição. Dessa forma, nomeamos de alelo 1 o alelo que possui a variante delta T, sendo caracterizado pela presença de 3 fragmentos (74, 193 e 278 pares de bases) e de alelo 2 a variante delta C, que é caracterizada pela presença de 4 fragmentos (17, 74, 176 e 278 pares de bases).

Para análise dos genótipos de *Tg5*, os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 4%. Esse procedimento foi realizado com tampão de eletroforese TBE 1X (Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM pH 8,0), submetido a uma voltagem de 3 V/cm e, corado com brometo de etídeo incorporado no gel.

Foram aplicados no gel 13 µl do produto de digestão acrescidos de 3 µl de loading buffer. No primeiro poço de cada fileira do gel foi aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb também acrescido de loading buffer na mesma proporção acima.

Os fragmentos foram detectados sob iluminação UV e registrados por uma câmera fotográfica digital. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrão de tamanho de DNA e assim pôde-se determinar o genótipo de cada animal.

4.8. Genotipagem para os microssatélites *CSSM066* e *ILTS011*

4.8.1. Amplificação

As seqüências correspondentes aos microssatélites *CSSM066* e *ILTS011* foram amplificadas por PCR a partir de 40 ng de DNA genômico em volume final de reação de 13,5 µl, contendo KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,4, 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 unidade de *Taq* polimerase, 0,2 µM de cada primer de *CSSM066* ou *ILTS011* sendo que o oligonucleotideo complementar à fita anti-sense, denominado primer forward, foi marcado na extremidade 5' com fluorescência, de modo a ser detectado por leitura a laser. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf).

As reações de amplificação, para ambos marcadores microssatélites citados acima, constaram de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 28 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 28 ciclos, o produto amplificado foi submetido à extensão final por 45 minutos.

As seqüências dos primers referentes aos marcadores microssatélites *CSSM066* e *ILTS011* foram os descritos na base de dados do Meat Animal Research Center (MARC) (<http://www.marc.usda.gov>), a saber:

_ *CSSM066*:

Forward Primer: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA

Reverse Primer: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG

_ILSTS011

Forward Primer: GCTTGCTACATGGAAAGTGC

Reverse Primer: CTAAAATGCAGAGCCCTACC

4.8.2. Análises dos genótipos

As análises dos produtos de PCR foram realizadas em um seqüenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems). Os genótipos foram determinados com a utilização dos programas GeneScan (versão 3.7.1) e Genotyper (versão 3.7). O programa GeneScan realiza a leitura dos eletroferogramas indicando a amplificação dos alelos através da altura dos picos detectados e estima o tamanho desses alelos em relação à um padrão. O programa Genotyper indica quais são os alelos presentes nas amostras através de uma pré-definição dos alelos presentes na população, fornecendo uma tabela com o número do animal e o seu respectivo genótipo.

4.9. Análises estatísticas

As análises de associações dos genótipos dos marcadores com as medidas de espessura de gordura foram realizadas por um modelo misto, usando o método de máxima verossimilhança restrita pelo procedimento

MIXED (SAS, 2004). O modelo estatístico foi:

$$y_{ijklmn} = \mu + GC1_i + GC2_j + G_k + t_{i,j} + b_1 l_m + e_{ijklmn}, \text{ em que:}$$

y_{ijklmn} = a observação sobre a espessura de gordura; μ = média geral; $GC1_i$ = efeito fixo de grupo contemporâneo 1, composto de ano e estação de nascimento e sexo do animal; $GC2_j$ = efeito fixo de grupo contemporâneo 2, composto de fazenda de origem e grupo genético do animal (população 1 a 4); G_k = efeito fixo de genótipo do marcador; $t_{i,j}$ = efeito aleatório de touro aninhado com $GC2_j$; b_1 = coeficiente de regressão de y_{ijklmn} sobre l_m ; l_m = idade (dias) do animal; e e_{ijklmn} = erro aleatório.

Quando um efeito significativo ($P \leq 0,05$) de genótipo de marcador foi observado, o efeito de substituição de alelo, como desvio do alelo com maior frequência, foi estimado pela substituição do efeito de genótipo por co-variáveis representando o número de cada alelo no genótipo. Alelos e genótipos com frequência igual ou inferior a 1% foram excluídos de todas as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As medidas de espessura de gordura subcutânea apresentaram média de $1,66 \pm 1,58$ mm, sendo que o menor valor observado foi de 0,6 mm e o maior valor observado foi de 3,2 mm. Demonstrando que a população de Canchim estudada possui uma média de espessura de gordura inferior a média desejável pela indústria frigorífica que 2 a 3 mm.

Os marcadores microssatélites *CSSM066* e *ILSTS011* apresentaram 12 (174, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196 e 198 pb) e 5 alelos (260, 262, 264, 266 e 268 pb) respectivamente na população em estudo e, o polimorfismo *Tg5* apresentou 2 alelos (1 e 2). Após as exclusões de alelos e genótipos com frequência igual ou inferior a 1%, o marcador *CSSM066* ficou com 10 alelos e os demais permaneceram como antes (Tabela 1).

No presente trabalho, os marcadores analisados foram escolhidos com base na ligação ao gene da *tireoglobulina* (localizado à 4,46 Mb no BTA14), por suposição de que este gene influencie a deposição de gordura na carcaça de bovinos. O polimorfismo na sequência 5' líder do gene da *tireoglobulina* tem sido associado com deposição de gordura intramuscular em gado de corte (Barendse *et al.* 2001, Wood *et al.* 2006). Casas *et al.* (2005) encontraram associação deste polimorfismo com espessura de gordura em uma população de Brahman, mas não com marmoreio e, Rincker *et al.* (2006) não encontraram associação de *Tg5* com gordura intramuscular. Esta região centromérica do BTA14 foi descrita como contendo um QTL para espessura de gordura por Moore *et al.* (2003) e Casas *et al.* (2000) concordam com esses resultados descrevendo um QTL para a mesma característica e região cromossômica.

Muitos autores acreditam que o gene da *tireoglobulina* seja responsável por parte do efeito do QTL citado acima.

No presente estudo, o polimorfismo na sequência 5' líder do gene da tireoglobulina não foi associado com espessura de gordura (Tabela 2) e o alelo considerado favorável para alto marmoreio por Barendse *et al.* (2001), designado nesse trabalho de alelo 1, apresentou razoável frequência, de 16,11% (Tabela 1). Também não foi observado efeito significativo para o microssatélite *ILSTS011*, situado à 6,93 Mb no BTA14 (Tabela 2). As frequências alélicas utilizadas nas análises de *ILSTS011* e *Tg5* apresentam-se na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência alélica dos marcadores *CSSM066*, *TG* e *ILSTS011* consideradas nas análises

<i>CSSM066</i>		<i>TG</i>		<i>ILSTS011</i>	
Alelo	Frequência (%)	Alelo	Frequência (%)	Alelo	Frequência (%)
178	15,46	1	16,11	260	27,45
180	11,00	2	83,89	262	1,27
182	25,10	-	-	264	5,00
184	20,12	-	-	266	25,18
186	0,83	-	-	268	41,10
188	3,63	-	-	-	-
190	2,80	-	-	-	-
192	15,35	-	-	-	-
196	0,73	-	-	-	-
198	4,98	-	-	-	-

Os alelos apresentados nesta tabela que apresentam frequência menor que 1%, antes das exclusões de genótipos e alelos com menos de 1%, possuem frequência superior a isto

Tabela 2. Resultados das análises de máxima verossimilhança restrita para espessura de gordura, de acordo com o marcador

Efeito	Marcador CSSM066		Marcador ILSTS011		Marcador Tg5	
	GL	F	GL	F	GL	F
GC2	3	0,87	3	0,32	3	0,50
GC1	7	0,73	7	0,54	7	0,68
CSSM066	27	1,54 *	-	-	-	-
ILSTS011	-	-	9	1,52	-	-
Tg5	-	-	-	-	2	0,70
Idade	1	1,52	1	3,43	1	3,65

GC2= combinação de fazenda de origem e grupo genético; GC1= combinação de ano e estação de nascimento e sexo; GL = grau de liberdade; F= razão de variância; *= P<0.05

Essa discordância entre nossos resultados e os resultados da literatura pode ser atribuída a diferenças entre as populações e raças utilizadas em cada estudo, assim como ao ambiente, manejo e dieta nutricional em que o efeito foi estudado (Rincker *et al.* 2006). Em nossos dados testamos somente o efeito de Tg5 sobre espessura de gordura subcutânea e não podemos descartar um possível efeito sobre marmoreio, uma vez que a correlação entre essas duas características não é alta (Crews & Kemp 2001). Esses resultados obtidos para Canchim corroboram os resultados de Moore *et al.* (2003), que também não identificaram associação entre este gene candidato e estimativas de valores genéticos (EBV) para espessura de gordura.

O marcador microssatélite CSSM066 (localizado à 2,95 Mb no BTA14) apresentou efeito significativo (Tabela 2) sobre a espessura de gordura em Canchim. Concordando com relatos de presença de QTL para essa característica na região centromérica do BTA14 (Moore *et al.* 2003, Casas *et al.* 2000) e com Moore *et al.* (2003), que encontraram associação entre EBV de

espessura de gordura e o *locus* *CSSM066*. As frequências genóticas consideradas nas análises para o *locus* *CSSM066*, assim como as médias de espessura de gordura de animais com diferentes genótipos são apresentadas na Tabela 3. As frequências alélicas utilizadas nas análises para esse marcador estão representadas na Tabela 1.

Tabela 3. Frequência genotípica do marcador microssatélite *CSSM066*, médias e erros padrões de espessura de gordura de animais com diferentes genótipos de *CSSM066*

Genótipo <i>CSSM066</i>	Frequência	Média (mm)	Erro padrão(mm)
178 178	10	1,48	0,67
178 180	11	1,80	0,50
178 182	39	1,62	0,59
178 184	37	1,44	0,46
178 188	10	1,25	0,51
178 190	7	1,38	0,55
178 192	18	1,31	0,41
178 196	7	1,67	0,31
180 180	9	1,12	0,67
180 182	31	1,34	0,50
180 184	22	1,60	0,56
180 192	18	1,40	0,70
180 198	6	1,66	0,56
182 182	31	1,27	0,39
182 184	36	1,34	0,54
182 186	8	1,17	0,34
182 188	10	1,58	0,78
182 190	7	1,65	0,85
182 192	37	1,49	0,49
182 198	12	1,30	0,58
184 184	16	1,38	0,48
184 188	6	1,18	0,61
184 190	13	1,03	0,35
184 192	31	1,29	0,47
184 198	17	1,23	0,44
188 192	9	1,35	0,31
192 192	11	1,16	0,34
192 198	13	1,51	0,63

Nesse estudo, apesar do efeito do marcador microssatélite *CSSM066* mostrar-se significativo ($P < 0,05$) sobre a espessura de gordura, não aconteceu o mesmo com o efeito de substituição alélica desse marcador (Tabela 4). As análises de substituição alélica permitem o cálculo do efeito direto de cada alelo através de um modelo de substituição gênica que considera a média do efeito aditivo de um alelo na população. Um valor positivo para o efeito aditivo implica que o efeito do alelo resulta em um aumento no fenótipo (Koning *et al.* 1999). Dessa forma, nossos resultados podem indicar que o efeito de *CSSM066* sobre a espessura de gordura não é aditivo nessa população e que outros efeitos como dominância e epistasia podem ser mais relevantes para explicar a variação ou, sendo aditivo, esse efeito seria tão pequeno que pelo tamanho amostral de animais utilizado não foi possível detectá-lo.

Tabela 4. Resultados da análise de efeito de substituição alélica do microssatélite *CSSM066* sobre a espessura de gordura em Canchim

Efeito	GL	F	P
CG1	7	0,71	0,6659
CG2	3	0,86	0,4680
178	1	0,53	0,4674
180	1	0,15	0,7001
184	1	0,67	0,4133
186	1	0,35	0,5520
188	1	0,13	0,7163
190	1	0,61	0,4354
192	1	0,86	0,3531
196	1	0,01	0,9316
198	1	0,20	0,6577
Idade	1	3,65	0,0567

GC1= combinação de ano e estação de nascimento e sexo; GC2= combinação de fazenda de origem e grupo genético; GL= grau de liberdade; F= razão de variância; P= probabilidade associada ao teste de razão de variância

Esses resultados indicam que a mutação na região 5' líder do gene da *tireoglobulina* não deve ser a causa de diferenças na espessura de gordura em bovinos, mas sim variações em outros genes próximos deste. Outro gene localizado na região centromérica do BTA14 é o gene *diacilglicerol aciltransferase (DGAT1)*. Uma mutação neste gene foi apontada como a causadora de diferenças na porcentagem de gordura no leite (Grisart *et al.* 2002, Winter *et al.* 2002). Coppieters *et al.* (1998), Heyen *et al.* (1999) e Riquet *et al.* (1999) descreveram a presença de QTLs para essa característica nessa região do BTA14 em gado de leite. No entanto, Moore *et al.* (2003) não encontraram associação entre *DGAT1* e EBV de espessura de gordura.

Com a crescente anotação do genoma bovino, outros genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e diferenciação de adipócitos têm sido descritos na região centromérica do BTA14, como os genes da *Acil CoA sintetase 3 (ACSL3)* e do *fator de aumento de desenvolvimento e de diferenciação 1 (DDEF1)*. O gene *ACSL3* está localizado a 1,82 Mb no BTA14 e a enzima *ACSL3* está relacionada ao metabolismo de ácidos graxos (Prentki & Corkey 1996, Coleman *et al.* 2000). Oikawa *et al.* (1998) reportaram a identificação, caracterização e expressão da *Acil CoA sintetase 5 (ACS5)* e, sugeriram que a *ACS5* podia prover o *Acil CoA* usado na síntese de lipídeos em pré-adipócitos em proliferação. O gene *DDEF1* está localizado a 5,98 Mb no BTA14 e está relacionado a adipogênese. King *et al.* (1999) purificaram e clonaram a proteína *DDEF1* de células de cérebro bovino e observaram que a expressão dessa proteína resultou na diferenciação de fibroblastos em adipócitos *in vitro*.

Uma vez que vários trabalhos reportaram a existência de um QTL para espessura de gordura na região centromérica do BTA14 (Moore *et al.* 2003,

Casas *et al.* 2000) e o presente estudo encontrou associação desta característica com o marcador *CSSM066*, mas não com *Tg5*, os genes *ACSL3* (1,82 Mb) e *DDEF1* (5,98 Mb) podem ser apontados para futuros estudos como potenciais candidatos à influenciar a variação para deposição de gordura, principalmente o gene *ACSL3* que está mais próximo do marcador *CSSM066*. Dessa forma, o marcador *CSSM066* poderia estar em desequilíbrio de ligação com um desses genes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram associação do marcador *CSSM066* com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim, concordando com a hipótese de existência de um (ou mais) QTL para espessura de gordura na região centromérica do BTA14.

No entanto, o polimorfismo da sequência 5' líder do gene da *tireoglobulina* não foi associado com a característica em estudo, indicando não ser este o gene que contribui para o efeito de tal QTL sobre a variação da espessura de gordura.

Recomendamos maiores estudos de associação de marcadores moleculares (especialmente em genes ainda não estudados como *ACSL3*) situados na região centromérica do BTA14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim. Uma vez que, se encontrada associação da característica com algum marcador, a informação poderá ser incorporada em programas de melhoramento da raça .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALHUS, J.L. *et al.* The influence of chilling rate and fat cover on beef quality. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, p. 321-330, 2001.
- ALENCAR, M.M. Bovino - Raça Canchim: origem e desenvolvimento. São Carlos - SP: **EMBRAPA - UEPAE de São Carlos**. Documentos 4, p.102, 1985.
- ANUALPEC 2005. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Argos Comunicação FNP, 2005. Cap.2, p. 53-80,
- AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. **Copeia**, v. 4, p. 1061-1064, 1994.
- BARENDSE, W. **Assesing lipid metabolism**. Disponível em: <ep. Espacenet.com.Patent application WO9923248>. Acesso em: mar. 2006.
- BARENDSE, W. *et al.* **The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle**. Disponível em: <www. Beef.crc.org.au/Publications/Marblingsym/Day1/ Tg5DNA>. Acesso em: mar. 2006, 2001.
- BERGER, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry** 6.1: the basic tools of gene exploration. 5th ed. 2002
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314–331, 1980.
- CARVALHO, D.P.; ROSENTHAL, D.; BREITENBACH, M.M.D. Analysis of thyroglobulin 27S and 19S and their hormonal content in human thyroid glands. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 415-418, 1987.

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 QTL 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.* Identification of quantitative trait *loci* for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, p. 2-6, 2003.

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.

CLUTTON-BROCK, J. The walking larder: patterns of domestication, pastoralism and predation, ed. Clutton-Brock, J. (Unwin Hyman, London), p. 200-206, 1989.

COLEMAN, R. A.; LEWIN, T. M.; MUOIO D. M. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 77-103, 2000.

COPPIETERS, W. *et al.* A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 540–544, 1998.

CREWS, Junior. D. H.; KEMP, R. A. Genetic parameters for ultrasound and carcass measures of yield and quality among replacement and slaughter beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 3008-3020, 2001.

CUNNINGHAM, J.G. Tratado de fisiologia veterinária. 2 ed. edt: Guanabara Koogan, 1999.

DASKALCHUK, T.E.; SCHMUTZ, S.M. Genetic mapping of thyroglobulin on bovine chromosome 14. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 74-76, 1997.

DAVIS, G. P.; DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2331–2339, 1998.

EENENNAAM, A. V. **Marker-assisted selection in beef cattle**. Disponível em: [http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker Assisted Selection in Beef Cattle.pdf](http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf). Acesso em: mar. 2006, 2004.

EPSTEIN, H. The origin of the domestic animals of Africa. New York: Africana Publishing Cooperation, 1971. v. 1.

FAVA NEVES, M.; SCARE, R. F. & CAVALCANTI, M. DA R. **Comercialização internacional de produtos animais provenientes de pastagens**. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br>. Acesso: 22 de set. 2003.

FELÍCIO, P.E.; NORMAN, G.A. Curso internacional sobre tecnologia da carne bovina. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas. Paginação descontínua. 1978.

FREEDLAND, R. A. & KREBS, H. A. The effect of thyroxine treatment on the rate of gluconeogenesis in the perfused rat liver. **Journal of Biochemistry**, v. 104, p. 45, 1967.

GELDERMANN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers: Part. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 46, p. 319-330, 1975.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P.; WHITEHEAD, J. K. Pathways of glucose catabolism in rat liver in alloxan diabetes and hyperthyroidism. **Journal of Biochemistry**, v. 63, p. 520-524, 1956.

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.

HEYEN, D. W. *et al.* A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiological Genomics**, v.1, p. 165–175, 1999.

HOCH, F. L. Biochemical actions of thyroid hormones **Physiological Reviews**, v. 42, p. 605-673, 1962.

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.

KEMPSTER, A.J.; OWEN, M.G. A note of the accuracy of an ultrasonic technique for selecting cattle of different breeds for slaughter at equal fatness. **Animal Production**, v. 32, p.113-115, 1981.

KEREM, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, v. 245, p. 1073–1080, 1989.

KIM, J.J. *et al.* Detection of quantitative trait *loci* for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1933–1942, 2003.

KING, F.J. *et al.* DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 2330-2337, 1999.

KONING, D.J. *et al.* Detection of quantitative trait *loci* for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). **Genetics**, v. 152, p. 1679–1690, 1999.

LEIDENZ, N. H. Parâmetros de qualidade de carne para o início do milênio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 2000, Uberaba. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 2000, 243-259,

LI, C. *et al.* Identification and fine mapping of quantitative trait *loci* for backfat on bovine chromosomes 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 967-972, 2004.

LIU, B. H. In: **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. CRC Press LLC, 1998. 62-82.

LODISH, A. *et al.* **J. Molecular Cell Biology**. Fourth Edition W. H. FREEMAN, 41 Madison Avenue, New York, New York 10010 and Houndsmills, Basingstoke RG21 6XS, England ISBN 0-7167-3136-3 1990. 1995. 2000. by W. H. Freeman and Company Molecular cell biology / Harvey Lodish p [et al.] -4th ed. p. cm. Includes bibliographical references. ISBN 0-7167-3136-3 1. Cytology. 2. Molecular biology. I. Lodish, Harvey F. QH581.2.M655 1999 571.6-dc21 99-30831 CIP © 1986, 1990, 1995, 2000 by W. H. Freeman and Company. All rights reserved.

LOFTUS, R.T. *et al.* Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 2757-2761, 1994.

LOPES, R. *et al.* Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 56 – 60, 2003.

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

MACNEIL, M.D.; GROSZ, M.D. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford X composite double backcross populations. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 2316–2324, 2002.

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

MASSEY, J.M.; GEORGES, M. Gmarker's marker-assisted selection. **Animal Biotechnology**, v. 8, p.144-146, 1992.

MIZOGUCHI, Y. *et al.* Mapping of quantitative trait *loci* for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. **Animal Genetics**, v. 37, p. 51-54, 2006

MOLETTA, J. L.; RESTLE, J. Influência do grupo genético sobre características qualitativas da carne de novilhos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, p. 866-875, 1996.

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.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, p. 36-42, 1990.

NEGRELLI, O. A. **Análise das exportações no 1º semestre de 2006**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br>>. Acesso: 21 jul. 2006.

NUSSEY, S.; SAFFRON, W. *Endocrinology: an integrated approach*. BIOS Scientific Publishers Ltd, 2001

OIKAWA, E *et al.* A novel *acyl-CoA synthetase*, *ACS5*, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. **Journal of Biochemistry**, v. 124, p. 679–685, 1998.

OLIVEIRA, A. L. Maciez da carne bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 33, p. 7-18, 2000.

PAYNE W. J. A. **Domestication: a forward step in civilization**. In: Hickman, C. G (Ed). **Cattle Genetic Resources**. Amsterdam: Elsevier, 1991. 51-72,

PEROTTO, D.; MOLETTA, J.L.; CUBAS, A.C. Características da carcaça de bovinos Canchim e Aberdeen angus e de seus cruzamentos recíprocos terminados em confinamento. **Ciência Rural**, v. 29, p.331-338, 1999.

PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Are the b-cell signaling molecules malonyl- CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, v. 45, p. 273–283, 1996.

PUCCI, E; CHIOVATO, L.; PINCHERA, A. Thyroid and lipid metabolism. Supplement 2, v. 24, p. S109-S112, 2000.

RAMALHO, M. A. P.; Santos, J. B. ; Pinto, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. Universidade Federal de Lavras: UFLA, 2001. 385-404.

REGITANO, L.C.A. Introdução ao uso de marcadores moleculares In: Regitano Lca And Coutinho LL (Eds.) **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.16.

REGITANO, L. C. A.; VENERONI, G. B. Biologia molecular aplicada ao melhoramento animal. In: XV CURSO DE MELHORAMENTO DE GADO DE CORTE DA EMBRAPA – GENEPLUS. XV, 28 a 31 março de 2006, Campo Grande – MS. **Palestra**, meio digital, Campo Grande – MS. 2006.

RINCKER, C. B. *et al.* Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simental steers. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 686-692, 2006.

RIQUET, J. *et al.* Fine-mapping of quantitative trait *loci* by identity by descent in outbred population: Application to milk production in dairy cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9252–9257, 1999.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p.1350-1354, 1985.

SAINZ, R.D. Qualidade das carcaças e da carne bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, 2, 1996, Uberaba. **Anais**. Uberaba: ABCZ, 1996. Paginação descontínua.

SAINZ, R.D.; ARAÚJO, F.R.C. Uso de tecnologias de ultra-som no melhoramento do produto final carne. In: Congresso brasileiro das raças zebuínas, 5, 2002, Uberaba. **Anais...** Uberaba, MG: ABCZ, 2002. p.1-8.

SAS Institute Inc., SAS® 9.1.2. *Statistical Analysis System, Systems for Windows*. SAS Institute Inc., Cary, NC 2004.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 8, p. 552-560, 1923.

SCHLOTTERER, C. Opinion: the evolution of molecular markers- just a matter of fashion? **Nature**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SIMM, G. The use of ultrasound to predict the carcass composition of live cattle – a Review. **Animal Breeding**, v. 58, p. 853-875, 1983.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-17, 1975.

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

TAUTZ, D. Hypervariability of single sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TAYLOR, J. F. *et al.* Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194–201, 1998.

THREADGILL, D. W. *et al.* The thyrolobulin gene is syntenic with the myc and mos protooncogenes and carbonic anhydrase ii and maps to chromosome 14 in cattle. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 53, p. 32, 1990.

THOMPSON, J. The relationship between marbling and sensory traits. In: MARBLING SYMPOSIUM. Disponível em: < www.beef.crc.org.au> Acesso em: 2002.

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, p. 376-386, 2002.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3145–3151, 1994.

WILLIAMS, J.L. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, p. 379-391, 2005.

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

WINTER, A. *et al.* Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait *locus* for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v. 99, p. 9300–9305, 2002.

WOOD, I. A. *et al.* A meta-analytic assessment of a Thyroglobulin marker for marbling in beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 38, p. 479-494, 2006.