

Luiz Lehmann Coutinho

Professor Titular
Departamento de Zootecnia
ESALQ/USP. Piracicaba, SP
llcoutin@esalq.usp.br

Érika Cristina Jorge

Pós-doutoranda
Departamento de Zootecnia
ESALQ/USP. Piracicaba, SP
ecjorge@esalq.usp.br

Millor Fernandes do Rosário

Pós-doutorando
Departamento de Zootecnia
ESALQ/USP. Piracicaba, SP
millor@usp.br

Luciana Correia Almeida de Regitano

Pesquisadora da EMBRAPA Pecuária
Sudeste. São Carlos, SP
luciana@cnpse.embrapa.br

A genômica na bovinocultura de corte

■ Introdução

As atuais raças de bovinos originaram a partir de um ancestral selvagem conhecido como *uroque* (*Bos primigenius*), que ocorria na Ásia, Europa e Norte da África. Esses animais selvagens foram inicialmente domesticados de forma independente no sudoeste da Ásia (região conhecida como Crescente Fértil) e na Índia, aproximadamente 6 mil anos a.C (Torres, 1981; Hiendleder *et al.*, 2008; McKay *et al.*, 2008). As raças taurinas derivaram da domesticação original ocorrida no sudoeste da Ásia, seguida por outros eventos similares a partir de populações selvagens de *uroque* na Europa, privilegiando a produção de carne e leite. Já os *uroques* da Índia foram domesticados para produzir animais de trabalho, que fossem resistentes às

condições climáticas e às moléstias parasitárias das regiões tropicais, originando as raças zebuínas atuais. Espécies congêneres de bovinos selvagens existem até hoje, como exemplo, o iaque, o gaial e o de java (ou de Bali). O último *auroque* morreu na Europa em 1627, e hoje as raças de bovinos são derivadas das subespécies *Bos taurus taurus* e o *Bos taurus indicus* (Torres, 1981; Hiendleder *et al.*, 2008; McKay *et al.*, 2008). O processo de domesticação representa tradicionalmente um estreitamento da diversidade genética. Entretanto, em decorrência da domesticação recorrente e independente a partir de uma espécie selvagem ancestral, as raças atuais de bovinos possivelmente mantêm uma relevante diversidade genética, percebida fenotipicamente ao comparar raças contrastantes como Jersey e Holandês, Gir e Nelore.

Foi apenas no século XX que a bovinocultura deixou de ser uma atividade apenas de subsistência e extrativista para ser conduzida como uma atividade comercial. Foi naquele século que se acentuou a necessidade por animais que apresentassem melhor desempenho e que fossem mais bem adaptados às diversas condições ambientais. Deu-se início, então, aos programas de melhoramento das raças bovinas, empregando como base genética o conjunto de alelos das raças já domesticadas e, portanto, já alterado da espécie selvagem. Inicialmente, esses programas de melhoramento foram conduzidos intuitivamente, com base em características produtivas e estéticas de animais que apresentavam fenótipos superiores. Esses animais eram selecionados como genitores para as próximas gerações, as quais apresentavam melhor desempenho. Ciclos de mensuração de fenótipos foram estabelecidos para a seleção dos animais que apresentavam genótipos superiores para constituírem os progenitores das gerações seguintes. Conseqüentemente, anos de seleção por meio desses ciclos conduziram ao aumento da frequência de alelos favoráveis que aprimoravam as características produtivas nas populações bovinas. Os programas de melhoramento, então, aperfeiçoaram os índices de produtividade, além de um alto potencial adaptativo para essas espécies, sem conhecer os genes individualmente e os mecanismos moleculares a eles associados. Salienta-se que, graças aos avanços nas áreas

da estatística, com o desenvolvimento de modelos de seleção mais elaborados, bem como da computação, com o desenvolvimento de *softwares* cada vez mais sofisticados, os programas de melhoramento têm conseguido progressos significativos.

Apesar dos ganhos observados em diversas características (como ganho de peso, produção de leite), a previsão do potencial genético baseado exclusivamente no fenótipo do animal não tem sido 100% eficiente para atender à demanda em outras características de interesse econômico. *Como prever, por exemplo, o rendimento de carcaça e de partes e quantidade de gordura corporal sem abater o animal? E avaliar a resistência a doenças sem realizar o desafio com um patógeno?* Esses são alguns exemplos de características difíceis ou onerosas de serem mensuradas com acurácia em programas de melhoramento tradicional e, portanto, o incremento nas taxas de melhoramento dessas características fica dificultado.

O trabalho de G. Mendel, de 1865, estabeleceu as leis da hereditariedade, associando um componente hereditário (definido por Mendel como *fator* ou *unidade*) às características observáveis. Já o trabalho de Ronald A. Fisher, de 1918, foi o primeiro a distinguir a variância genética da variância ambiental e a decompor a variância genética em aditiva, de dominância e de epistasia. Esses trabalhos permitiram definir que o fenótipo (variabilidade fenotípica) pode ser decomposto em duas partes: uma devida à genética (variabilidade genética) e outra devida ao ambiente (variabilidade ambiental). Mas foi apenas em 1944, que Oswald T. Avery determinou que o fator hereditário era determinado pelo DNA.

Com o advento dos marcadores moleculares propostos na década de 1970, vislumbrou-se a possibilidade de incrementar a informação oriunda do fenótipo com aquela oriunda diretamente do DNA, de forma que os processos de identificação e seleção dos genótipos superiores pudessem ser realizados mais eficientemente. As marcas na sequência de DNA próximas à região de interesse (genes) permitiriam o acompanhamento da segregação de alelos por gerações e, por conseqüência, da característica de interesse a elas associada. Essas marcas são identificadas pela associação dos alelos segre-

gantes com valores fenotípicos referentes à característica estudada. Como a capacidade de produção de um animal (fenótipo) é o resultado da interação entre o material genético (genótipo) e o ambiente, esses marcadores representariam a possibilidade de seleção de animais também com base no genótipo, antes mesmo da expressão do fenótipo. Vislumbrou-se, portanto, a possibilidade de determinação do potencial genético de um animal nos estádios embrionários ou jovens, sem a necessidade de avaliação da produção ou da progênie, o que levaria a uma seleção mais rápida e eficiente de animais superiores.

Exemplos da aplicação desses marcadores no melhoramento animal têm sido incrementados desde a década de 1990. Assim, foi desenvolvido um teste molecular para a detecção do gene halotano, que promove uma redução na qualidade da carne de suínos (carne PSE), hoje largamente empregado pela suinocultura (Fujii *et al.*, 1991). A identificação de mutação no gene da miostatina, responsável pelo fenótipo de musculatura dupla observado em bovinos das raças Belgian Blue e Piedmontese, que promove um aumento significativo da massa muscular do animal (~ 30%), é um outro exemplo de como a informação direta do genótipo pode ser utilizada na seleção de animais para a produção de carne (Bellinge *et al.*, 2005). Outro exemplo está relacionado à qualidade da carne de bovinos (maciez e marmoreio), incluindo o desenvolvimento de testes genéticos comerciais para maciez por empresas privadas.

O estudo de genes candidatos tem sido uma ferramenta poderosa para a identificação das mutações que influenciam características controladas por um ou poucos genes. No entanto, a maioria das características de interesse econômico apresenta o padrão poligênico de herança, sendo determinadas por inúmeros genes de grande e/ou de pequenos efeitos individuais e sob forte influência de fatores ambientais. A identificação dos alelos associados a essas características complexas nas populações foi facilitada pelo desenvolvimento e localização de marcadores moleculares polimórficos no genoma, principalmente os microssatélites e os polimorfismos de base única (SNPs), que têm permitido a construção de mapas genéticos saturados e, con-

sequentemente, o mapeamento de locos de características quantitativas (do inglês, *quantitative trait loci*, QTLs). A integração dos resultados oriundos dessas abordagens aos obtidos pelas estratégias de genes candidatos, estudos relacionados à expressão gênica envolvendo técnicas de PCR quantitativa, microarranjos e sequenciamento poderão permitir a dissecação e a compreensão do número, função, contribuição e localização dos genes envolvidos no controle das características quantitativas. Detalhes dessas técnicas sob o enfoque do genoma bovino serão contemplados neste capítulo.

Genômica: definições e conceitos

Com os conceitos a seguir, pretende-se dar suporte para que o leitor possa compreender como a genômica animal pode servir de ferramenta ao melhoramento genético. Em uma visão geral, a genômica animal segue o Dogma Central da Biologia: no núcleo das células, partes da sequência de DNA são transcritas em RNA mensageiro que são exportadas para o citoplasma e traduzidas em proteínas, as quais irão desempenhar o controle da maquinaria celular, possibilitando que as diferenças moleculares sejam expressas e visualizadas nos fenótipos diferenciados.

DNA

O material básico para estudos relacionados à genética molecular é o DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid* ou ADN do português ácido deoxiboribonucleico). Essa molécula contém a informação genética que controla o desenvolvimento e a função dos processos vitais. O DNA é encontrado no núcleo das células animais, sendo que, em bovinos, as células mais comumente empregadas nas análises moleculares são os leucócitos do sangue, células da pele, dos bulbos capilares e das mucosas. Todas as características, sejam elas qualitativas (cor da pelagem, presença ou ausência de chifres) ou quantitativas (peso corporal, resistência a doenças), são influenciadas pelos genes que estão localizados na sequência do DNA, que é composto por molé-

culas de pentose, fosfato e bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina e citosina), arranjadas em uma estrutura de dupla hélice.

Gene

É uma sequência de nucleotídeos específica na fita de DNA, que apresenta a capacidade de ser transcrita em um RNA mensageiro (RNAm) e, eventualmente, traduzida em uma proteína. Portanto, gene é a unidade básica controladora de uma ou mais características fenotípicas. Um gene contém sequências codificadoras de proteínas (chamadas éxons) intercaladas por sequências não-codificadoras (os íntrons). O gene contém ainda regiões controladoras que vão determinar o momento (idade), local (tecido) e nível apropriados de expressão, em que cada gene será transcrito em uma molécula de RNAm, a qual será exportada para o citoplasma, onde será processada e traduzida em proteína, que desempenhará uma função celular.

Alelo

Uma das diversas formas de um gene. Os alelos são os responsáveis por filhos dos mesmos pais apresentarem características similares, mas não idênticas. Por exemplo, todos os bovinos possuem um gene chamado miostatina que controla o desenvolvimento muscular. Em alguns animais, esse gene pode conter uma mutação que modifica o funcionamento desse gene e resulta em uma maior multiplicação de células musculares. Ou seja, um mesmo gene pode apresentar diferentes alelos que podem influenciar uma determinada característica fenotípica. O melhoramento genético tradicional e o molecular buscam identificar, selecionar e transmitir os alelos mais favoráveis para as características de produção na bovinocultura de corte. Os alelos estão localizados no genoma em posições denominadas de locos.

PCR

A técnica de PCR (do inglês *polymerase chain reaction* ou em português, reação em cadeia da polimerase) foi desenvolvida em meados de 1980 (Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al.*,

1988) e rapidamente tornou-se a técnica mais empregada na biologia molecular. Essa técnica consiste em uma amplificação ou multiplicação exponencial de regiões específicas no DNA, a partir de uma quantidade mínima de material molde inicial (DNA de poucas células). A partir dessa técnica, é possível, sintetizar em laboratório inúmeras cópias de uma sequência de interesse do DNA. O equipamento necessário para a amplificação é conhecido como termociclador, assim denominado por promover a rápida elevação e a diminuição de temperatura, em uma ciclagem programada. Somente com a descoberta da enzima Taq polimerase (enzima que sintetiza DNA) em microrganismos termófilos (que vivem em águas com altas temperaturas) (Saiki *et al.*, 1988) é que foi possível otimizar a PCR em laboratório. A PCR vem sendo empregada no sequenciamento de DNA, teste de paternidade, seleção genética, detecção de defeitos genéticos, diagnóstico do câncer, estudos forenses e identificação de organismos patogênicos em processos infecciosos ou contaminações, por exemplo.

Marcadores moleculares

Marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isoenzimas) ou de um segmento específico de DNA, presente tanto em regiões codificadoras como nas não-codificadoras. Esses segmentos específicos de DNA podem conferir as diferenças fenotípicas entre indivíduos de uma mesma população, ou podem estar próximos a regiões que conferem diferenças fenotípicas. Marcadores podem ser resultado da alteração de uma única base nitrogenada no DNA, chamado de marcador SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism* ou em português polimorfismo de base única). Outras alterações podem resultar da inserção ou deleção de bases em uma região do DNA. Algumas sequências contêm pedaços muito pequenos de DNA que são repetidas muitas vezes pelo genoma e, por isso, são denominadas de SSR (do inglês *simple sequence repeats* ou em português simples sequências repetidas) ou STR (do inglês *short tandem repeats* ou em português pequenas repetições em tandem) ou microssatélites que são bastante

polimórficas. Essas sequências podem ser detectadas de diferentes formas, que variam de acordo com o tempo, acurácia e custos, tanto para produzi-las quanto detectá-las. Equipamentos automatizados para determinação de genótipos têm sido desenvolvidos, o que tem tornado tanto o tempo quanto os custos mais acessíveis para obter a informação de milhares de polimorfismos de DNA de vários animais simultaneamente.

Mapa de ligação

Representa a ordem linear dos marcadores moleculares e/ou genes ao longo dos cromossomos. A construção de mapas de ligação é baseada na mensuração da taxa de recombinação que é consequência do *crossing over* ou permutação, isto é, da recombinação entre locos. Um por cento de recombinação representa um centiMorgan (cM) em unidades de mapeamento, aproximadamente.

Locos de características quantitativas (QTLs)

O mapeamento de QTLs baseia-se na definição de regiões cromossômicas associadas à variação genética de características de interesse econômico. A identificação dessas regiões é dependente do desenvolvimento de mapas genéticos saturados com um número elevado de marcadores moleculares, geralmente de uma população experimental (delineamento F_2 , de filhas ou de netas) oriunda do cruzamento entre raças divergentes, da genotipagem e fenotipagem de um número grande de animais, juntamente com o desenvolvimento de métodos estatísticos. O banco de dados conhecido como CattleQTLdb (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html>, acesso em outubro de 2009) já disponibiliza 2.344 QTLs mapeados para 185 características de bovinos, agrupadas nas categorias exterior (63), sanidade (175), carne (314), leite (741), produção (540) e reprodução (519). No Brasil, um convênio estabelecido entre as unidades da EMBRAPA Gado de Leite e Pecuária Sudeste, ESALQ e UFV tem permitido conduzir estudos genômicos em uma população experimental F_2 oriunda do cruzamento entre as raças Gir e Holandês para características

associadas ao crescimento, carcaça e resistência a parasitas.

Gene candidato

Gene que apresenta ação biológica conhecida e que está envolvido com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma característica de interesse econômico. Genes candidatos também podem ser escolhidos com base em mutações de características identificadas em outras espécies (tais como humanos e camundongo), sugerindo um papel para o gene em características correspondentes nas espécies domésticas; ou então, com base na posição do gene em relação a QTLs já mapeados. O gene da *miostatina*, associado à formação da musculatura dupla em bovinos, é um exemplo bem sucedido da aplicação dessa estratégia (Grobet *et al.*, 1997).

Sequenciamento do genoma

Com o sequenciamento de um genoma é possível determinar a sequência correta de nucleotídeos de todos os genes presentes na espécie e também das regiões intergênicas não-codificadoras, as quais podem conter regiões reguladoras importantes e são fontes da maior parte da variação genética (mutações) observada entre os indivíduos da mesma espécie. A primeira versão da sequência do genoma bovino foi determinada e disponibilizada para acesso público em 2004, obtida a partir do DNA extraído de uma fêmea da raça Hereford. Uma versão mais recente de 2006, já representou uma cobertura de seis vezes a sequência completa do genoma dos mais de 3 bilhões de bases nitrogenadas (~ 3,7 Gb, gigabases). Esforços têm sido realizados no intuito de identificar e caracterizar os genes dos bovinos, por comparação com genes já mapeados em outras espécies. Em 2007, foi publicado o mapa físico do genoma bovino com a contribuição de mais de 20 grupos de pesquisa de oito países (Austrália, Brasil, Canadá, Escócia, Estados Unidos, França, Itália e Nova Zelândia) ao longo de cinco anos. Esse mapa genético foi constituído por um grande banco de dados contendo 422.000 sequências de DNA e mais de 17.000 marcadores (<http://www.bovinegenome.org>).

Mais recentemente, em abril de 2009, a revista Science destacou em sua capa a publicação da sequência do genoma bovino com a identificação de 22.000 genes (Elsik *et al.*, 2009). Com a obtenção da sequência do genoma, é possível visualizar qualquer região nos 29 autossomos e, no cromossomo sexual feminino de bovinos, localizar genes, identificar variações e comparar as sequências de bovinos com outras espécies.

Expressão gênica

A análise da expressão gênica corresponde à análise quantitativa da abundância de RNAs mensageiros (RNAm) transcritos de um gene. Uma amostra pequena de um tecido é suficiente para revelar o seu conteúdo de RNAm característico. Essa população de RNAm corresponde ao conjunto dos genes expressos naquele tecido, em função de uma determinada condição biológica, tratamento ou fase do desenvolvimento. Portanto, a população de RNAm é fonte de identificação de genes candidatos diretamente no tecido de interesse. As etiquetas de sequências expressas (as ESTs, do inglês *expressed sequence tags*) (Adams *et al.*, 1991, detalhado por Hately *et al.*, 1998) são sequências obtidas a partir de uma das extremidades das moléculas de RNAm (causa poli-A). São ferramentas indispensáveis para a identificação de genes e *para a anotação do mapeamento físico do genoma. Mais de 1.500.000 ESTs foram geradas a partir de tecidos de bovinos e encontram-se depositadas no banco público de sequências (NCBI, acesso em outubro de 2009).*

Microarranjos

Os microarranjos de DNA, cDNA ou de oligonucleotídeos são ferramentas desenvolvidas para permitir a detecção e a quantificação da expressão gênica em larga escala. O princípio desse método baseia-se na hibridização de ácidos nucleicos, que é bastante sensível e específica, em consequência das propriedades de complementaridade entre fitas desses ácidos. Os microarranjos consistem em uma matriz altamente ordenada de inúmeras sequências de DNA fixadas a uma plataforma, que pode ser uma

membrana de náilon ou um *slide* de vidro. A amostra biológica de interesse fornece a população de DNA ou RNAm que se pretende quantificar. Esse material biológico é sintetizado na presença de nucleotídeos modificados (com fluorescência ou radioisótopos). Quando hibridizado ao DNA fixado na plataforma, esse material marcado emite um sinal, que é detectado por um *scanner* e convertido em uma leitura quantitativa relativa ao nível de expressão do gene. Essa estratégia tem sido utilizada para a identificação de genes de interesse econômico, porque organismos com características fenotípicas divergentes possivelmente apresentam expressão diferencial dos genes relacionados a essas características. A visão global da expressão gênica fornece a compreensão de mudanças temporais e espaciais na atividade gênica que contribui para a identificação de genes específicos ou de expressão diferenciada em raças ou linhagens distintas. Esses arranjos representam, portanto, ferramentas fundamentais para a determinação das funções biológicas de genes pelo padrão de expressão tecido-específico e, conseqüentemente, para complementar as informações biológicas obtidas no mapeamento de QTLs e nos projetos de sequenciamento para promover a identificação dos genes associados a características complexas, como as de interesse econômico.

Estudos de genômica funcional que vêm sendo desenvolvidos para bovinos incluem um microarranjo contendo 9.274 transcritos expressos nos tecidos muscular e adiposo de bovinos (Lehnert *et al.*, 2004), utilizados para identificar diferenças na expressão de genes na musculatura de animais da raça Brahman sobre restrição alimentar (Reverter *et al.*, 2003; Byrne *et al.*, 2005); e ainda para estudar os mecanismos envolvidos com adipogênese *in vitro* em fibroblastos em diferenciação (Tan *et al.*, 2006); e para investigar genes diferencialmente expressos entre as musculaturas de animais da raça Black japonesa e Holstein (Wang *et al.*, 2005). Outro microarranjo foi construído a partir de 6.887 transcritos associados à resposta imune inata, tendo sido utilizado para caracterizar os padrões de expressão de genes envolvidos no controle de doenças, tanto em bovinos quanto em ovinos (Donaldson *et al.*, 2005). Um total de 45.383 genes

Mais recentemente, em abril de 2009, a revista *Science* destacou em sua capa a publicação da sequência do genoma bovino com a identificação de 22.000 genes (Elsik *et al.*, 2009). Com a obtenção da sequência do genoma, é possível visualizar qualquer região nos 29 autossomos e, no cromossomo sexual feminino de bovinos, localizar genes, identificar variações e comparar as sequências de bovinos com outras espécies.

Expressão gênica

A análise da expressão gênica corresponde à análise quantitativa da abundância de RNAs mensageiros (RNAm) transcritos de um gene. Uma amostra pequena de um tecido é suficiente para revelar o seu conteúdo de RNAm característico. Essa população de RNAm corresponde ao conjunto dos genes expressos naquele tecido, em função de uma determinada condição biológica, tratamento ou fase do desenvolvimento. Portanto, a população de RNAm é fonte de identificação de genes candidatos diretamente no tecido de interesse. As etiquetas de sequências expressas (as ESTs, do inglês *expressed sequence tags*) (Adams *et al.*, 1991, detalhado por Hatey *et al.*, 1998) são sequências obtidas a partir de uma das extremidades das moléculas de RNAm (causa poli-A). São ferramentas indispensáveis para a identificação de genes e para a anotação do mapeamento físico do genoma. Mais de 1.500.000 ESTs foram geradas a partir de tecidos de bovinos e encontram-se depositadas no banco público de sequências (NCBI, acesso em outubro de 2009).

Microarranjos

Os microarranjos de DNA, cDNA ou de oligonucleotídeos são ferramentas desenvolvidas para permitir a detecção e a quantificação da expressão gênica em larga escala. O princípio desse método baseia-se na hibridização de ácidos nucleicos, que é bastante sensível e específica, em consequência das propriedades de complementaridade entre fitas desses ácidos. Os microarranjos consistem em uma matriz altamente ordenada de inúmeras sequências de DNA fixadas a uma plataforma, que pode ser uma

membrana de náilon ou um *slide* de vidro. A amostra biológica de interesse fornece a população de DNA ou RNAm que se pretende quantificar. Esse material biológico é sintetizado na presença de nucleotídeos modificados (com fluorescência ou radioisótopos). Quando hibridizado ao DNA fixado na plataforma, esse material marcado emite um sinal, que é detectado por um *scanner* e convertido em uma leitura quantitativa relativa ao nível de expressão do gene. Essa estratégia tem sido utilizada para a identificação de genes de interesse econômico, porque organismos com características fenotípicas divergentes possivelmente apresentam expressão diferencial dos genes relacionados a essas características. A visão global da expressão gênica fornece a compreensão de mudanças temporais e espaciais na atividade gênica, que contribui para a identificação de genes específicos ou de expressão diferenciada em raças ou linhagens distintas. Esses arranjos representam, portanto, ferramentas fundamentais para a determinação das funções biológicas de genes pelo padrão de expressão tecido-específico e, conseqüentemente, para complementar as informações biológicas obtidas no mapeamento de QTLs e nos projetos de sequenciamento, para promover a identificação dos genes associados a características complexas, como as de interesse econômico.

Estudos de genômica funcional que vêm sendo desenvolvidos para bovinos incluem um microarranjo contendo 9.274 transcritos expressos nos tecidos muscular e adiposo de bovinos (Lehnert *et al.*, 2004), utilizados para identificar diferenças na expressão de genes na musculatura de animais da raça Brahman sobre restrição alimentar (Reverter *et al.*, 2003; Byrne *et al.*, 2005); e ainda para estudar os mecanismos envolvidos com adipogênese *in vitro* em fibroblastos em diferenciação (Tan *et al.*, 2006); e para investigar genes diferencialmente expressos entre as musculaturas de animais da raça Black japonesa e Holstein (Wang *et al.*, 2005). Outro microarranjo foi construído a partir de 6.887 transcritos associados à resposta imune inata, tendo sido utilizado para caracterizar os padrões de expressão de genes envolvidos no controle de doenças, tanto em bovinos quanto em ovinos (Donaldson *et al.*, 2005). Um total de 45.383 genes

identificados na glândula mamária e sistema digestivo de bovinos também resultaram na construção de um microarranjo, que foi utilizado para a identificação de genes associados à resposta ao estrogênio (Li *et al.*, 2006).

Genômica

É o ramo da ciência que reúne os métodos para se revelar e analisar a sequência do DNA ou genoma de um organismo. Inclui o desenvolvimento de marcadores moleculares, a construção de mapas de ligação, o mapeamento de QTLs e genes candidatos, o sequenciamento de DNA, a bioinformática, as análises de expressão gênica (transcriptômica), de proteínas (proteômica) e do metabolismo (metabolômica).

Aplicações da genômica

Marcadores moleculares, associados à deposição de músculo na carcaça e a qualidade da carne, já foram desenvolvidos e têm sido empregados na seleção de bovinos. Esses marcadores foram desenvolvidos a partir da identificação de mutações nas sequências de genes que determinam diversas características em bovinos de corte. Entretanto, existe uma disparidade com relação às características, pois as relacionadas à qualidade da carne (maciez e marmoreio) já dispõem de diversos testes genéticos comerciais, enquanto outras (crescimento, eficiência alimentar, reprodução, resistência a doenças) ainda contam com poucos resultados que possam ser utilizados na prática. Mesmo assim, os estudos têm avançado para essas características, e os resultados experimentais são animadores e dão suporte para que, num futuro breve, testes comerciais também possam ser desenvolvidos e usados rotineiramente nas avaliações genéticas.

Deposição de músculo na carcaça

Talvez o exemplo mais marcante do uso de genômica para a identificação de um gene em bovino de corte tenha sido a descoberta do gene responsável pela característica de maior desenvolvimento muscular em animais das raças Bel-

gian Blue e Piedmontese. As bases genéticas do fenótipo foram exploradas levando à identificação de várias mutações no gene da *miostatina* (ou fator de diferenciação do crescimento 8, membro da superfamília TGF- β) (Grobet *et al.*, 1997; McPherron e Lee, 1997). Essas mutações resultam em proteínas não-funcionais que levam a um aumento significativo da massa muscular do animal, do peso ao nascimento e na eficiência alimentar, e esse aumento da massa muscular deriva principalmente de efeito de hiperplasia (aumento no número de fibras). Entretanto, esse fenótipo também apresenta prejuízos relacionados à diminuição da quantidade de gordura intramuscular (marmoreio), da fertilidade das fêmeas e da tolerância ao estresse (Potts *et al.*, 2003), não havendo, portanto, interesse em fixar esses alelos em algumas raças. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar a heterogeneidade genética associada a essa característica, permitindo a identificação direta das mutações na população por genotipagem. A obtenção prévia do genótipo dos animais pode orientar acasalamentos e transferências de embriões, por exemplo.

Maciez e marmoreio

A genômica também tem contribuído com a avaliação da qualidade de carne em bovinos de corte por meio da identificação de mutações nos genes que determinam as características de maciez e marmoreio. A maciez é determinada, em parte, pela ação das enzimas do complexo calpaína-calpastatina, que atuam na musculatura após o abate do animal (Koochmaraie *et al.*, 1995). As calpaínas contribuem com a maciez da carne porque são endopeptidases intracelulares capazes de degradar proteínas das miofibrilas que constituem o músculo (Wheeler e Koochmaraie, 1994). A atividade das calpaínas é inibida pela ação das calpastatins, que apresentam, portanto, papel repressor da maciez (Pringle *et al.*, 1997). Já o marmoreio é resultado da deposição de gordura intramuscular, promovendo sabor e suculência à carne. Polimorfismos nos genes que codificam calpaína (Page *et al.*, 2002; White *et al.*, 2005), lisil oxidase e calpastatina (Barendse, 2002; Drinkwater *et al.*, 2006) têm sido detectados e associados à maciez, especial-

mente em animais das raças de *Bos taurus taurus* (Barendse, 2002, 2004; Barendse et al., 2004). Para marmoreio, os genes associados têm sido aqueles que codificam a leptina (Buchanan et al., 2002), DGAT1 (Thaller et al., 2003), TG (Barendse et al., 2004), RORC (Barendse, 2004), GH1 (Schlee et al., 1994), SCD, mitocôndria (Mannen et al., 1998; 2003), fator de transcrição mitocondrial A (Jiang et al., 2005) e FABP4 (Michal et al., 2006).

Apesar de muitos resultados relacionados à genômica em bovinos de corte serem ainda experimentais, diversos testes comerciais de DNA vêm sendo disponibilizados no mercado para avaliação da qualidade de carne (para detalhes, vide **Tabela 1**). Muitos desses testes estão sendo empregados em estudos independentes para confirmação da associação de polimorfismos de SNPs com maciez e marmoreio (Page et al., 2004; Casas et al., 2006; Morris et al., 2006; Rincker et al., 2006), mas nem todos têm sido validados, tornando ainda mais difícil o trabalho para que as descobertas da genômica possam ser aplicadas nas diversas raças de bovinos.

Um grande desafio na aplicação de alguns dos polimorfismos inicialmente associados à maciez de carne foi a transferência das infor-

mações que foram originalmente obtidas em *Bos taurus taurus* para *Bos taurus indicus*, já que estes últimos são animais que apresentam carne reconhecivelmente de menor maciez quando comparada às raças taurinas. Polimorfismos identificados no gene da calpaína (*CAPN1*), por exemplo, apresentaram diversidade entre genótipos de *Bos taurus taurus*, mas não em *Bos taurus indicus* (Page et al., 2002; 2004; Casas et al., 2005). Há uma série de SNPs dentro ou muito próximo a esse gene, sendo que dois destes SNPs parecem ser informativos em *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (posição 316 e 4753 pb), mas um SNP a 530 pb parece ser informativo somente em *Bos taurus taurus*. O marmoreio é uma característica mais difícil de ser trabalhada do que a maciez, já que sua avaliação é feita por inspeção visual da carcaça e, portanto, trata-se de uma medida com um maior potencial de erro associado, requerendo grandes amostras de animais para que a média seja estimada apropriadamente. Os estudos que têm avaliado menos do que 1.000 animais não conseguem confirmar uma associação (Hocquette et al., 2007). Salienta-se que uma parceria entre a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universi-

Tabela 1. Testes comerciais de DNA para gado de corte.

Gene ¹	Característica	Ano ²	Inventor	Comerciante ³
TG	marmoreio	2000	CSIRO/MLA	Genetic Solutions P/L
CAST	maciez	2002	CSIRO/MLA/Beef CRC	Genetic Solutions P/L
CAPN1	maciez	2003	USDA/AgResearch NZ	Open
DGTA1	produtividade			
	de gordura no leite	2003	Univ. Of Liege/Tech Uni Muench	Merial
GH1	marmoreio	2003	NIAS, Japan	Prescribe Genomics CO
LEP	marmoreio/gordura	2003	Univ. of Saskatchewan	Merial
Testes				
múltiplos	maciez	2003/2004		Genetics Solutions P/L
GHR	produtividade			
	de leite	2004	Univ. of Liege	Merial
SCD	ácidos graxos	2004	Kobe University	Prescribe Genomics CO
Testes				
múltiplos	marmoreio	2004		Genetic Solutions P/L
CAPN3	maciez	2006	CSIRO/MLA/Beef CRC	Genetic Solutions P/L
Testes				
múltiplos	eficiência			
	alimentar	2006	CSIRO/MLA/Beef CRC	Genetic Solutions P/L

¹múltiplos testes são baseados em vários genes, embora alguns testes não estejam baseados em sequências diretamente associadas com os genes e, para alguns testes, a identidade da sequência não foi revelada. ²ano do início da comercialização. ³primeira empresa a comercializar o teste genético, embora alguns genes, tais como *CAPN1* e *LEP*, sejam comercializados por outros laboratórios. Fonte: Adaptado de Hocquette et al. (2007).

dade de São Paulo, e a empresa Merial® tem buscado a validação de diversos marcadores moleculares em *Bos taurus indicus* do Brasil. Esses marcadores já foram previamente associados com maciez e marmoreio em *Bos taurus taurus*. Outro exemplo é o projeto *Carne bovina de qualidade*, coordenado pela Embrapa e com a colaboração de universidades brasileiras, que tem por objetivo identificar marcadores em animais da raça Nelore.

Outras características investigadas por estratégias genômicas: reprodução e resistência a doenças

Muitos têm sido os esforços para aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho bovino brasileiro. Características reprodutivas permitem a seleção de animais precoces, possibilitando maior intensidade de seleção e, conseqüentemente, maior eficiência do sistema produtivo. Em Nelore, por exemplo, os bezerros nascem com a vaca apresentando entre 2,5-3,0 anos de vida, uma desvantagem em relação aos dois anos das raças europeias. No Brasil, existem animais com capacidade genética, mas que são afetados por condições ambientais distintas de alimentação e manejo, dificultando a sua seleção. A avaliação genética de muitas características de reprodução é difícil de ser realizada acuradamente. Além disso, a herdabilidade das características associadas à fertilidade é considerada baixa (entre 2 a 15%), apesar de que estudos recentes em Nelore revelaram alta herdabilidade para precocidade sexual (Silva *et al.*, 2005).

Duas estratégias têm sido utilizadas na tentativa de associar marcadores moleculares com características de fertilidade: mapeamento de QTLs e genes candidatos. QTLs já foram mapeados para características de fertilidade, incluindo: taxa de ovulação (Kappes *et al.*, 2000), ovulação múltipla (Kappes *et al.*, 2000) e geração de gêmeos (Lien *et al.*, 2000). Os genes que codificam o hormônio liberador de gonadotropina (Schneider *et al.*, 2006), a leptina (Liefers *et al.*, 2005) e o receptor para o hormônio luteinizante bovino (Hastings *et al.*, 2006) têm sido investigados como genes candidatos para características

de fertilidade. O gene da *leptina* tem sido associado com características relacionadas à reprodução por codificar um hormônio que participa da regulação do metabolismo energético, do consumo de alimento e da reprodução em muitos animais, além de participar de outros eventos, inclusive a puberdade. É considerado um gene candidato por sua conhecida relação com a massa de tecido adiposo no corpo e puberdade. Os níveis de leptina no sangue estão relacionados com os níveis de gordura corporal do animal: bovinos pré-púberes desnutridos não entram na puberdade até que sejam nutridos corretamente; da mesma forma, vacas ciclando param de ciclar quando enfrentam períodos de desnutrição extremos. Portanto, a proteína codificada, a partir do gene da *leptina*, age como fator no sistema de reprodução. Polimorfismos neste gene poderiam influenciar a regulação do metabolismo e afetar o ganho de peso, e essas mutações poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento genético. Mutações no gene da *leptina* e em seus receptores causam obesidade mórbida, infertilidade e resistência à insulina em humanos e roedores (Houseknecht e Portocarrero, 1998). Algumas dessas mutações já foram identificadas em bovinos (Buchanan *et al.*, 2002; Choudhary *et al.*, 2005); e estudos de expressão gênica também indicaram uma associação entre a alta expressão desse gene com a baixa expressão do receptor NPY e a ativação da puberdade precoce em novilhas de *Bos taurus indicus* (Vaiciunas *et al.*, 2008). Mas, até o momento, nenhum marcador molecular foi desenvolvido para permitir a seleção para precocidade.

Outros genes candidatos associados à fertilidade têm sido investigados por genômica funcional, com foco na maturação de oócitos (Dalbès-Tran e Mermillod, 2003; Vallee *et al.*, 2005; Massicotte *et al.*, 2006), regressão do corpo lúteo (Bonsdorff *et al.*, 2003; Casey *et al.*, 2005), função das células do epitélio do oviduto (Bauersachs *et al.*, 2003; 2004) endométrio durante o ciclo estral (Bauersachs *et al.*, 2005), desenvolvimento de embrião pré-implantado (El-Halawany *et al.*, 2004; Sirard *et al.*, 2005), entre outros. Como resultado dessa estratégia, espera-se identificar genes ou vias gênicas que, no momento e local apropriados, regulam a

fertilidade das fêmeas. Quando polimorfismos nesses genes são identificados, fica mais fácil a procura por alelos favoráveis.

Outra contribuição importante da genômica para os bovinos de corte reside na resistência a ecto e endoparasitos. O clamor pela redução do uso de produtos químicos utilizados para combater esses parasitos já vem sendo amplamente divulgado, pois, assim, será menor a possibilidade de contaminação da carne e derivados bem como do meio ambiente. Além disso, o uso sistemático de tais produtos pode conferir resistência aos princípios ativos. QTLs sugestivos foram mapeados para resistência a carrapato [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] nos cromossomos 5, 7 e 14 em uma população constituída por F₂ do cruzamento *Bos taurus taurus* (Holandês) x *Bos taurus indicus* (Gir) (Gasparin *et al.*, 2007) e a expressão de genes envolvidos na resposta imune a endoparasitas gastrintestinais (*Cooperia*, *Haemonchus* e *Oesophagostomum*) por meio de PCR quantitativa foi realizada em *Bos taurus indicus* (Nelore) por Bricarello *et al.* (2008). Essas pesquisas visam à identificação dos genes que controlam a resistência a ecto e endoparasitos, permitindo selecionar bovinos naturalmente mais resistentes. Provavelmente, isso reduzirá o uso de medicamentos e produtos químicos contra parasitas, a favor de uma carne mais saudável, livre dos resíduos químicos, diminuindo, dessa forma, barreiras sanitárias impostas pelo comércio internacional de carne bovina.

Perspectivas das aplicações da genômica

Novas fontes de informação molecular vêm sendo estabelecidas para o mapeamento de QTLs em bovinos, que incluem o sequenciamento do genoma e um mapa de SNPs, os quais facilitarão a dissecação das características complexas com a identificação dos alelos específicos.

Painéis de SNPs estão sendo utilizados para promover a genotipagem em larga escala. Um painel contendo 2.641 SNPs de bovinos foi utilizado para genotipar animais das raças Angus, Brahman, Charolais, Dutch Black, White Dairy,

Holstein, Japanese Black, Limousin e Nelore, para levantar informações sobre a diversidade genética da espécie obtida após a domesticação, origem das raças e seleção artificial (McKay *et al.*, 2008). Mesmo representando um estreitamento da diversidade genética, o processo de domesticação e origem das raças de bovinos resultou em relevantes diferenças (ou variabilidade) genéticas entre as raças de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (McKay *et al.*, 2008). Excluindo os dados de genotipagem dos animais das raças de *Bos taurus indicus*, as maiores diferenças genéticas ficaram entre animais produtores de carne *versus* os produtores de leite e raças europeias *versus* raças asiáticas. Esses avanços abrem a possibilidade da criação de raças sintéticas que maximizem os alelos favoráveis de cada subespécie.

Outras plataformas de genotipagem de SNPs já têm sido comercialmente disponibilizadas para bovinos. O MegAllele Genotyping Bovine® contém 10 mil SNPs identificados pelo Projeto de Sequenciamento do Genoma Bovino e o CSIRO, da Austrália. Uma atualização dessa plataforma, contendo 32 mil SNPs, também já está sendo disponibilizada comercialmente. Similarmente, o sistema de genotipagem bovina, denominado de Bovine BeadChip®, contém ~ 10 mil SNPs. Uma nova versão do Bovine iSelect BeadChip® foi desenvolvida em colaboração com USDA-ARS Meat Animal Research Center (MARC), University of Missouri-Columbia e University of Alberta. Essa plataforma de genotipagem permite a análise de 12 amostras em paralelo em apenas um microarranjo com ~ 50 mil SNPs por amostra. O rápido progresso no descobrimento de padrões da variação genética que podem prever o desempenho animal pode ser esperado a partir destes esforços internacionais. Esses marcadores são extremamente úteis para promover o mapeamento fino, cujo objetivo é delimitar a menor região genômica que contém um QTL. Esses painéis de SNPs devem promover uma revolução na genômica animal, por permitir a varredura do genoma de uma população experimental, para milhares de SNPs ao mesmo tempo, a um custo menor e de maneira mais rápida, comparado ao que vem sendo feito hoje com o uso de microssatélites. Além disso, o uso desses painéis de SNP para associações de todo

o genoma com características de interesse comercial está sendo desenvolvido para bovinos de leite e corte.

A tendência será a aplicação da estratégia de Biologia de Sistemas no melhoramento animal. A biologia de sistemas surgiu a partir dos resultados de sucesso das estratégias genômicas e tem como objetivo desenvolver métodos estatísticos e analíticos capazes de associar todas

as informações obtidas a partir de genômica, biologia computacional, química, espectrometria de massa, entre outras. O emprego da biologia de sistemas em conjunto com as estratégias clássicas de melhoramento de seleção fenotípica e genotipagem deverá resultar em uma aplicação mais eficiente das ferramentas moleculares em melhoramento animal (Kitano, 2002; Cassman, 2005).

Referências bibliográficas

- Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merril, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F.; Kerlavage, A.; McCombie, W.R.; Venter, J.C. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v.252, p.651-1656, 1991.
- Barendse, W. **DNA markers for meat tenderness**. Patent: WO/2002/064820. International Application: PCT/AU2002/000122. Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Acesso em 22 de agosto 2008. 2002.
- Barendse, W. **DNA markers for marbling**. Patent: WO/2004/070055. International Application: PCT/AU2004/000127. Disponível em: <http://ep.espacenet.com/>. Acesso em 19 de agosto 2008. 2004.
- Barendse, W.; Bunch, R.; Thomas, M.; Armitage, S.; Baud, S.; Donaldson, N. The TG5 *thyroglobulin* gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. **Australian Journal Experimental Agriculture**, v.44, p.669-674, 2004.
- Bauersachs, S.; Rehfeld, S.; Ulbrich, S.E.; Mallok, S.; Prella, K.; Wenigerkind, H.; Einspanier, R.; Blum, H.; Wolf, E. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.32, p.449-466, 2004.
- Bauersachs, S.; Blum, H.; Mallok, S.; Wenigerkind, H.; Rief, S.; Prella, K.; Wolf, E. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1170-1177, 2003.
- Bauersachs, S.; Ulbrich, S.E.; Gross, K.; Schmidt, S.E.M.; Meyer, H.H.D.; Einspanier, R.; Wenigerkind, H.; Vermehren, M.; Blum, H.; Sinowatz, F.; Wolf, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, p.889-908, 2005.
- Bellinge R.H.S.; Liberles D.A.; Iaschi S.P.A.; O'Brien, P.A.; Tay, G.K. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. **Animal Genetics**, v.36, p.1-6, 2005.
- Bonsdorff, T.; Eggen, A.; Gautier, M.; Asheim, H.C.; Ronningen, K.; Lingaas, F.; Olsaker, I. Identification and physical mapping of genes expressed in the corpus luteum in cattle. **Animal Genetics**, v.34, p.325-333, 2003.
- Buchanan, F.C.; Fitzsimmons, C.J.; Van Kessel, A.G.; Thue, T.D.; Winkelman-Sim, D.C.; Schmutz, S. Association of a missense mutation in the bovine *leptin* gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.105-116, 2002.
- Bricarello, P.A.; Zaros, L.G.; Coutinho, L.L.; Rocha, R.A.; Silva, M.B.; Kooyman, F.N.J.; De Vries, E.; Yatsuda, A.P.; Amarante, A.F.T. Immunological responses and cytokine gene expression analysis to *Cooperia punctata* infections in resistant and susceptible Nelore cattle. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.95-103, 2008.
- Byrne, K.A.; Wang, Y.H.; Lehnert, S.A.; Harper, G.S.; McWilliam, S.M.; Bruce, H.L.; Reverter, A. Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. **Journal of Animal Science**, v.83, p.1-12, 2005.
- Casas, E.; White, S.N.; Wheeler, T.L.; Shackelford, S.D.; Koohmaraie, M.; Riley, D.G.; Chase, C.C.; Johnson, D.D.; Smith, T.P.L. Effects of *calpastatin* and *-calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v.84, p.520-525, 2006.
- Casas, E.; White, S.N.; Riley, D.G.; Smith, T.P.; Breneman, R.A.; Olson, T.A.; Johnson, D.D.; Coleman, S.W.; Bennett, G.L.; Chase, C.C. 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.
- Cassman, M. Barriers to progress in systems biology. **Nature**, v.438, p.1079, 2005.

- Casey, O.M.; Morris, D.G.; Powell, R.; Sreenan, J.M.; Fitzpatrick, R. Analysis of gene expression in non-regressed and regressed bovine corpus luteum tissue using a customized ovarian cDNA array. **Theriogenology**, v.64, p.1963-1976, 2005.
- Choudhary, V.; Kumar, P.; Bhattacharya, T.K.; Bhushan, B.; Sharma, A. DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.740-742, 2005.
- Dalbies-Tran, R.; Mermillod, P. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v.68, p.252-261, 2003.
- Donaldson, L.; Vuocolo, T.; Gray, C.; Strandberg, Y.; Reverter, A.; McWilliam, S.; Wang, Y.; Byrne, K.; Tellam R. Construction and validation of a Bovine Innate Immune Microarray. **BMC Genomics**, v.6, article no 135, 2005.
- Drinkwater, R.D.; Li, Y.; Lenane, I.; Davis, G.P.; Shorthose, R.P.; Harrison, B.E.; Richardson, K.; Ferguson, D.; Stevenson, R.; Renaud, J.; Loxton, I.; Hawken, R.J.; Thomas, M.B.; Newman, S.; Hetzel, D.J.S.; Barendse, W. Detecting quantitative trait loci affecting beef tenderness on bovine chromosome 7 near calpastatin and lysyl oxidase. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.46, p.159-164, 2006.
- El-Halawany, N.; Ponsuksili, S.; Wimmers, K.; Gilles, M.; Tesfaye, D.; Schellander, K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of *in vitro*-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.753-762, 2004.
- Elsik, C.G. *et al.* The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.324, p.522-8, 2009.
- Fujii, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; De Leon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E.; O'Brien, P.J.; MacLennan, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v.253, p.448-451, 1991.
- Gasparin, G.; Miyata, M.; Coutinho, L.L.; Martinez, M.L.; Teodoro, R.L.; Furlong, J.; Machado, M.A.; Silva, M.V.G.B.; Sonstegard, T.S.; Regitano, L.C.A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v.38, p.453-459, 2007.
- Grobet, L.; Martin, L.J.R.; Poncelet, D.; Pirottin, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Menissier, F.; Massabanda, J.; Fries, R.; Hanset, R.; Georges, M. A deletion in the bovine *myostatin* gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v.17, p.71-74, 1997.
- Hatey, F.; Tossier-Klopp, G.; Martinato, C.C.; Mulsant, P.; Gasser, F. Expressed sequence tags for genes: a review. **Genetics Selection and Evolution**, v.30, p.521-554, 1998.
- Hastings, N.; Donn, S.; Derecka, K.; Flint, A.P.; Woolliams, J.A. Polymorphisms within the coding region of the bovine *luteinizing hormone* receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.
- Hiendleder, S.; Lewalskim H.; Janke, A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. **Cytogenetic and Genome Research**, v.20, p.150-156, 2008.
- Hocquette, J.F.; Lehnert, S.; Barendse, W.; Cassar-Malek, I.; Picard, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v.1, p.159-173, 2007.
- Houseknecht, K.L.; Portocarrero, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, p.457-475, 1998.
- Jiang, Z.H.; Kunej, T.; Michal, J.J.; Gaskins, C.T.; Reeves, J.J.; Busboom, J.R.; Dovc, P.; Wright, R.W. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F₂ crosses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.334, p.516-523, 2005.
- Kappes, S.M.; Bennett, G.L.; Keele, J.W.; Echtenkamp, S.E.; Gregory, K.E.; Thallman, R.M. Initial results of genomic scans for ovulation rate in a cattle population selected for increased twinning rate. **Journal of Animal Science**, v.78, p.3053-3059, 2000.
- Kitano, H. Systems Biology: a brief overview. **Science**, v.295, p.1662-1664, 2002.
- Koohmaraie, M.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Lonergan, S.M.; Doumit, M.E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3596-3607, 1995.
- Lehnert, S.A.; Byrne, K.A.; Wang, Y.H. Development and application of a bovine cDNA microarray for expression profiling of muscle and adipose tissue. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.1127-1133, 2004.
- Li, R.W.; Meyer, M.J.; Van Tassell, C.P.; Sonstegard, T.S.; Connor, E.E.; Van Amburgh, M.E.; Boisclair, Y.R.; Capuco, A.V. Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis. **Physiological Genomics**, v.27, p.42-53, 2006.

- Liefers, S.C.; Veerkamp, R.F.; Pas, M.; Chilliard, Y.; Van der Lende, T. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.227-238, 2005.
- Lien, S.; Karlsen, A.; Klemetsdal, G.; Vage, D.I.; Olsaker, I.; Klungland, H.; Aasland, M.; Heringstad, B.; Ruane, J.; Gomez-Raya, L. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. **Mammalian Genome**, v.11, p.877-882, 2000.
- Mannen, H.; Kojima, T.; Oyama, K.; Mukai, F.; Ishida, T.; Tsuji, S. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.36-41, 1998.
- Mannen, H.; Morimoto, M.; Oyama, K.; Mukai, F.; Tsuji, S. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.68-73, 2003.
- Massicotte, L.; Coenen, K.; Mourot, M.; Sirard, M.A. Maternal housekeeping proteins translated during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Proteomics**, v.6, p.3811-3820, 2006.
- McKay, S.D.; Schnabel, R.D.; Murdoch, B.M.; Matukumalli, L.K.; Aerts, J.; Coppieters, W.; Crews, D.; Dias Neto, E.; Gill, C.A.; Gao, C.; Mannen, H.; Wang, Z.; Van Tassell, C.P.; Williams, J.L.; Taylor, J.F.; Moore, S.S. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. **BMC Genetics**, 9: article no 37. 2008.
- McPherron, A.C.; Lee, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.12457-12461, 1997.
- Michal, J.J.; Zhang, Z.W.; Gaskins, C.T.; Jiang, Z. The bovine fatty acid *binding protein 4* gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F₂ crosses. **Animal Genetics**, v.37, p.400-402, 2006.
- Morris, C.A.; Cullen, N.G.; Hickey, S.M.; Dobbie, P.M.; Veenvliet, B.A.; Manley, T.R.; Pitchford, W.S.; Kruk, Z.A.; Bottema, C.D.K.; Wilson, T. 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.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.
- Page, B.T.; Casas, E.; Heaton, M.P.; Cullen, N.G.; Hyndman, D.L.; Morris, C.A.; Crawford, A.M.; Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M.; Keele, J.W.; Smith, T.P.L. 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.; Casas, E.; Quaas, R.L.; Thallman, R.M.; Wheeler, T.L.; Shackelford, S.D.; Kochmaraie, M.; White, S.N.; Bennett, G.L.; Keele, J.W.; Dikeman, M.E.; Smith, T.P.L. 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.8, p.3474-3481, 2004.
- Potts, J.K.; Echterkamp, S.E.; Smith, T.P.L.; Reecy, J.M. Characterization of gene expression in double-muscléd and normal-muscléd bovine embryos. **Animal Genetics**, v.34, p.438-444, 2003.
- Pringle, T.D.; Williams, S.E.; Lamb, B.S.; Johnson, D.D.; West, R.L. 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.
- Reverter, A.; Byrne, K.A.; Bruce, H.L.; Wang, Y.H.; Dalrymple, B.P.; Lehnert, S.A. A mixture model-based cluster analysis of cDNA microarray gene expression data on Brahman and Brahman composite steers fed high, medium and low quality diets. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1900-1910, 2003.
- Rincker, C.B.; Pyattm, N.A.; Berger, L.L.; Faulkner, D.B. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **Journal of Animal Science**, v.84, p.686-693, 2006.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1988.
- Schlee, P.; Graml, R.; Rottmann, O.; Pirchner, F. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.111, p.253-256, 1994.
- Schneider, F.; Tomek, W.; Grundker, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. **Theriogenology**, v.66, p.691-709, 2006.
- Silva, J.A.V.; Dias, L.T.; Albuquerque, L.G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1568-1572, 2005.
- Sirard, M.A.; Dufort, I.; Vallee, M.; Massicotte, L.; Gravel, C.; Reghenas, H.; Watson, A.J.; King, W.A.; Robert, C. Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array.

Reproduction, Fertility and Development, v.17, p.47-57, 2005.

- Tan, S.H.; Reverter, A.; Wang, Y.; Byrne, K.A.; McWilliam, S.M.; Lehnert, S.A. Gene expression profiling of bovine *in vitro* adipogenesis using a cDNA microarray. **Functional & Integrative Genomics**, v.6, p.235-249, 2006.
- Thaller, G.; Ku, C.; Winter, A.; Ewald, A.; Bellmann, O.; Wegner, J.; ZU, H.; Fries, R. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v.34, p.354-357, 2003.
- Torres, A.D.P. **Melhoramento dos Rebanhos**. 4ª. Edição. São Paulo, Editora Nobel. 399p. 1981.
- Vaiciunas, A.; Coutinho, L.L.; Meirelles, F.V.; Pires, A.V.; Silva, L.F.P. *Leptin* and *hypothalamic* gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.657-664, 2008.
- Vallee, M.; Gravel, C.; Palin, M.F.; Reghenas, H.; Stothard, P.; Wishart, D.S.; Sirard, M.A. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. **Biology of Reproduction**, v.73, p.63-71, 2005.
- Wang, Y.H.; Byrn, K.A.; Reverter, A.; Harper, G.S.; Taniguchi, M.; McWilliam, S.M.; Mannen, H.; Oyama, K.; Lehnert, S.A. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. **Mammalian Genome**, v.16, p.201-210, 2005.
- Wheeler, T.L.; Koohmaraie, M. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine *longissimus* muscle. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1232-1238, 1994.
- White, S.N.; Casas, E.; Wheeler, T.L.; Shackelford, S.D.; Koohmaraie, M.; Riley, D.G.; Chase, C.C.Jr; Johnson, D.D.; Keele, J.W.; Smith, T.P.L. A new single nucleotide polymorphisms 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.