

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS NOS GENES *FABP3* E *FABP4*
E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DE
INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DE CORTE

Acadêmica: Isabella Maiumi Zaidan Blecha

Aquidauana-MS
Agosto de 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEOTÍDEOS ÚNICOS NOS GENES *FABP3* E *FABP4*
E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DE
INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DE CORTE

Acadêmica: Isabella Maiumi Zaidan Blecha
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz
Co-orientadora: Dra. Fabiane Siqueira

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.”

Aquidauana-MS
Agosto de 2014

B588i Blecha, Isabella Maiumi Zaidan

Identificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos nos genes *FABP3* e *FABP4* e associação com características de interesse econômico em bovinos de corte/Isabella Maiumi Zaidan Blecha. Aquidauana, MS: UEMS, 2014.

71p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2014.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz.

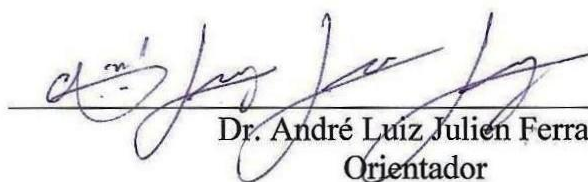
1. Genes candidatos 2. Marcadores moleculares 3. Melhoramento genético animal I. Título.

CDD 20.ed. 636.213072

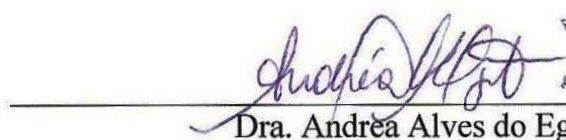
ISABELLA MAIUMI ZAIDAN BLECHA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06/02/2014.



Dr. André Luiz Juliên Ferraz
Orientador



Dra. Andréa Alves do Egito



Dra. Fabiana Andrade Melo Sterza

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Aos meus amados pais, Ailton Blecha Vidal e Lilyan Morimatsu Zaidan Vidal,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, que nunca me desampararam, obrigada pela vida, por abençoarem minhas escolhas e por colocarem pessoas e oportunidades tão especiais no meu caminho.

Aos meus pais Ailton e Lilyan, por toda a educação, disciplina, dedicação e, principalmente, pelo amor. Obrigada pelo apoio e incentivo, requisitos que contribuíram de forma imensurável para essa conquista.

Aos demais familiares que acompanharam e torceram pelo meu sucesso nessa trajetória.

Aos meus orientadores André Luiz Julien Ferraz e Fabiane Siqueira, exemplos de dedicação profissional, sou muito grata pelas oportunidades, paciência e compreensão, pelo enorme aprendizado pessoal e científico adquiridos nesse tempo de convivência tão prazerosa. Obrigada por todo o auxílio e acima de tudo, por acreditarem em mim.

À Anna Beatriz Robottom Ferreira pela atenção despendida, por todo o auxílio, paciência, disponibilidade, incentivo e por todas as sugestões.

Ao Dr. Gelson Luis Dias Feijó pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos demais membros da Rede “Bife de Qualidade”, na qual este projeto está inserido, pela participação e contribuições.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado e pela bolsa de estudos.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

À Embrapa e ao CNPq, pela concessão do auxílio financeiro.

À Embrapa Gado de Corte, pela infraestrutura laboratorial.

Aos docentes e funcionários da UEMS e Embrapa Gado de Corte que se fizeram presentes ao longo dessa caminhada.

Aos colegas do mestrado, pela receptividade, grupos de estudos, por todo auxílio prestado e atenção despendida, pela convivência e afetuosidade.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, os que já seguiram seus caminhos e os que começam a trilhá-lo agora, por participarem deste momento especial e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida.

Aos meus velhos amigos, que souberam compreender minhas angústias e ausência durante esse período.

A todos que colaboraram de alguma forma para tornar esse sonho realidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO	xv
<i>ABSTRACT</i>	xvii

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. CARACTERÍSTICAS QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE BOVINA	3
2.1.1. MACIEZ	3
2.1.2. GORDURA INTRAMUSCULAR E GORDURA SUBCUTÂNEA	4
2.1.3. ÁREA DE OLHO DE LOMBO	6
2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA GENOTIPAGEM	6
2.2.1. RFLP (<i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i>)	6
2.2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	8
2.2.3. SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE DNA	9

2.2.4. PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	10
2.3. MARCADORES MOLECULARES	13
2.3.1. SNPs	13
2.4. GENES <i>FABP3</i> E <i>FABP4</i>	16
3. REFERÊNCIAS.....	18

CAPÍTULO 2. IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *FABP3* E *FABP4* EM BOVINOS DE CORTE 26

RESUMO	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS.....	34

CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 42

APÊNDICE - METODOLOGIA COMPLETA	43
---------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Curva de amplificação do qPCR.....	11
FIGURA 2. Elementos da tecnologia TaqMan	12
FIGURA 3. Prospecção de SNPs em sequências aleatórias	14

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Esquema representativo dos genes bovinos <i>FABP3</i> e <i>FABP4</i>	50
FIGURA 2. Produto amplificado por PCR do SNP <i>FABP4/TasI</i> em gel de agarose 1% corado com Sybr Gold.	50
FIGURA 3. Perfil eletroforético representativo do SNP <i>FABP4/TasI</i> após PCR-RFLP.....	51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Sequências dos oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R) utilizadas no sequenciamento e tamanho dos fragmentos amplificados (<i>amplicon</i>).....	38
TABELA 2	Sequência dos oligonucleotídeos e repórteres utilizados na qPCR.....	38
TABELA 3	Descrição dos SNPs, localização e códigos no dbSNP.....	38
TABELA 4	Frequências alélicas dos polimorfismos <i>FABP3-G/A</i> , <i>FABP4-G/C</i> e <i>FABP4/Tasl</i> para os sete grupos genéticos e para a amostra total.....	39
TABELA 5	Frequências genotípicas e nível de significância do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos <i>FABP3-G/A</i> , <i>FABP4-G/C</i> e <i>FABP4/Tasl</i> geral e por grupo genético.....	39
TABELA 6	Valor de significância (P), médias e erro padrão das características fenotípicas analisadas para os genótipos dos marcadores <i>FABP3-G/A</i> , <i>FABP4-G/C</i> e <i>FABP4/Tasl</i>	40
TABELA 7	Valor de significância (P), médias e erro padrão das relações entre área de olho de lombo e peso de carcaça quente (AOLPCQ), teor de gordura na carcaça (EGCCARC) e espessura de gordura por dias de confinamento (EGCDIA) para os genótipos dos marcadores <i>FABP3-G/A</i> , <i>FABP4-G/C</i> e <i>FABP4/Tasl</i>	41
TABELA 8	Efeito médio da substituição alélica e erro padrão para os polimorfismos que apresentaram associação significativa.....	41

CAPÍTULO 3

TABELA 1	Touros e matrizes utilizadas nos cruzamentos e grupos genéticos gerados com suas respectivas porcentagens de taurino e adaptado.....	44
TABELA 2	Composição e níveis nutricionais das dietas fornecidas aos animais durante o período de confinamento.....	44

TABELA 3	Frequências dos animais por grupo genético, sexo e tipo de dieta fornecida nos dois anos de confinamento (Safras 2007 e 2008).....	45
TABELA 4	Sequências dos <i>oligonucleotídeos direto</i> (F) e <i>reverso</i> (R) utilizadas no sequenciamento e tamanho dos fragmentos amplificados (<i>amplicon</i>).....	48
TABELA 5	Sequência dos oligonucleotídeos e <i>reporters</i> utilizados na qPCR.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

A-FABP - Proteína de ligação de ácidos graxos nos adipócitos
AFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
AOL - Área de olho de lombo
AOLPCQ - Relação da área de olho de lombo por peso de carcaça quente
AOLus - Área do músculo *Longissimus dorsi* mensurada por ultrassonografia
CAPN - Gene codificante da calpaína
CAST - Gene codificante da calpastatina
CC - Canchim
CCAN - Canchim - Red Angus/Nelore
CCCN - Canchim - Caracu/Nelore;
CCD - Dispositivo de Carga Acoplada
CCVN - Canchim -Valdostana/Nelore
CR - Caracu
CRAN - Caracu - Red Angus/Nelore
CRCN - Caracu - Caracu/Nelore
CRVN - Caracu - Valdostana/Nelore
Ct - Ciclo de “*threshold*”
dATP - Desoxiadenosina trifosfato
DCONF - Dias de confinamento
dCTP - Desoxicitidina trifosfato
ddNTPs - Didesoxinucleotídeos trifosfatos
DGAT1 - Gene codificante da enzima Diacilglicerol O-aciltransferase 1
dGTP - Desoxiguanosina trifosfato
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsDNA - DNA fita dupla
dTTP - Desoxitimidina trifosfato
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGC - Espessura de gordura subcutânea mensurada na carcaça
EGCCARC - Relação de teor de gordura na carcaça
EGCDIA - Relação de espessura de gordura por dias de confinamento
EGSus - Espessura de gordura subcutânea mensurada por ultrassonografia
Exo I - Exonuclease I
FABP - Proteína de ligação de ácidos graxos
FABP3 - Proteína de ligação de ácidos graxos tipo 3
FABP4 - Proteína de ligação de ácidos graxos tipo 4
FC - Força de cisalhamento
GLM - Modelo Linear Geral
H-FABP - Proteína de ligação de ácidos graxos no coração
kg - Quilos
LEP - Gene codificante da leptina
MARM - Grau de marmoreio
MAS - Seleção assistida por marcadores
MATFIS - Maturidade fisiológica
MDGI - Inibidor de crescimento de derivado mamário
mm - Milímetros
mM - Milimolar
MS - Mato Grosso do Sul

N - Nelore
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng - Nanograma
PAB - Peso de abate em jejum
pb - Pares de bases
PCQ - Peso de carcaça peso de carcaça quente
PCR - Reação em cadeia da polimerase
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
QTL – Locos que controlam características quantitativas
RA - Red Angus
RACN - Red Angus - Caracu/Nelore.
RAPD - Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RCQ - Rendimento de carcaça quente
RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA - Ácido Ribonucléico
S - Sul, coordenada geográfica
SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único
TEXT - Textura da carne por avaliação subjetiva visual
TG - Gene codificante da tireoglobulina
UI - Unidade
UTR - Região não traduzida
V - Valdostana
W - Oeste, coordenada geográfica
μL - Microlitro
μM - Micromolar

RESUMO

Para minimizar a variação na qualidade da carne e da carcaça bovina, diversas pesquisas estão sendo conduzidas com o intuito de utilizar informações genéticas obtidas a partir de marcadores moleculares associados com características de interesse econômico. O gene *FABP3* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) está envolvido no transporte de ácidos graxos da membrana celular para sítios intracelulares e o gene *FABP4* (*Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*) está associado com metabolismo de lipídios, marmoreio e deposição de gordura subcutânea. Neste contexto, objetivou-se identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *FABP3* e *FABP4* por meio de sequenciamento automático de DNA e avaliar a associação dos SNPs identificados com características de qualidade de carne e carcaça em bovinos de corte. As amostras biológicas para extração de DNA e informações fenotípicas foram coletadas de 201 animais cruzados terminados em sistema superprecoce. Os animais analisados foram obtidos a partir de cruzamentos de touros Canchim (CC), Caracu (CR) e Angus (RA) com matrizes cruzadas F1 filhas de touros Valdostana (VN), Caracu (CN) e Angus (AN) com fêmeas Nelore, sendo que o touro RA foi utilizado apenas em matrizes CN, totalizando sete grupos genéticos. Baseando-se nos dados das análises fenotípicas de avaliação de carcaça e de qualidade de carne, foram montados quatro *pools* de DNA com 14 animais representantes dos extremos da distribuição de grau de marmoreio e espessura de gordura subcutânea e um *pool* de DNA com 18 touros utilizados nos cruzamentos para a prospecção de SNPs por meio de sequenciamento automático de DNA. Um total de 14 SNPs foram identificados nessa varredura. Três destes polimorfismos foram selecionados para validação com genotipagem por técnicas de biologia molecular e estudo de associação com características de produção. Nos estudos de associação, o efeito de cada marcador sobre as características fenotípicas estudadas foi analisado utilizando-se o procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa estatístico SAS. Foram observadas associações significativas entre o marcador *FABP4/TasI* com textura da carne ($P = 0,053$) e marmoreio ($P = 0,052$). Não foram observadas associações significativas entre o marcador *FABP4-G/C* e as características de qualidade de carne e carcaça. O marcador *FABP3-G/A*

apresentou associação significativa com área de olho de lombo ($P = 0,035$) e AOL em relação ao peso de carcaça quente (cm^2/kg) ($P = 0,025$), sendo observado que o alelo A está associado com a diminuição da espessura de gordura e com o aumento da área de olho de lombo. Mais estudos são necessários para se determinar o efeito de polimorfismos nesses genes, já que eles estão localizados em regiões de QTL (*Quantitative Trait Loci*) para características de interesse.

Palavras-chaves: genes candidatos, marcadores moleculares, melhoramento genético animal, qualidade de carne e carcaça

ABSTRACT

To minimize variation in meat quality and carcass beef, several investigations have been directed in order to use genetic information obtained from molecular markers associated with traits of economic interest. The Heart Fatty Acid Binding Protein (*FABP3*) is involved in the transport of fatty acids from the cell membrane to intracellular sites and the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein (*FABP4*) is associated with lipid metabolism, marbling and subcutaneous fat deposition. Thus, this study aimed to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *FABP3* and *FABP4* genes by automated sequencing DNA and the association of SNPs with characteristics of meat and carcass quality in beef cattle. Biological samples for DNA extraction and phenotypic information were collected from 201 crossbred animals finished in *superprecoce* system. The animals studied were derived from the terminal crossbreeding system in which animals from the Canchim (CC), Caracu (CR) and Angus (RA) breeds are with F1 cows of Valdostana (VN), Caracu (CN) and Angus (AN) sires with Nellore females. Based on the data analysis of the phenotypic evaluation of carcass and meat quality, four DNA pools were assembled with 14 animals representatives in the top and bottom of the marbling and fat thickness distributions and one DNA pool with 18 bulls used in the crosses for prospecting SNPs by automated DNA sequencing. A total of 14 SNPs were identified in this scan, 3 of which were selected for validation by genotyping with molecular biology techniques and analyzed for association with production traits. For the association studies, the effect of each marker on phenotypic traits was observed by the General Linear Model (GLM) of the SAS statistical program. Significant associations were noted between the *FABP4/TasI* marker with texture ($P = 0.053$) and marbling ($P = 0.052$). There were no significant associations between the marker *FABP4-G/C* and meat and carcass characteristics. The *FABP3-G/A* was significantly associated with rib eye area ($P = 0.035$) and with the relationship between AOL and hot carcass weight (cm^2/kg) ($P = 0.025$). The allele A of this marker was associated to decreased fat thickness and increased rib eye area. Further studies are necessary to assess the effect of polymorphisms in these genes, since they are located in QTL (Quantitative Trait Loci) regions for traits of interest.

keywords: animal breeding, candidate gene, meat and carcass quality, molecular markers

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a pecuária de corte ocupa uma posição de destaque na economia. O país possui o maior rebanho comercial do mundo com uma produção de aproximadamente 9,8 milhões de toneladas de carne (ABIEC, 2012). Apesar da representatividade do país nesse setor, é necessário mais investimento para que a sua produtividade, qualidade, eficiência e competitividade sejam consolidadas.

Para agregar valor ao produto e atender os nichos de mercado de alta qualidade, a aplicação de estratégias que envolvam desde a escolha de material genético, a adequação do sistema de produção e oferta de matéria prima padronizada às indústrias da carne se faz cada vez mais necessária (LUCHIARI FILHO, 2006).

Em bovinos, a seleção para fenótipos superiores tem sido praticada desde a sua domesticação, ocorrida há, aproximadamente, 7.500 - 10.000 anos (SONSTEGARD & VAN TASSEL, 2004). O melhoramento genético animal é o produto da aplicação de técnicas que alteram as frequências alélicas dos genes, a fim de se aumentar a produtividade e a qualidade do produto final, em um determinado ambiente e com a garantia de que essas alterações serão refletidas nas próximas gerações (FERRAZ & ELER, 2010).

A mudança na composição genética das populações com a finalidade de melhoria genética e incrementos de produção ocorre basicamente por meio da seleção e do sistema de acasalamento. A seleção é definida como a decisão de permitir que os melhores indivíduos de uma geração sejam pais da geração subsequente e o acasalamento é responsável pelos genótipos que serão gerados (EUCLIDES FILHO, 1999).

Até o início do século XX, a maioria do progresso genético obtido para as características de interesse era baseada apenas na avaliação visual. Por volta de 1930, teve início o estabelecimento de métodos científicos, estatísticos e computacionais para avaliação genética de animais domésticos e, desde então, o melhoramento tradicional, baseado na genética quantitativa, tem

proporcionado ganho genético para a maioria das características de interesse econômico (RESENDE, 2007).

Grande parte do ganho genético obtido tem sido decorrente da seleção baseada diretamente no fenótipo ou em estimativas do valor genético derivado do fenótipo dos animais. Esta seleção é realizada com base na probabilidade de semelhança genética entre os indivíduos, fundamentada na semelhança entre parentes, sem o conhecimento do número e do efeito dos genes que atuam nas características de interesse (DEKKERS, 1997).

Por volta de 1990, o foco das pesquisas em genética quantitativa passou a ser direcionado também para a genética molecular. Uma das justificativas é que o uso de informações obtidas a partir do DNA possibilita acelerar o ganho genético em relação ao método tradicional (MEUWISSEN et al., 2001). Quando os marcadores de DNA se mostram associados às características de interesse, podem se constituir em poderosa ferramenta no processo de melhoramento genético (CARRIJO, 2004).

Os estudos destinados à seleção animal verificam que, além dos conceitos de genética quantitativa, as técnicas moleculares podem incrementar os efeitos dos métodos de seleção. Dessa forma, os marcadores moleculares podem ser direcionados para identificar animais com genótipos superiores para determinadas características nos programas de melhoramento genético animal.

Diversos polimorfismos nos genes bovinos *FABP3* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) e *FABP4* (*Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*) foram sugeridos como marcadores moleculares por estarem associados com deposição de tecido adiposo (SPECHT et al., 1996; ROY et al., 2003; MICHAL et al., 2006; BARENDSE et al., 2009).

O *FABP3* foi mapeado no cromossomo 2, está envolvido no transporte de ácidos graxos da membrana celular para sítios intracelulares, se expressa, principalmente, nos músculos esquelético e cardíaco e, em suínos, está localizado em uma região de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associada com características de deposição de gordura (VEERKAMP; MAATMAN, 1995; ROY et al., 2003).

O gene *FABP4* está localizado no cromossomo 14, se expressa no tecido adiposo e está associado com metabolismo de lipídios, marmoreio e deposição de gordura subcutânea (SPECHT et al., 1996; MICHAL et al., 2006).

Entretanto, devido à alta variação observada nos resultados de estudos de frequências e associações desses marcadores em bovinos de corte, faz-se necessário a análise genotípica em diversos grupos populacionais, diferindo tanto em tamanho amostral, raças ou grupos genéticos e sistemas de produção. Dessa forma, são necessárias pesquisas que viabilizem estratégias de utilização de recursos genéticos para os diversos sistemas de produção do País.

Neste contexto, objetivou-se prospectar SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) nos genes *FABP3* e *FABP4* por meio de sequenciamento automático de DNA e avaliar a associação desses polimorfismos com características de qualidade de carcaça e carne em bovinos de corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE BOVINA

A qualidade da carne depende de todos os processos envolvidos com o animal durante a cadeia produtiva, pois a grande variação encontrada na composição corporal de animais de corte e suas carcaças ocorrem devido à genética, práticas de criação, produção e comercialização e, até mesmo, com o preparo do produto (LUCHIARI FILHO, 2000).

2.1.1 MACIEZ

A maciez é considerada a característica organoléptica de maior influência na escolha da carne pelos consumidores (PAZ & LUCHIARI, 2000).

Existem duas formas de se avaliar a maciez da carne, podendo ser por meio subjetivo ou objetivo. O método subjetivo se utiliza de painel sensorial em que um grupo de pessoas treinadas prova e classifica as amostras de carne em relação à maciez. O método objetivo utiliza equipamento que mede a força necessária para o cisalhamento de uma amostra de carne e, quanto maior a força dispensada, menor será a maciez no corte de carne (ALVES & MANCIO, 2007).

Koohmaraie (1992) atribuiu que a maior parte da variação na maciez é decorrente de um processo enzimático *post-mortem*, conhecido como maturação da carne. A degradação de proteínas miofibrilares que ocorre nesse processo é controlada pela ação da enzima calpaína e sua inibidora calpastatina (DELGADO, 2001).

Segundo Rubensam et al. (1998), os animais da subespécie *Bos taurus indicus* produzem carne menos macia, quando comparados com animais da subespécie *Bos taurus taurus* e com os seus cruzamentos (*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*), devido a maior atividade da calpastatina quando ocorre aumento da proporção de sangue *Bos taurus indicus* em cruzamentos.

Devido a maciez da carne ser afetada por diversos fatores e processos, as informações obtidas por meio de marcadores moleculares podem ser de grande utilidade para a identificação de animais de alto valor genético para essa característica (PINTO et al., 2010).

2.1.2 GORDURA INTRAMUSCULAR E GORDURA SUBCUTÂNEA

O desenvolvimento dos tecidos que compõe o corpo dos bovinos ocorre em uma sequência já estabelecida, sendo que ao nascer o tecido nervoso dos bezerros já está praticamente formado. Em sequência, ocorre a deposição do tecido ósseo, seguido do muscular e, por fim, o adiposo, caracterizando um crescimento alométrico em que cada tecido possui uma velocidade diferente de crescimento (LUCHIARI FILHO, 2000).

A distribuição de tecido adiposo ocorre primeiramente como gordura abdominal, seguida da intermuscular, subcutânea (de cobertura) e, por último, a gordura intramuscular, comumente chamada de marmoreio (PETHICK et al., 2004).

Segundo Nishimura et al. (1999), o marmoreio é uma das principais características utilizadas para determinar o grau de qualidade da carne bovina no Japão e nos Estados Unidos. Essa gordura intramuscular refere-se aos depósitos de gordura visualmente perceptíveis dentro de músculos e que pode determinar o aroma, o sabor, a suculência da carne e, provavelmente, sua dureza (FERNANDEZ et al., 1999, THALLER et al., 2003; WILLIAMS, 2008).

Devido ao marmoreio ser altamente influenciado por fatores genéticos, é possível obter resultados satisfatórios optando por grupos genéticos com

maior potencial para o desenvolvimento dessa característica associado ao uso de uma nutrição que favoreça a síntese de ácidos graxos necessários (POLIZEL NETO et al., 2008). A variação na síntese dos ácidos graxos e até mesmo o número de células especializadas, também são responsáveis pelos diferentes níveis encontrados nessa característica (WILLIAMS, 2008).

O tipo de terminação adotado também pode acarretar alterações na porcentagem de marmoreio. Para um mesmo peso de carcaça, a gordura intramuscular é superior para animais confinados submetidos a dietas com alta energia em relação aos animais terminados a pasto devido à diferença na energia líquida disponível (PETHICK et al., 2001).

Além disso, a herdabilidade moderada para maciez, cor, marmoreio e perda por cozimento (WOLCOTT et al., 2009) sugerem que as características de qualidade da carne poderiam ser melhoradas pela seleção em bovinos de corte. Devido à distribuição e quantidade de gordura apresentarem esse importante impacto na qualidade da carcaça e da carne de bovinos, um dos principais objetivos nos programas de melhoramento genético é alcançar valores ideais de gordura para melhorar a rentabilidade da indústria da carne (TIZZIOTO, 2010).

A espessura de gordura subcutânea (EGC), ou gordura de acabamento, é um componente notável na qualidade da carne e carcaça de bovinos, pois lhe confere maior palatabilidade e é o principal parâmetro para determinar o ponto de abate. Além desses fatores, a gordura subcutânea é essencial no processo pós-abate, pois atua como isolante térmico, evitando a rápida queda de temperatura dos músculos que pode levar ao endurecimento da carne. Esse processo é denominado “*cold-shortening*” e ocorre devido ao encurtamento do sarcômero (LOCKER & HAGYARD, 1963).

De acordo com Luchiari Filho (2000), para evitar o aparecimento desse fenômeno que afeta de maneira significativa a maciez da carne, é desejável um mínimo de espessura de gordura subcutânea avaliada na altura da 12ª costela de 2 a 2,5 mm para cada 100 kg de carcaça.

Em contrapartida, Luchiari Filho (2006) afirma que a quantidade de gordura traz um apelo muito mais forte com relação ao fato de ser prejudicial à saúde, do que ao fato de estar relacionada com a qualidade e maciez e que a

tendência é de carcaças com moderado ou menor teor de gordura possível para atender a demanda dos consumidores.

Dessa forma, identificar marcadores associados a essas características poderá auxiliar no melhoramento genético de bovinos de corte, já que a mensuração da gordura subcutânea dos animais ocorre tardiamente (BASARAB et al., 2004).

2.1.3. ÁREA DE OLHO DE LOMBO

Segundo Luchiari Filho (2000) nem todos os animais de uma mesma espécie ou raça desenvolvem e terminam na mesma idade cronológica, animais tardios apresentam maior peso de abate e de carcaça e maior área de olho de lombo, indicando maior quantidade de carne na carcaça, enquanto que animais precoces diminuem antecipadamente a deposição de tecido magro em detrimento da deposição do tecido adiposo.

Por estar relacionada com a musculosidade do animal e com o rendimento dos cortes cárneos de alto valor comercial, a área de olho de lombo (AOL) é uma característica indicadora da composição da carcaça (LUCHIARI FILHO, 2000).

Dessa forma, a avaliação da área de olho de lombo auxilia na estimativa do grau de musculosidade e da porção comestível da carcaça sendo que na medida em que aumenta a AOL, aumenta a porção comestível da carcaça e vice-versa (GESUALDI JUNIOR et al., 2006).

A área de olho de lombo é estimada geralmente por meio de ultrassonografia, entretanto essa medida é subjetiva, sendo confirmada somente com a mensuração após o abate.

2.2 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA GENOTIPAGEM

2.2.1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*)

A descoberta e isolamento de enzimas de restrição na década de 1960 definiram fundamentos para os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP. Esta técnica permitiu, pela primeira vez, a análise de sequências não-codificantes ou alterações silenciosas na sequência de codificação de proteínas (SCHLÖTTERER, 2004).

RFLP é uma variação resultante de mutações pontuais, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinadas enzimas, podendo também resultar de eventos de inserção ou deleção entre dois sítios de restrição adjacentes (REGITANO & COUTINHO, 2001). Qualquer mutação que altera uma determinada sequência de reconhecimento, criando um sítio de restrição para uma endonuclease, pode ser detectada por meio da metodologia de RFLP (RAMALHO et al., 2004).

A técnica de RFLP foi descrita, inicialmente, por Botstein et al. (1980) e consistia na extração de DNA; hidrólise com enzimas de restrição; separação dos fragmentos por eletroforese; transferência do DNA para uma membrana; hibridização com sondas homólogas e revelação dos fragmentos hibridizados por autorradiografia. No entanto, sua utilização ficou restrita devido ser uma técnica muito laboriosa, usar sondas radioativas e demandar grandes quantidades de DNA, sendo, dessa forma, substituída por técnicas mais eficazes (OLIVEIRA, 2007).

Somente com o advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), foi possível analisar esses fragmentos sem o uso de radioatividade, por meio da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Com essa técnica, um fragmento de DNA é amplificado e clivado com endonucleases, os fragmentos gerados são separados por eletroforese e visualizados por meio de corantes intercalantes com o DNA.

RFLP foi a primeira técnica relatada para a detecção de polimorfismos de DNA e, atualmente, diversos polimorfismos já foram genotipados pela técnica aprimorada de PCR-RFLP e associados com características de qualidade de carne e carcaça em animais de produção (BARENDSE, 1999; WHITE et al., 2005; RINCON & MEDRANO, 2006; MICHAL et al., 2006).

Apesar de ser uma técnica vantajosa, pois apresenta um custo viável e alta reprodutibilidade, tem como desvantagens a prevalência de dialelismo, que a torna bastante limitada para o mapeamento genético, a presença de alelos raros e até mesmo o grau de dificuldade da técnica (REGITANO & COUTINHO, 2001).

2.2.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary B. Mullis e colaboradores em 1983, sendo utilizada primeiramente como uma nova metodologia para diagnóstico de anemia falciforme (SAIKI et al., 1985).

Essa metodologia permite a amplificação “*in vitro*” de qualquer sequência de ácidos nucleicos, por meio de um processo exponencial que resulta em um grande número de cópias idênticas, independente da origem do material biológico.

É considerada uma das técnicas que mais contribuiu para o avanço em estudos de biologia molecular. A eficácia de sintetizar enzimaticamente grandes quantidades de material genético e a alta sensibilidade da reação permitiu progressos científicos significativos em todas as áreas de investigação genômica, como detecção de genes, de agentes infecciosos e diagnóstico de doenças genéticas (NOVAIS & ALVES, 2004).

A síntese de fragmentos de DNA é possível utilizando a enzima DNA polimerase, oligonucleotídeos ou iniciadores, também chamados de *primers* e que flanqueiam a região alvo, e um DNA molde (MULLIS, 1990). A reação requer também a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP e dGTP).

A reação baseia-se no anelamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Após a desnaturação do DNA, onde a fita dupla se separa por ação de alta temperatura, cada iniciador hibridiza com uma fita oposta da sequência alvo e é orientado de tal forma que a síntese de DNA ocorra por meio da região compreendida entre estes. Os iniciadores hibridados são estendidos na fita molde por meio da DNA polimerase, que adiciona os nucleotídeos complementares. Estas três etapas (desnaturação, anelamento e extensão) representam um único ciclo de uma PCR (ERLICH et al., 1991).

A princípio, uma limitação dessa técnica foi a termolabilidade das enzimas DNA polimerases, pois essas perdiam sua atividade enzimática com as altas temperaturas requeridas no processo de desnaturação. Esse problema foi solucionado com o isolamento de uma enzima termoestável, purificada da bactéria *Thermus aquaticus*, promovendo grande impacto na metodologia, agregando maior eficiência e sensibilidade (AZEVEDO et al., 2003).

Atualmente, uma das poucas restrições da PCR tradicional está na sua característica qualitativa, limitando-a para estudos quantitativos.

A utilização da PCR para a análise de marcadores representa importante redução no tempo despendido para a identificação dos genótipos, além de permitir a identificação desses a partir de quantidades mínimas de material e até de amostras antigas (REGITANO & COUTINHO, 2001).

2.2.3 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE DNA

As duas técnicas mais importantes para o sequenciamento de DNA são o método químico de degradação de bases (MAXAM & GILBERT, 1977) e o método enzimático, didesoxi ou terminação da cadeia (SANGER et al., 1977). Apesar dos dois métodos serem semelhantes quanto à abordagem, o método de Sanger provou ser mais fácil tecnicamente e seu uso mais difundido.

O método de Sanger consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs), que impedem o crescimento de um fragmento de DNA em replicação pela DNA polimerase após sua adição (SOUZA & BRUSAMARELLO, 2009).

Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem o grupamento hidroxila na extremidade 3', não é possível haver extensão a partir do nucleotídeo adicionado, interrompendo a reação (SOUZA & BRUSAMARELLO, 2009). Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com a ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado.

Na reação de sequenciamento, a síntese de DNA é realizada com uma mistura de dNTPs (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados) e um ddNTP para estender um iniciador marcado. Um ddNTP diferente é usado em cada reação. Os produtos são analisados por autorradiografia para determinar a sequência de nucleotídeos (COX et al., 2012).

Os avanços tecnológicos possibilitaram que a técnica de Sanger fosse automatizada com a implementação de novas metodologias de alto desempenho para prospecção, caracterização e genotipagem de SNPs (CAETANO, 2009). O sequenciamento é capaz de produzir um amplo conjunto de dados em um único experimento altamente automatizado, sendo utilizado como alternativa muito eficiente e viável para prospecção de SNPs em genomas.

Os sequenciadores automáticos se baseiam na técnica desenvolvida por Sanger e realizam a análise das fitas de DNA previamente amplificadas, cujos didesoxirribonucleotídeos incorporados na PCR foram marcados previamente com compostos fluorescentes, sendo uma cor diferente para cada dNTP.

O produto da PCR é submetido a uma eletroforese capilar e durante a sua migração passa por um feixe de *laser*, excitando as fluorescências, que emitem luz em um comprimento de onda específico com o corante utilizado em cada dNTP (VOET et al., 2002). A luz é detectada e gera as sequências de DNA em formato de eletroferogramas ou de texto em extensão fasta, sendo analisados com o auxílio de programas de bioinformática.

A redução dos custos do sequenciamento e a maior disponibilidade dessa tecnologia resultou em um crescimento significativo do número de espécies a terem seu genoma sequenciado. Existem atualmente 3.327 projetos de sequenciamento cadastrados no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>).

Como o sequenciamento apresenta altos níveis de redundância, onde um mesmo segmento é lido diversas vezes, os erros de genotipagem são mínimos. Aumentando a quantidade de dados fidedignos em um menor tempo, favorecendo o desenvolvimento de novos marcadores, que funcionarão como ferramentas na condução de estudos de associação e, consequentemente, na indicação de novos genes candidatos (CAETANO, 2009).

2.2.4 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A reação de amplificação em tempo real (qPCR) é uma variante da reação de PCR convencional e foi desenvolvida por Higuchi e colaboradores em 1992. Tem como principal diferença da PCR convencional o fato do monitoramento da quantificação na amostra inicial de DNA, sendo essa, a explicação da letra “q” da sigla (*quantification*) (VALASSEK & REPA, 2005).

Essa técnica representa um grande avanço nos métodos moleculares e tornou-se um dos métodos mais amplamente utilizados na expressão gênica, devido a alta sensibilidade, especificidade e de ser passível de aumentar o rendimento da amostra (WONG & MEDRANO, 2005). Além da expressão gênica, os usos típicos dessa reação incluem detecção de patógenos, análise

de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), análise de alterações cromossômicas e detecção de proteínas (KUBISTA et al., 2006).

Para que a qPCR seja realizada, é necessário um equipamento que possui um termociclador, um sistema ótico e uma câmera CCD (*Charged Coupled Device*) (HIGUCHI et al., 1992; NOVAIS & ALVES, 2004). Dessa forma, a quantidade de produto formado é monitorada durante a reação de amplificação por monitoramento da fluorescência.

Os sinais de fluorescência são gerados por fluoróforos que são específicos para a fita dupla de DNA (dsDNA) ou por oligonucleotídeos marcados por fluorescência em regiões específicas (KLEIN et al., 2002).

Assumindo certa eficiência de amplificação, que é normalmente cerca de uma duplicação do número de moléculas por ciclo de amplificação, é possível calcular o número de moléculas de DNA da sequência amplificada que estavam inicialmente presentes na amostra (KUBISTA et al., 2006).

Essa amplificação apresenta três fases distintas (Figura 1): linha basal, onde não há produto da qPCR suficiente para detectar a fluorescência; fase log: onde a quantidade de produtos da reação dobra a cada ciclo; e, a fase platô: quando não há mais aumento no número de produtos. Neste sistema, o ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é conhecido como *Cycle Threshold (CT)* (NOVAIS & ALVES, 2004). Este valor representa o número de cópias a partir do modelo original e é utilizado para calcular os resultados experimentais (HEID et al., 1996).

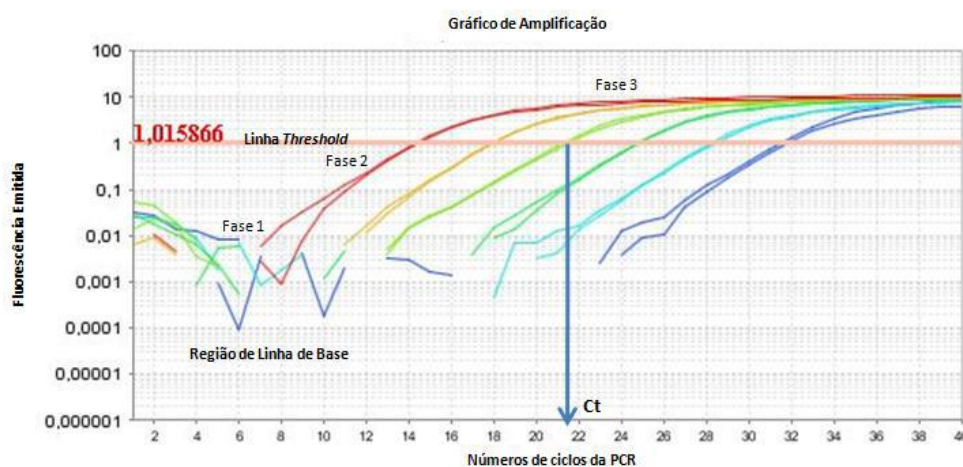


Figura 1. Curva de amplificação do qPCR em Tempo Real. CT – *Cycle Threshold*. Fase 1: linha basal. Fase 2: fase log. Fase 3: fase platô (SOUZA, 2012).

Na PCR em tempo real é necessário um *reporter* fluorescente que se liga ao produto formado e dessa forma relata a sua presença por fluorescência. Assim, diversos corantes podem ser utilizados. Em seu trabalho inicial Higuchi et al. (1992) utilizaram como corante o brometo de etídio, que se torna fluorescente quando intercalado na molécula de DNA.

Atualmente, o fluoróforo mais utilizado é o SYBR® Green, mas existem alternativas, como *Molecular Beacons* e sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), também muito utilizadas, capazes de sofrer hibridização e, dessa forma, gerar transferência de energia para quantificação (NOVAIS & ALVES, 2004). A escolha de uma detecção química é altamente dependente das características de cada experimento.

O sistema TaqMan é uma sonda de hidrólise, comumente conhecida como sonda 5' nuclease. Na Figura 2, observa-se o funcionamento dessa reação, onde uma sonda específica da sequência é marcada com um corante *repórter* na extremidade 5' e um corante *quencher* na extremidade 3'. Quando hibridados com a sequência alvo, a sonda *quencher* se degrada pela ação da DNA polimerase 5' durante o passo de extensão da PCR. A degradação dessa sonda permite a separação do *repórter* do corante *quencher*, resultando num aumento da emissão de fluorescência (GIBSON et al., 1996).

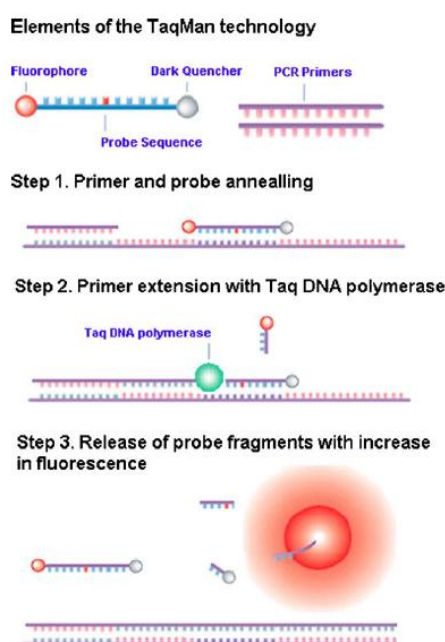


Figura 2. Elementos da tecnologia TaqMan. Adaptado de Gibson (2006).

Diversos estudos em bovinos de corte estão utilizando a tecnologia de qPCR com sistema Taqman para genotipagem de marcadores moleculares associados com características de interesse comercial (NKRUMAH et al., 2004; BARENDSE et al., 2009; ALLAIS et al., 2010; VENERONI et al., 2010).

Esse sistema é bastante interessante por ser altamente específico, garantindo maior segurança e acurácia nas genotipagens, além disso, de modo geral, essa tecnologia beneficiou grandemente as áreas médica/diagnóstica, agropecuária e científica, pois é uma técnica mais eficiente, precisa e reprodutível quando comparada com a PCR convencional.

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Esses marcadores possibilitam a produção de uma grande quantidade de informações sobre identidade genética, diversidade, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, frequências gênicas, seleção assistida, entre outras (FALEIRO et al., 2011).

Duas estratégias podem ser utilizadas para o estudo de marcadores moleculares. Uma é a forma aleatória, na qual objetiva-se o desenvolvimento de um mapa genético para a espécie em questão e a outra é a forma dirigida, baseada na detecção de polimorfismos associados a genes sabidamente importantes para as características de interesse (REGITANO & COUTINHO, 2001).

A grande vantagem da utilização dos marcadores moleculares no melhoramento genético é que a seleção para características que antes eram difíceis de serem mensuradas, ou difíceis de conseguir progresso genético, devido à baixa herdabilidade, podem ser assistidas pelo uso dessa ferramenta (REGITANO & COUTINHO, 2001).

2.3.1. SNP

Os marcadores do tipo SNP são variações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (A, C, T, G), sendo as substituições mais frequentes as

que envolvem nucleotídeos de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre purinas (A/G ou G/A) ou pirimidinas (C/T ou T/C) e são denominadas transições. Quando as substituições são de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa recebem a denominação de transversões (GUIMARÃES & COSTA, 2002). Além disso, esses polimorfismos são a base de vários tipos de marcadores moleculares que foram desenvolvidos com diferentes metodologias ao longo do tempo, como RFLPs, RAPDs e AFLPs (CAETANO, 2009).

Os polimorfismos de nucleotídeo único são originados por meio de dois processos: a incorporação incorreta de uma base durante a replicação de DNA e a modificação química *in situ* de uma base (PHILLIPS, 2007). Esses marcadores são interessantes para a análise genética por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma, possuírem alta estabilidade, além da possibilidade de automação da análise (REGITANO & COUTINHO, 2001).

A detecção de SNPs distribuídos aleatoriamente pelo genoma ocorre por meio do alinhamento de várias sequências de um fragmento aleatório do genoma com uma sequência consenso, como pode ser observado na Figura 3.

```

seq_1 (A)  ATGCGGCGATTGCCATGGGTA
seq_2 (A)  ATGCGGCGATTGCCATGGGAA
seq_3 (A)  ATGCGGCGATTGCCATGGGTA
seq_1 (B)  ATGCGGCAATTGCCATGGGTA
seq_2 (B)  ATGCGGCAATTGCCATGGGT
seq_3 (B)  ATGCGGCAATTGCCATGGGTA
Contig     ATGCGGCGATTGCCATGGGTA
                ↑
            SNP
                ↑↑
            sequencing errors or paralogs
  
```

Figura 3. Prospecção de SNPs em sequências aleatórias (KOZIK et al., 2003).

Os SNPs podem ocorrer tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras, chamadas de exons e íntrons, respectivamente. Quando essas alterações ocorrem em exons promovendo uma substituição de aminoácido na sequência de proteína, são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca. Nesses casos, podem ocorrer mudanças na estrutura e função da proteína (GUIMARÃES & COSTA, 2002).

Embora SNPs sinônimos não alterem a sequência proteica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro, e, dessa forma, afetar a quantidade de proteína produzida (GUIMARÃES & COSTA, 2002).

Grande parte dos SNPs é neutra, ou seja, não ocasiona alterações, entretanto, uma pequena fração responde como a principal fonte de variedade fenotípica resultante de variação genética entre os indivíduos de uma espécie (JORDAN et al., 2002).

Existem diversos métodos para genotipagem de SNPs, tais como PCR-RFLP, PCR alelo-específico, sequenciamento, PCR em tempo real e espectrometria de massa. Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desvantagens e a escolha para a sua utilização dependerá do objetivo do estudo, reprodutibilidade, disponibilidade de recursos financeiros e plataformas tecnológicas.

Atualmente, é possível a caracterização, genotipagem e prospecção de marcadores moleculares aliadas a um baixo custo, alta acurácia e eficiência, favorecendo o uso direto desses marcadores em cadeias produtivas da pecuária mundial. Com alto poder de varredura, outros grandes avanços foram alcançados, tais como a construção do Mapa de Haplótipos bovino, ou *HapMap*, que foi resultado da análise da frequência de mais de 37.000 SNPs em 417 animais originados de aproximadamente 19 raças biologicamente e geograficamente diferentes (BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009).

Avanços importantes com relação a utilização de marcadores SNPs, tanto em velocidade como em custos viáveis, aconteceram devido ao desenvolvimento da tecnologia em *chip* para genotipagem, com dezenas de milhares de marcadores sendo avaliados simultaneamente (RINCON et al., 2011; MATUKUMALLI et al., 2009). Desde então, painéis de alta densidade foram desenvolvidos para humanos, equinos, caninos, ovinos, suínos, bovinos, entre outros (CAETANO et al., 2009).

Em um único experimento automatizado pode-se genotipar para bovinos, aproximadamente, 50 mil SNPs ou 770 mil SNPs (DONATONI, 2012). Essas novas tecnologias de genotipagem de marcadores SNP facilitaram também o desenvolvimento de serviços terceirizados de geração de dados,

permitindo que qualquer grupo de pesquisa realize estudos avançados, sem a necessidade de investimentos em equipamentos (CAETANO, 2009).

2.4 Genes *FABP3* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) e *FABP4* (*Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*)

Genes que controlam, mesmo de forma parcial, as características mais desejáveis em animais de produção, estão sendo visados como a chave para aprimorar o melhoramento genético em bovinos. Porém, a magnitude relativa aos efeitos e a importância de cada um destes genes no controle de variações fenotípicas ainda não são consistentes.

Os genes *FABP3* e *FABP4* pertencem a uma família de nove pequenas proteínas citoplasmáticas altamente conservadas que se ligam a longas cadeias de ácidos graxos e outros ligantes hidrofóbicos. Todos os genes dessa família consistem em quatro exons e três íntrons e alguns estão localizados na mesma região cromossômica (CHMURZYNSKA, 2006).

Esses genes estão presentes em tecidos com uma demanda elevada de ácidos graxos, tais como o músculo do coração, músculos esqueléticos, glândula mamária lactante, fígado ou tecido adiposo (ROY et al., 2003).

As sequências de nucleotídeos que codificam os genes bovinos *FABP3* e *FABP4* estão depositadas no banco de dados do NCBI sob o número de identificação 281758 e 281759, respectivamente.

O gene *FABP3*, comumente conhecido por *H-FABP* (*Heart FABP*) possui ainda outras nomenclaturas usuais, como: *muscle and heart FABP* e *mammary-derived growth inhibitor (MDGI)*. Normalmente, é expresso nos músculos esqueléticos e cardíaco, cérebro, rins, glândula adrenal (HEUCKEROTH et al., 1987; HERTZEL et al., 2000) e glândula mamária (KURTZ et al., 1994).

Esse gene foi mapeado no cromossomo dois de bovinos, possui 60.606 pares de bases (pb), está envolvido no transporte de ácidos graxos da membrana celular para sítios intracelulares e, em suínos, está localizado em uma região de QTL associada com características de deposição de gordura (VEERKAMP & MAATMAN, 1995; ROY et al., 2003; CALVO et al., 2004).

O gene *FABP4*, também chamado de *Adipocyte FABP (A-FABP)*, foi identificado como um gene que afeta a obesidade em ratos (HOTAMISLIGIL et al., 1996) e gordura intramuscular em suínos (GERBENS et al., 1999). Em 2003, foi proposto por Ogino e colaboradores como potencial gene candidato para a obesidade em ratos por estar localizado dentro de uma região de QTL homóloga a região 8q21 do cromossomo humano que contém vários genes candidatos para obesidade.

Além disso, o gene *FABP4* é listado no *Cattle QTL Database* (2009) como gene candidato posicional e funcional para síntese de gordura em gado bovino. Está localizado no cromossomo 14 de bovinos (EVERTS-VAN DER WIND et al., 2004), possui 4.389 pb, se expressa no tecido adiposo e está associado com metabolismo de lipídios, marmoreio e deposição de gordura subcutânea (SPECHT et al., 1996; MICHAL et al., 2006).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Relatórios detalhados sobre as exportações de carne brasileira. São Paulo, 2012.

ALLAIS, S.; LEVÉZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; HOCQUETTE, J. F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; JOURNAUX, L.; BONNOT, A.; RENAND, G. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. **Journal of Animal Science**, v. 88, p.446-454, 2010.

ALVES, D. D.; MANCIO, A. B. MACIEZ DA CARNE BOVINA - UMA REVISÃO. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 14, n.1, p. 193-216. 2007.

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília. Editora Universidade de Brasília, 2003. 212p.

BARENDSE, W. **Assessing lipid metabolism**. Patent International Publication number: WO 99/23248. World International Property Organization, 1999.

BARENDSE, W.; BUNCH, R. J.; THOMAS, M. B.; HARRISON, B. E.; A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in *longissimus* muscle in Australian cattle. **Animal Genetics**, v. 40, p. 770-773, 2009.

BASARAB, C.; LI, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; KNEELAND, J.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. 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.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

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

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

CALVO, J. H.; MARCOS, S.; JURADO, J. J.; SERRANO, M. **Association of the heart fatty acid-binding protein (FABP3) gene with milk traits in Manchega breed sheep**. *Animal Genetics*, v. 35, p. 347-349, 2004.

CARRIJO, S. M. **Associação de polimorfismo do gene PIT1 com características de produção de carne em bovinos da raça Canchim**. 2004.111f. Tese (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - São Paulo, 2004.

Cattle QTL Database (2009). Disponível em: URL <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>>. Acesso em: 10 out. 2013.

CHMURZYNSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 1, p. 39-48, 2006.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: princípios e técnicas**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 914p.

DEKKERS, J. C. M. Breeding in the 21th century: application of molecular technology. Proc. Assoc. Advmt. **Animal Breeding and Genetics**, v. 13, p. 1-16, 1999.

DELGADO, E. F. Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. In: 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. São Pedro, 2001. **Anais...** São Pedro, 2001, CTC/ITAL, 2001, p.143-159.

DONATONI, F. A. B. **Prospecção de SNPs por eletroforese capilar e sua identificação em genes candidatos relacionados à resistência de caprinos a nematóides gastrintestinais**. 2012. 93f. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. **Science**, v. 252, p. 1643-1651, 1991.

EUCLIDES FILHO, K. **Melhoramento genético animal no Brasil: fundamentos, história e importância**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1999. 63p. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 75).

EVERTS-VAN DER WIND, A.; KATA, S. R.; BAND, M. R.; REBEIZ, M.; LARKIN, D. M.; EVERTS, R. E.; GREEN, C. A.; LIU, L.; NATARAJAN, S.; GOLDAMMER, T.; LEE, J. H.; MCKAY, S.; WOMACK, J. E; LEWIN, H. A. A 1463 gene cattle and human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. **Genome Reserch**, v. 14, p. 1424-1437, 2004.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JÚNIOR, F. B. (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, 1 ed, 730p.

FERNANDEZ, X.; MONIN, G.; TALMANT, A.; MOUROT, J.; LEBRET, B. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat-1. Composition

of the lipid fraction and sensory characteristics of *m. longissimus lumborum*. **Meat Science**, v. 53, p. 59-65, 1999.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Parceria público x privada no desenvolvimento de pesquisa em melhoramento genético animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 216-222, 2010 (supl. especial).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 3 ed, 220p.

GERBENS, F.; VAN ERP A. J. M.; HARDERS, F.L.; VERBURG, F. J. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, p.846-852, 1999.

GESUALDI JÚNIOR, A.; QUEIROZ, A. C.; RESENDE, F. D.; ALLEONI, G. F.; RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. P.; GESUALDI, A. C. L. S.; DETMANN, E. Características de carcaça de bovinos Nelore e Caracu para peso aos 378 dias de idade recebendo alimentação restrita ou à vontade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 131-138, 2006.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GIBSON, N. J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, p. 32-47, 2006.

GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 24-27, 2002.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HERTZEL, A. V., BERNLOHR, D. A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, p. 175-180, 2000.

HEUCKEROTH, R. O.; BIRKENMEIER, E. H.; LEVIN, M. S.; GORDON, J. I. Analysis of the tissue-specific expression, developmental regulation, and linkage relationships of a rodent gene encoding heart fatty acid binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9709-9717, 1987.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 413-417, 1992.

HOTAMISLIGIL, G. S.; JOHNSON, R. S.; DISTEL, R. J.; ELLIS, R.; PAPAIOANNOU, V. E.; SPIEGELMAN, B. M. Uncoupling of obesity from insulin

resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. **Science**, v. 274, p. 1377-1379, 1996.

JORDAN, B.; CHAREST, A.; DOWD, J. F.; BLUMENSTIEL, J. P.; YEH, R. F.; OSMAN, A.; HOUSMAN, D. E.; LANDERS, J. E. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2942-2947, 2002.

KLEIN, C. A.; SEIDL, S.; PETAT-DUTTER, K.; OFFNER, S.; GEIGL, J. B.; SCHMIDTKITTLER, O.; ENDLER, N.; PASSLICK, B.; HUBER, R. M.; SCHLIMOK, G.; BAEUERLE, P. A.; RIETHMULLER, G. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 387-392, 2002.

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 45, Knoxville. **Proceedings...** Knoxville: American Meat Science Association, p. 63-71, 1992.

KOZIK, A.; CHAN, B.; MICHELMORE, R. **Validation, Visualization, and Web Presentation of EST Collection. Case Study: Compositae Genome Project at UCD**. In: Plant and Animal Genome XI Conference (Presentation). University of California at Davis, San Diego, California, 2003. Disponível em: http://cgpdb.ucdavis.edu/presentation/PAG-11/slide_07.html. Acesso em 13 Nov. 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.

KURTZ, A.; ZIMMER, A.; SCHNUTGEN, F.; BRUNING, G.; SPENER, F.; MULLER, T. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. **Development**, v. 120, p. 2637-2649, 1994.

LOCKER, R. H. & HAGYARD, C. J. A cold shortening effect in beef muscles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.14, p. 787-793, 1963.

LUCHIARI FILHO, A. **Produção de carne bovina no Brasil, qualidade, quantidade ou ambas?** In: SIMBOI. Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, 2, 2006, Brasília, DF. Brasília, DF: SIMBOI, 2006.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: Luchiari Filho, 2000. 135p.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C. T.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; ALLAN, M. F.; HEATON, M. P.; O'CONNELL, F.; MOORE, S. S.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Development and

Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. **PlosOne**, v. 4, e5350, p. 1-13, 2009.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences - Biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.

MEUWISSEN, T. H. E.; GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, p. 1819-1829, 2001.

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.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, n. 8, p. 579-82, 1990.

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

NKRUMAH, J. D.; LI, C.; BASARAB, J. B.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Canadian journal of Animal Science**, v. 84, p. 211-219, 2004.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 33 ed., p.10-13, 2004.

OGINO, T.; MORALEIO, D. H.; KOSE, H.; YAMADA, T.; MATSUMOTO, K. Serum leptin concentration is linked to chromosome 2 and 6 in the OLETF rat, an animal model of type 2 diabetes with mild obesity. **Mammalian Genome**, v. 14, p. 839-844, 2003.

OLIVEIRA, A. C. B.; CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M.; SAKIYAMA, N. S. **Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas**. Antonio Carlos Baião de Oliveira; et al. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. 17p. (Documentos IAC, 81), 2007.

PAZ, C. C. P. de; LUCHIARI FILHO, A. Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. **Pecuária de Corte**, n.101, p.58-63, 2000.

PETHICK, D. W.; HARPER, G. S.; ODDY, V. H. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 705-715, 2004.

PETHICK, D. W.; HARPER, G.; ODDY, H. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle. In: MARBLING SYMPOSIUM, 2001. **Proceedings...** Disponível em: <http://www.livestocklibrary.com.au/bits/tream/handle/1234/20174/MARB01PethickManipulation_of_marbling.pdf?sequence=1>. Acesso em: 27 Out. 2013.

PHILLIPS, C. Online resources for SNP analysis: a review and route map. **Molecular Biotechnology**, v. 35, p. 65-97, 2007.

PINTO, L. F. B.; FERRAZ, J. B. S.; MEIRELLES, F. V.; ELER, J. P.; REZENDE, F. M., CARVALHO, M. E.; ALMEIDA, H. B.; SILVA, R. C. G. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1431-1442, 2010.

POLIZEL NETO, A.; BRANCO, R. H.; BONILHA, S. F. M.; GOMES, H. F. B.; CORVINO, T. L. S. **Papel dos Ácidos Graxos Voláteis na Deposição de Tecido Adiposo Intramuscular** – Revisão. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/AcidosGraxos/index.htm>. Acesso em: 3 Set. 2013.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3 ed. Lavras, 2004, 472p.

REGITANO, L. C. A., COUTINHO, L. L. **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Ed. REGITANO, L. C. A., COUTINHO, L. L. Brasília: EMBRAPA. 2001, 215p.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007, 560p.

RINCON, G.; MEDRANO, J. F. Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine *CAPN1* gene. **Animal Genetics**, v. 37, p. 294-295, 2006.

RINCON, G.; WEBER, K. L.; VAN EENENNAAM, A. L.; GOLDEN, B. L.; MEDRANO, J. F. *Hot topic*: Performance of bovine high-density genotyping platforms in Holsteins and Jerseys. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6116-6121, 2011.

ROY, R.; CALVO, J. H.; HAYES, H.; RODELLAR, C.; EGGEN, A. Fine mapping of the bovine Heart fatty acid-binding protein gene (*FABP3*) to BTA2q45 by fluorescence *in situ* hybridization and radiation hybrid mapping. **Animal Genetics**, v. 34, p. 466-467, 2003.

RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 405-409, 1998.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; BROWN, N. L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J. C.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phiX174 DNA. **Nature**, v. 265, p. 687- 695, 1977.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews: Genetics**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetical Research**, v. 84, n. 1, p.3-9, 2004.

SOUZA, A. L. F.; BRUSAMARELLO, L. C. C. **Sequenciamento de DNA: decifrando o manual de instruções dos seres vivos**. SBG: Genética na escola, v. 03, p. 45-52, 2009.

SOUZA, G. M. **Estudo da expressão gênica do músculo *longissimus dorsi* de vacas e seus efeitos na maciez da carne**. Dourados, Universidade Federal da Grande Dourados, 2012, 55 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal da Grande Dourados, 2012.

SPECHT, B.; BARTETZKO, N.; HOHOFF, C.; KUHLE, H.; FRANKE, R.; BORCHERS, T.; SPENER, F. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 19943-19949, 1996.

THALLER, G.; KÜHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G.; BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZÜHLKE, FRIES, R. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v. 34, p. 354-357, 2003.

TIZIOTO, P. C. **Genes candidatos para características de produção de carne em famílias de referência da raça Nelore**. São Carlos: Universidade federal de São Carlos, 2010. 107p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução)- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151-159, 2005.

VEERKAMP, J. H.; MAATMAN, R. G. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structures and genes. **Progress in Lipid Research**, v. 34, p. 17-52, 1995.

VENERONI, G. B.; MEIRELLES, S. L.; GROSSI, D. A.; GASPARIN, G.; IBELLI, A. M. G.; TIZIOTO, P. C.; OLIVEIRA, H. N.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A. Prospecting candidate SNPs for backfat in Canchim beef cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 1997-2003, 2010.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 931p.

WHITE, S. N.; CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE JR., C. C.; JOHNSON, D. D.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2001-2008, 2005.

WILLIAMS, J. L. 2008. **Meat Biotechnology**. Chapter 2: Genetic Control of Meat Quality Traits. Ed. Fidel Toldrá. Hardcover. ISBN 978-0-387-79382-5. 497f.

WOLCOTT, M. L.; JOHNSTON, D. J.; BARWICK, S. A.; IKER, C. L.; THOMPSON, J. M.; BURROW, H. M. Genetics of meat quality and carcass traits and the impact of tenderstretching in two tropical beef genotypes. **Animal Production Science**, v. 49, p. 383–98. 2009.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques** (Review). v. 39, n.1, 2005.

**CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES *FABP3* E *FABP4* EM BOVINOS DE CORTE**

(*GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH*)

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *FABP3* E *FABP4* EM BOVINOS DE CORTE

I.M.Z. Blecha¹, F. Siqueira², A.B.R. Ferreira², G.L.D. Feijó², R.A.A. Torres Junior², S.R. Medeiros³, I.I.Sousa³, G.G. Santiago e A.L.J. Ferraz¹

¹ Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil

² Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

³ Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, MS, Brasil

⁴ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Corresponding author: F. Siqueira

E-mail: fabiane.siqueira@embrapa.br

RESUMO

Visando a prospecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), foram desenhados oligonucleotídeos que flaqueavam as regiões exônicas dos genes *FABP3* e *FABP4* para sequenciamento automático de *pools* de DNA de animais fenotipados com extremo superior e inferior para espessura de gordura subcutânea e marmoreio, além de um *pool* de DNA de touros utilizados nos cruzamentos para obter os 201 animais utilizados nesse trabalho. Foram revelados cinco SNPs no gene *FABP3* e nove no gene *FABP4*. Desse total, apenas um SNP, não possui registro no banco de dados dbSNP. Três polimorfismos foram selecionados, genotipados por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou PCR em Tempo Real e submetidos a estudo de associação com características de produção. Os três marcadores estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* a 5% de significância para os sete grupos genéticos analisados. Foram observadas associações significativas entre o marcador *FABP3*-G/A com área de olho de lombo ($P = 0,035$) e a relação da área de olho de lombo com peso de carcaça quente ($P = 0,025$) e entre o marcador *FABP4*/*TasI* com escores de marmoreio ($P = 0,052$) e textura da carne ($P = 0,053$). Não foram observadas associações significativas para o polimorfismo *FABP4*-G/C e as características avaliadas. A variação de resultados encontrados em estudos de associação com variáveis alélicas nesses genes é relatada na literatura e ocorre, provavelmente, devido ao efeito pequeno desses genes na contribuição dessas características, sendo indicado a replicação do estudo em outras populações.

Palavras-chave: *A-FABP*, área de olho de lombo, espessura de gordura subcutânea, *H-FABP*, marcador molecular, marmoreio

INTRODUÇÃO

A pecuária de corte brasileira vem sofrendo intensas transformações devido à demanda cada vez maior por produtos de melhor qualidade. Características como a deposição de gordura subcutânea e intramuscular em bovinos de corte afetam diretamente a escolha do consumidor por conferirem maior suculência, sabor e sensação de maciez (Luchiari Filho, 2000).

O melhoramento genético animal clássico possibilita a mudança na composição genética das populações por meio da seleção e do sistema de acasalamento com a finalidade de aumentar a frequência de alelos favoráveis e proporcionar incrementos de produção com a melhoria das características de interesse comercial (Euclides Filho, 1999; Ferraz & Eler, 2010).

Entretanto, a melhoria de algumas características, é de difícil progresso em programas de melhoramento clássico principalmente quando apresentam baixa herdabilidade, ou mensuração difícil, onerosa ou tardia (Davis & Denise, 1998; Van Eenennaam, 2007). Nestas situações, a seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection* - MAS) complementa os métodos tradicionais, permitindo a seleção de animais em idade precoce e com maior acurácia.

A identificação de genes candidatos responsáveis por variações fenotípicas tem sido um grande desafio, devido ao fato dessas variáveis serem de caráter quantitativo, ou seja, são controladas por vários genes e sofrem influência do meio ambiente (Andersson, 2001).

Alguns genes candidatos já foram identificados e relacionados com características de qualidade de carcaça e deposição de gordura como o *TG* (Barendse, 1999), *LEP* (Buchanan et al., 2002), *DGAT1* (Thaller et al., 2003) e os genes da família *FABP*, que são pequenas proteínas citoplasmáticas altamente conservadas que se ligam a longas cadeias de ácidos graxos e outros ligantes hidrofóbicos (Roy et al., 2003; Chmurzynska, 2006; Michal et al., 2006).

O gene *FABP3* está envolvido no transporte de ácidos graxos da membrana celular para sítios intracelulares e, em suínos, está localizado em uma região de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associada com características de deposição de gordura (Veerkamp & Maatman, 1995; Roy et al., 2003). Enquanto que para o gene *FABP4* já foi identificada associação com metabolismo de lipídios (lipólise e lipogênese) marmoreio e deposição de gordura subcutânea (Specht et al., 1996; Hertz et al., 2006; Michal et al., 2006). Neste contexto, objetivou-se identificar SNPs nos genes *FABP3* e *FABP4* por meio de sequenciamento automático de DNA, estimar suas frequências alélicas e genotípicas e avaliar a associação dos genótipos com características de qualidade de carne e carcaça em bovinos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS, nas coordenadas geográficas 20° 27' S e 54° 37' W, a 530 metros de altitude. O clima dessa região é classificado como tropical chuvoso de savana, caracterizado pela distribuição anual irregular das chuvas, com ocorrência bem definida de um período seco, durante os meses mais frios, e um período chuvoso, durante os meses de verão.

Para obtenção de novilhos superprecoces avaliados neste trabalho foram utilizadas 50 matrizes 1/2 Valdostana + 1/2 Nelore (VN), 50 matrizes 1/2 Angus + 1/2 Nelore (AN) e 80 matrizes 1/2 Caracu + 1/2 Nelore (CN).

Os acasalamentos entre as raças maternas e terminais foram realizadas com as matrizes VN e AN inseminadas com touros Caracu (CR), gerando filhos 75% taurino e 75% adaptado (CRVN e CRAN) e com touros Canchim (CC) gerando filhos 56,25% taurino e 43,75% adaptado (CCVN e CCAN). E com matrizes CN inseminadas com touros Caracu para gerar produtos 75% taurino e 100% adaptado (CRCN); com touros Canchim para gerar filhos 56,25% taurino e 68,75% adaptado (CCCN); e, com Angus para gerar filhos 75% taurino e 50% adaptado (RACN), obtendo um total de 201 bezerros divididos em sete grupos genéticos.

Os bezerros (machos e fêmeas) foram desmamados aos 240 dias e submetidos ao sistema de confinamento em baias individuais, com dieta à base de silagem de sorgo, milho e farelo de soja com e sem adição de caroço de algodão e casca de soja.

Os animais foram acompanhados durante o período experimental a cada 28 dias, por meio de pesagem e medidas de ultrassonografia (área do músculo *Longissimus dorsi* (AOLus) e espessura de gordura subcutânea (EGSus) mensuradas na região dorso-lombar, entre a 12^a e 13^a costelas) e os abates foram definidos quando os animais atingiram o mínimo de cinco milímetros de EGSus gerando a variável dias de confinamento (DCONF).

Por ocasião do abate foram tomadas as medidas de peso de abate em jejum (PAB), peso de carcaça quente (PCQ) e rendimento de carcaça quente (RCQ), dado pela relação entre PCQ e PAB.

Após vinte e quatro horas do abate, foram analisados no músculo *Longissimus dorsi*, entre a 12^a e 13^a costelas da meia-carcaça direita, medidas da espessura de gordura subcutânea mensurada na carcaça (EGC), área de olho de lombo (AOL), grau de marmoreio (MARM), maturidade fisiológica (MATFIS) e textura por avaliação subjetiva visual (TEXT), conforme a metodologia proposta por Muller (1980). Nesta ocasião, foram extraídas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para análise da maciez, a partir da força de cisalhamento (FC) medida em aparelho de Warner-Bratzler conforme descrito por Menezes et al. (2009).

Para as avaliações genotípicas foram coletadas amostras de sangue dos 201 animais por venopunção em tubos a vácuo de 4,5 mL contendo K3 EDTA e sêmen dos touros utilizados nos cruzamentos. O DNA genômico foi extraído utilizando o método descrito por Regitano e Coutinho (2001). Os DNAs foram quantificados por espectrofotometria em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific ND 1000) e a integridade foi verificada em gel de agarose a 0,8%.

Para a obtenção de sequências e prospecção de SNPs nos genes *FABP3* e *FABP4* foram montados quatro *pools* de DNA com 14 animais cada, representantes dos fenótipos superiores e inferiores para as características de marmoreio e espessura de gordura subcutânea, seguindo uma equivalência para sexo e genealogia.

A fim de se verificar a origem (paterna ou materna) dos SNPs, foi gerado um *pool* com DNA de 18 touros utilizados nos cruzamentos. Todos os *pools* foram padronizados com 200 ng de DNA de cada animal e realizados em duplicatas, assegurando dessa forma, que não haveria variação na composição e concentração dos mesmos.

Para a amplificação das regiões alvo de interesse, foram desenhados oligonucleotídeos específicos a partir das sequências dos genes *FABP3* e *FABP4* que estão disponíveis na base pública de dados Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sob número de acesso 281758 e 281759, respectivamente.

Esses iniciadores foram desenhados com o auxílio do *software Primer 3 plus*, disponível *on line* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e sua qualidade foi verificada pelo *software OligoAnalyzer* versão 3.1, também disponível *online* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Os pares de

oligonucleotídeos utilizados para amplificar os exons de cada gene estão dispostos na Tabela 1.

Para todos os pares de iniciadores foi otimizado um único protocolo, sendo que cada reação foi realizada em volume final de 25 µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 80 ng de DNA genômico, 0,164 µM de cada iniciador, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 0,65 unidade (UI) de Taq DNA polimerase (Invitrogen™).

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram submetidas ao seguinte programa: dois minutos para desnaturação inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C, finalizando com cinco minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos amplificados pela PCR foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I (*Exo I* - USB Products) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP - USB Products), submetidos à reação de sequenciamento usando o *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) e sequenciados no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Para garantir maior confiabilidade nos resultados, cada *pool* foi sequenciado em duplicata. Após o sequenciamento, a detecção de SNPs foi realizada utilizando o *software CodonCode Aligner* (versão demo). As sequências diretas e reversas das duplicatas foram alinhadas e formou-se uma sequência consenso por pool. Posteriormente as sequências de todos os pools foram comparadas. Por fim, as sequências consenso formadas para cada gene pelo alinhamento de todos os *pools* foram comparadas contra as sequências de referência do genoma de *Bos taurus taurus* retiradas do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para a genotipagem e associação dos genótipos com características de interesse, os 201 animais foram avaliados individualmente para três SNPs identificados dentro da população estudada. Sendo dois polimorfismos no gene *FABP4*, denominados nesse estudo como *FABP4/TasI* (rs109346428) e *FABP4-G/C* (rs110383592) e um no gene *FABP3* (sem registro no dbSNP), denominado *FABP3-G/A*. Os critérios de seleção de SNPs foram: confirmação na duplicata, associação com qualidade de carne em outros estudos, localização e ineditismo do SNP.

O SNP *FABP4/TasI*, encontra-se em um sítio de restrição da endonuclease *TasI* (Tsp509I) que reconhece o sítio 5'...↓AATT...3', sendo assim o polimorfismo foi genotipado por PCR-RFLP utilizando os oligonucleotídeos direto 5'-ATTATCCCCACAGAGCATCG-3' e reverso 5'-TACTGCTGGGGGCACAGTAT-3' que geram um fragmento de 297 pares de base (pb).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL e otimizada para 120 ng de DNA, 0,164 µM de cada iniciador, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 unidade (UI) de Taq DNA polimerase e submetidas ao seguinte programa: cinco minutos para desnaturação inicial a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C e 30 segundos a 72°C finalizando com sete minutos a 72°C para extensão final.

Em seguida, os *amplicons* foram digeridos em meio de reação contendo sete µL de produto de PCR e uma unidade (UI) da enzima de restrição *TasI* e incubada a 65°C por 3 horas. Os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 3%, visualizados e fotografados por meio de coloração com *SyberGold* (1:50.000) e exposição à luz ultravioleta. Para confirmar os resultados obtidos por PCR-RFLP, dois indivíduos de cada genótipo foram sequenciados em sequenciador automático.

Para o polimorfismo *FABP4/TasI*, analisado por meio de PCR-RFLP, o genótipo GG é caracterizado pela presença de três fragmentos de restrição, com 136, 114 e 47 pb e o

genótipo AA apresenta quatro fragmentos de 136, 83, 47 e 31 pb. Os animais heterozigotos (GA) apresentaram os cinco fragmentos totais. Os fragmentos de 136 pb e 47 pb que aparecem em todos os genótipos, são considerados fragmentos controles, garantindo que a etapa de clivagem com a endonuclease de restrição *TasI* foi eficiente, não ocorrendo erro de genotipagem.

Os outros dois SNPs, *FABP3*-G/A e *FABP4*-G/C, foram genotipados por PCR em Tempo Real, utilizando o sistema TaqMan. Os oligonucleotídeos e repórteres foram utilizados na concentração de 36 μ M e 8 μ M, respectivamente, e suas sequências estão dispostas na Tabela 2.

As genotipagens foram realizadas em termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems, EUA) seguindo o programa padrão “*genotyping*”. A mistura de reagentes para genotipagem por PCR em Tempo Real foi padronizada para um volume final de 5 μ L e constituída por 30 ng de DNA, 2,5 μ L de *Taq Man Master Mix* e 0,125 μ L de *Assay*. Para melhor agrupamento dos diferentes genótipos foram inseridos em cada placa controles positivos (amostras confirmadas de cada um dos três genótipos possíveis). E para confirmação da pureza dos reagentes utilizados foram inseridos controles negativos (água livre de DNase e estéril no lugar de DNA).

A partir da identificação dos genótipos, foram calculadas, de acordo com Weir (1996), as frequências genotípicas e alélicas. Para verificação de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Os desvios das frequências observadas em relação às esperadas foram analisados a 5% de significância.

Nos estudos de associação, os dados obtidos para as características relacionadas com qualidade de carne e carcaça foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa estatístico SAS (SAS, 2004), sob um modelo com os efeitos dos genótipos para cada polimorfismo, ano de nascimento (safra), lote (formado de acordo com a época de nascimento), sexo, grupo genético do indivíduo, grupo genético do touro, grupo genético da vaca e dieta.

Quando observados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) do genótipo com o marcador, foi estimado o efeito de substituição alélica, calculado por meio da substituição do efeito de genótipo do marcador no modelo estatístico por covariáveis representando a quantidade do alelo menos frequente (0, 1 e 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IDENTIFICAÇÃO DE SNPS

Para o gene *FABP3*, o sequenciamento revelou cinco SNPs, sendo que quatro destes já haviam sido depositados no banco de dados dbSNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), e um está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho. No gene *FABP4* foram encontrados nove SNPs e todos já estão descritos e depositados no dbSNP. Cabe ressaltar, que três SNPs do gene *FABP4* estão localizados em região não codificante 3'UTR (Tabela 3). Os *primers* desenhados flanqueavam todos os exons e acabaram cobrindo também outras regiões dos genes, como os íntrons e regiões não traduzidas, revelando, dessa forma, SNPs em diversas localizações.

Observa-se ainda que grande parte dos SNPs relevados no sequenciamento está em regiões intrônicas. Apesar de não serem codificantes, diversos marcadores em íntrons já foram identificados e associados com características de qualidade de carne e carcaça em bovinos de corte (White et al., 2005; Schenkel et al., 2006; Sherman et al., 2008).

Variações no gene *FABP3* têm despertado interesse pelo fato deste gene ser caracterizado como um dos responsáveis pela mobilização (disponibilidade) e utilização

de ácidos graxos intracelular, principalmente, para a oxidação na mitocôndria (Gardan et al., 2007; Glatz et al., 2003; Glatz & Van Der Vusse, 1996). Em suínos, este gene tem sido considerado como gene candidato para características de deposição de gordura, porém, os efeitos encontrados são contraditórios (Nechtelberger et al., 2001; Chmurzynska, 2006). Em bovinos poucos estudos foram publicados até o momento e os resultados são igualmente inconsistentes (Cho et al., 2008).

Cho et al. (2008) em estudos de identificação e associação de SNPs no gene *FABP3* com características de deposição de gordura, encontraram 5 SNPs, sendo que somente um (rs210186725) também foi revelado no presente estudo. Entretanto, este não apresentou associação significativa em seus estudos. Cabe ressaltar, que os resultados obtidos revelaram um SNP ainda não descrito na literatura e, conseqüentemente, não foi verificada a sua associação com fenótipos de interesse econômico.

Já no gene *FABP4*, dos nove polimorfismos identificados, o SNP rs110383592 se destaca por ter sido encontrado e estudado por vários autores em animais de raças diferentes (Oh et al., 2012; Barendse et al., 2009 e Cho et al., 2008). Barendse et al., (2009) estudando este SNP em bovinos australianos encontraram associação do mesmo com deposição de gordura intramuscular (marmoreio). Segundo os autores, este polimorfismo está localizado em um sítio de *splicing* entre o terceiro exon e o terceiro íntron tornando-o, assim, um polimorfismo funcional. Por outro lado, esta associação não é consistente entre os estudos, Oh et al. (2012), não encontraram efeitos significativos de associação desse polimorfismo com características de deposição de gordura, entretanto ele se mostrou associado com a composição de ácidos graxos saturados e insaturados em bovinos da raça Hanwoo.

GENOTIPAGEM E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Com a genotipagem dos 201 animais foi possível observar que as duas variantes alélicas de cada um dos três polimorfismos analisados foram representadas nos sete grupos genéticos estudados. Por meio do teste de Qui-quadrado, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as frequências alélicas observadas entre os grupos genéticos estudados somente para os polimorfismos *FABP3*-G/A e *FABP4*-G/C (Tabela 4).

Para o SNP *FABP3*-G/A, o alelo G foi o mais frequente em todos os grupos genéticos estudados, sendo que as maiores frequências desse alelo foram observadas nos grupos RACN, CRAN, CRCN e CRVN com média de 81,58%, enquanto que os outros grupos apresentaram média de 66,33%.

Para o SNP *FABP4*-G/C, o alelo mais frequente foi o “C” sendo os grupos que apresentaram maiores frequências foram CCCN, RACN e CCAN com média de 86,80%, enquanto que outros os grupos apresentaram média de 70,65%.

Para todos os polimorfismos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos genéticos para as frequências genotípicas pelo teste de Qui-quadrado, como pode ser observado na Tabela 5. Todos os SNPs analisados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Do total de animais analisados para o polimorfismo *FABP3*-G/A, 111 apresentaram o genótipo GG, 81 o genótipo GA e nove o genótipo AA, sendo que esse último genótipo foi observado apenas nos grupos que apresentam Canchim como raça terminal do cruzamento CCAN (n=4), CCCN (n=4) e CCVN (n=1). Analisando a distribuição do alelo A nos grupos genéticos, aparentemente este alelo seria exclusivo de raças zebuínas, uma vez que dentre os touros utilizados somente o Canchim que apresenta

uma proporção de genética zebuína (5/8 Charolês e 3/8 zebu) foi o que, provavelmente, transmitiu este alelo para as proles.

Considerando que esse SNP foi descrito neste trabalho pela primeira vez, não existem dados publicados na literatura com os quais os resultados possam ser comparados, sendo necessário novos estudos para a confirmação da hipótese acima apresentada.

Para o polimorfismo *FABP4*-G/C, 123 animais apresentaram o genótipo CC, 69 o genótipo GC e somente nove o genótipo GG, onde apenas os grupos genéticos CCCN e CRCN não apresentaram animais com o genótipo GG (Tabela 5).

Oh et al. (2012) genotiparam esse mesmo SNP em bovinos coreanos da raça Hanwoo e encontraram frequências de 36,3%, 47,7% e 16% para os genótipos GG, GC e CC respectivamente, sendo que “C” foi o alelo menos frequente (44%).

Estudando bovinos australianos de sete raças distintas (Angus, Brahman, Belmont Red, Hereford, Murray Grey, Santa Gertrudis e Shorthorn), Barendse et al. (2009) observaram frequências do alelo C variando de 45% (Angus) à 85% (Brahman).

Contrastando os resultados encontrados por Oh et al. (2012) e Barendse et al. (2009), a menor frequência do alelo “G” encontrada no presente trabalho pode indicar que este alelo está sendo introduzido ou saindo das populações estudadas.

Para o polimorfismo *FABP4*/*TasI*, todos os grupos genéticos apresentaram os três genótipos, sendo 45 animais apresentaram o genótipo GG, 116 o genótipo GA e 40 o genótipo AA. Não foi possível determinar se essa distribuição genotípica ocorre também em outras populações pois não foram encontradas informações sobre este SNP na literatura.

Os resultados de estudo de associação mostraram efeito significativo entre os genótipos dos polimorfismos *FABP3*-G/A com AOL ($P = 0,035$) (Tabela 6) e com a relação AOLPCQ ($P = 0,025$) (Tabela 7). Nos dois casos o genótipo AA foi o que apresentou maior valor fenotípico, porém, diferiu estatisticamente apenas do genótipo heterozigoto GA.

Diversos estudos de associação entre SNPs no gene *FABP3* e características de interesse econômico foram conduzidos, porém a maioria é relatada em suínos (Gerbens et al., 1999; Chmurzynska et al., 2007). Entretanto, estes resultados diferem dos apresentados no presente trabalho uma vez que todas as associações encontradas foram com deposição de gordura na carcaça ou intramuscular.

Por estar presente em um gene que apresenta relação com deposição de gordura, e por ser a primeira vez que esse polimorfismo é relatado, são necessários mais estudos sobre a associação encontrada para validação do mesmo em diferentes grupos amostrais.

Os resultados de estudo de associação mostraram também efeito significativo entre os genótipos do polimorfismo *FABP4*/*TasI* e as características de textura da carne ($P = 0,053$) e marmoreio ($P = 0,052$) (Tabela 6).

Os maiores escores de textura da carne foram encontrados nos animais que possuíam o genótipo AA, apesar destes possuírem médias equivalentes estatisticamente com os de genótipo GG. Por outro lado, os animais que apresentaram maiores valores de escores para marmoreio foram os indivíduos heterozigotos (GA). Não é possível verificar se esses resultados são condizentes, pois não foram encontrados na literatura resultados de associação para este SNP.

Para o SNP *FABP4*-G/C não foram observados efeitos significativos entre os genótipos e as características estudadas, concordando com os resultados obtidos por Oh et al. (2012), que estudando bovinos da raça Hanwoo, não encontraram efeitos significativos de associação desse polimorfismo com características de deposição de gordura, sendo observado apenas uma associação com a composição de ácidos graxos. Entretanto

Barendse et al. (2009), encontraram associação do mesmo SNP com deposição de gordura intramuscular (marmoreio) em diversas raças de bovinos australianos. Quando foram observados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) do genótipo do marcador, foi estimado o efeito de substituição alélica, calculado por meio da substituição do efeito de genótipo do marcador no modelo estatístico por covariáveis representando a quantidade do alelo menos frequente (0, 1 e 2), como pode ser observado na Tabela 8.

Essa análise se torna importante devido ao fato da transmissão ao descendente ser de alelos (e não dos genótipos) por parte dos genitores, sendo assim, é possível indicar um valor associado a cada variante alélica que o indivíduo possui (Falconer & Mackay, 1996).

Foi possível verificar no SNP *FABP3*-G/A que o alelo G diminui a área de olho de lombo e para o SNP *FABP4/TasI*, o alelo A diminui as pontuações de marmoreio e aumenta a textura, entretanto, esses efeitos foram pequenos e, portanto, não foram observadas associações significativas nessa análise.

Os pequenos efeitos encontrados neste estudo são comuns devido essas variáveis serem de caráter quantitativo, sendo geralmente, controladas por vários genes (de pequeno efeito individual) e influenciadas por fatores ambientais (Andersson, 2001).

De acordo com Barendse et al. (2009), o efeito do gene *FABP4* é pequeno e isso inviabiliza ou diminui o seu poder de detecção. Cho et al. (2008) argumentaram também que o poder estatístico para detectar associação significativa nos estudos tanto para *FABP4* quanto para *FABP3*, poderia ser baixo, uma alternativa para confirmar associações sugestivas ou de genes de pequeno efeito é a replicação dos estudos em população maiores, de diferentes raças e com uma maior variação fenotípica.

Atualmente, já estão disponíveis plataformas para a detecção de milhares de SNPs simultaneamente, com redução dos custos e otimização de tempo. Dessa forma, é possível a inclusão não apenas da informação de um ou poucos SNPs na predição do valor genético de cada animal, mas sim de milhares de SNPs que apresentam associação com diversas características que se tenha interesse em melhorar, promovendo avanços significativos na produção animal.

Neste sentido, os genes aqui estudados *FABP3* e *FABP4* parecem contribuir na formação das características de carcaça em geral, porém com um efeito pequeno.

Apesar de não poderem ser considerados genes principais para a formação do fenótipo (*Major gene*), poderiam ser utilizados em painéis de marcadores que somados os efeitos podem explicar melhor a variação fenotípica apresentada entre raças e animais ou em estudo de haplótipos, tornando-se uma análise mais poderosa por aumentar a acurácia na predição genética.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a EMBRAPA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) pelo fornecimento de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

Andersson, L (2001). Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature*. 2: 130-138.

- Barendse W, Bunch RJ, Thomas MB and Harrison BE. (2009) A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in *longissimus* muscle in Australian cattle. *Animal Genetics*. 40: 770-773.
- Barendse, W. (1999). *Assessing lipid metabolism*. Patent International Publication number: WO 99/23248. World International Property Organization.
- Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, et al. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic Selection Evolution*. 34: 105-116.
- Chmurzynska A, Szydlowski M, Stachowiak M, Stankiewicz M, et al. (2007). Association of a new SNP in promoter region of the porcine FABP3 gene with fatness traits in a Polish synthetic line. *Animal Biotechnology*. 18: 37-44.
- Chmurzynska A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*. 47: 39-48.
- Cho S, Park TS, Yoon DH, Cheong HS, et al. (2008). Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and *FABP4* and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. *BMB Rep*. 41: 29-34.
- Davis GP and Denise SK (1998). The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*. 76: 2331-2339.
- Euclides Filho K (1999). Melhoramento genético animal no Brasil: fundamentos, história e importância. Série Documentos Embrapa Gado de Corte, n.75, 63p.
- Falconer DS and Mackay TFC (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th Ed. Edinburg: Longman, 464p.
- Ferraz JBS and Eler JP (2010). Parceria público x privada no desenvolvimento de pesquisa em melhoramento genético animal. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39: 216-222.
- Gardan D, Louveau I, Gondret D. (2007). Adipocyte- and heart-type fatty acid binding proteins are both expressed in subcutaneous and intramuscular porcine (*Sus scrofa*) adipocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148:14-19.
- Gerbens F, Van Erp AJM, Harders FL, Verburg FJ, et al. (1999). Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *Journal of Animal Science*, v.77, p.846-852.
- Glatz JF, Schaap FG, Binas B, Bonen A, Van Der Vusse GJ, et al. (2003) Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*. 178: 367-371.
- Glatz JF and Van Der Vusse GJ (1996). Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Progress in Lipid Research*. 35: 243-282.

- Hertzell AV, Smith LA, Berg AH, Cline GW, et al. (2006). Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 290: 814-823.
- Luchiari Filho, A. *Pecuária da carne bovina*. São Paulo: Luchiari Filho, 2000. 135p.
- Menezes LFG, Segabinazzi LR, Brondani IL, Restle J, et al. (2009). Silagem de milho e grão de sorgo como suplementos para vacas de descarte terminadas em pastagem cultivada de estação fria. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61: 182-189.
- Michal JJ, Zhang ZW, Gaskins CT and Jiang Z (2006). The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Anim. Genet.* 37: 400-402.
- Muller L (1980). *Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1, 31p.
- Nechtelberger D, Pires V, Solkner J, Stur I, et al. (2001). Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *Journal of Animal Science*. 79: 2798-2804.
- Oh D, Lee Y, La B and Yeo J (2012). Identification of the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) for Fatty Acid Composition Associated with Beef Flavor-related *FABP4* (Fatty Acid Binding Protein 4) in Korean Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25: 913-920.
- Regitano LCA and Coutinho LL (2001). *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p.205.
- Roy R, Calvo JH, Hayes H, Rodellar C, et al. (2003). Fine mapping of the bovine Herat fatty acid-binding protein gene (*FABP3*) to BTA2q45 by fluorescence *in situ* hybridization and radiation hybrid mapping. *Animal Genetics*. 34: 466-467.
- Sas Institute. *SAS/STAT: user's guide*. Version 9.1. Cary: SAS Institute, 2004.
- Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, et al. (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle *Journal of Animal Science*. 84: 291-299.
- Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, et al. (2008). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle, *Journal of Animal Science*. 86: 1-16.
- Specht B, Bartetzko N, Hohoff C, Kuhl H, et al. (1996). Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart-type and adipocyte-type fatty acid binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 19943-19949.

- Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, et al. (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*. 34: 354-357.
- Van Eenennaam, A. Marker assisted selection in beef cattle. Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf>. Acesso em: 06 de janeiro 2014
- Veerkamp JH and Maatman RG (1995). Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structures and genes. *Progress in Lipid Research*. 34: 17-52.
- Weir BS. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 445p, 1996.
- White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, et al. (2005). A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science*. 83: 2001-2008.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos direto (F) e reverso (R) utilizadas no sequenciamento e tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicon*)

GENE	FRAGMENTO FLANQUEADO	DIRETO (5'-3')	REVERSO (5'-3')	AMPLICON
<i>FABP3</i>	1	GTGACACAGGGGCCTTTTA	GGGAACCAAGATCCCACAT	425 pb
<i>FABP3</i>	2	CTCTTCTCCCTCCCAACAT	CCCACACAGGCAACAGGTAGAT	481 pb
<i>FABP3</i>	3	TCTGGCTCTCACACCATCAG	TGCAAGCACTCTCTCCTTCA	519 pb
<i>FABP3</i>	4	CTGTCAAGAACCTGGCACAT	TGCTTCCTGAGTAGCAGTCTTT	528 pb
<i>FABP4</i>	1	AAAAAGAGGCAGAAAGCCAAG	CAGAGGGAAAACCTGCAGAGG	564 pb
<i>FABP4</i>	2	ATGGAATGGCTTTCTCCTT	TTGTGCCTTGGGTGTTCTTT	510 pb
<i>FABP4</i>	3	CAAGGGCGATTGTCTCTATTCTC	CCCCTATGATGCTATTCCACA	443 pb
<i>FABP4</i>	4	TCCCTGAGAGGGTGTGTGTTT	CCTGCTCAACATTGAAGGAGAC	548 pb

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos e repórteres utilizados na qPCR

Gene	Iniciador Direto	Iniciador Reverso	Repórter 1	Repórter 2
<i>FABP3</i>	GGTCATTGAGCCCCT TGTACT	GAGGGAAGGGTATGAG CATGAG	TCGCCTCTCGCTC CAG (VIC)	TCGCCTCTCACT CCAG (FAM)
<i>FABP4</i>	TGGGATGACCTAGCA CTAAAATCTAGAA	ACCATAAAGAGAAAAC TCGTGGATGAT	AGAAGATACTCA CGAGCACC (VIC)	AGAAGATACTCA CCAGCACC (FAM)

VIC e FAM: fluoróforos utilizados para marcar os nucleotídeos do SNPs

Tabela 3. Descrição dos SNPs, localização e códigos no dbSNP

Gene	SNP	LOCALIZAÇÃO	Código no dbSNP
<i>FABP3</i>	C/G	INTRON I	rs210186725
<i>FABP3</i>	G/A	INTRON I	Não depositado
<i>FABP3</i>	A/G	INTRON III	rs109315289
<i>FABP3</i>	A/G	INTRON III	rs209338531
<i>FABP3</i>	C/T	INTRON III	rs210785101
<i>FABP4</i>	G/T	INTRON II	rs134173517
<i>FABP4</i>	A/T	INTRON II	rs109014985
<i>FABP4</i>	C/G	EXON III	rs110383592
<i>FABP4</i>	A/G	INTRON III	rs109388335
<i>FABP4</i>	A/G	INTRON III	rs109346428
<i>FABP4</i>	C/T	EXON IV	rs110370032
<i>FABP4</i>	A/G	3'UTR	rs109077068
<i>FABP4</i>	C/T	3'UTR	rs110266999
<i>FABP4</i>	C/G	3'UTR	rs109593774

Tabela 4. Frequências alélicas dos polimorfismos *FABP3-G/A*, *FABP4-G/C* e *FABP4/TasI* para os sete grupos genéticos e para a amostra total

Polimorfismo	Alelo	Grupos genéticos							Total (n=201)
		CCAN (n=26)	CCCN (n=32)	CCVN (n=25)	CRAN (n=29)	CRCN (n=28)	CRVN (n=26)	RACN (n=35)	
<i>FABP3-G/A</i> *	G	65,4	65,6	68,0	82,8	80,4	78,8	84,3	75,4
	A	34,6	34,4	32,0	17,2	19,6	21,2	15,7	24,6
<i>FABP4- G/C</i> *	C	80,8	95,3	68,0	72,4	76,8	65,4	84,3	80,0
	G	19,2	4,7	32,0	25,6	23,2	34,6	15,7	20,0
<i>FABP4/TasI</i>	G	46,2	43,8	60,0	51,7	57,1	61,5	42,9	51,2
	A	53,9	56,3	40,0	48,3	42,9	38,5	57,1	48,8

* Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos genéticos para as frequências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado. CCAN: Canchim - Red Angus/Nelore; CCCN: Canchim - Caracu/Nelore; CCVN: Canchim - Valdostana/Nelore; CRAN: Caracu - Red Angus/Nelore; CRCN: Caracu - Caracu/Nelore; CRVN; Caracu - Valdostana/Nelore; RACN: Red Angus - Caracu/Nelore.

Tabela 5. Frequências genotípicas e nível de significância do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos *FABP3-G/A*, *FABP4-G/C* e *FABP4/TasI* geral e por grupo genético e na amostra total

Polimorfismo	Genótipo	Grupos genéticos							Total (n=201)
		CCAN (n=26)	CCCN (n=32)	CCVN (n=25)	CRAN (n=29)	CRCN (n=28)	CRVN (n=26)	RACN (n=35)	
<i>FABP3-G/A</i>	GG	46,1	43,8	40,0	65,5	60,7	57,7	68,6	55,2
	GA	38,5	43,7	56,0	34,5	39,3	42,3	31,4	40,3
	AA	15,4	12,5	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5
	HW	0,745	0,985	0,358	0,533	0,433	0,392	0,544	
<i>FABP4-G/C</i>	GG	7,7	0,0	4,0	6,9	0,0	11,5	2,9	4,5
	GC	23,1	9,4	56,0	41,4	46,4	46,2	25,7	34,3
	CC	69,2	90,6	40,0	51,7	53,6	42,3	71,4	61,2
	HW	0,423	0,962	0,358	0,982	0,278	0,995	0,985	
<i>FABP4/TasI</i>	GG	23,1	12,5	28,0	24,1	21,4	34,6	17,1	22,4
	GA	46,2	62,5	64,0	55,2	71,4	53,9	51,4	57,7
	AA	30,8	25,0	8,0	20,7	7,1	11,5	31,4	19,9
	HW	0,936	0,312	0,249	0,853	0,053	0,782	0,957	

CCAN: Canchim - Red Angus/Nelore; CCCN: Canchim - Caracu/Nelore; CCVN: Canchim - Valdostana/Nelore; CRAN: Caracu - Red Angus/Nelore; CRCN: Caracu - Caracu/Nelore; CRVN; Caracu - Valdostana/Nelore; RACN: Red Angus - Caracu/Nelore. HW: Nível de significância do Equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5%.

Tabela 6. Valor de significância (P), médias e erro padrão das características fenotípicas analisadas para os genótipos dos marcadores *FABP3-G/A*, *FABP4-G/C* e *FABP4/TasI*

Marcador	Variável									
	DCONF (dias)	PAB (kg)	PCQ (kg)	RCQ (%)	MATFIS (escore)	TEXT (escore)	EGC (mm)	AOL (cm ²)	MARM (escore)	FC (kg)
<i>FABP3-G/A</i>	P = 0,368	P = 0,384	P = 0,301	P = 0,450	P = 0,967	P = 0,370	P = 0,098	*P = 0,035	P = 0,545	P = 0,792
GG	136,50±2,92	403,58±4,92	221,62±2,96	54,71±0,23	14,04±0,09	4,52±0,06	5,56±0,27	62,15±1,13ab	6,80±0,37	5,61±0,27
GA	1,16±0,02	409,70±5,23	224,53±3,12	54,61±0,25	14,06±0,09	4,55±0,06	5,10±0,29	60,29±1,19 ^a	6,35±0,40	5,81±0,28
AA	1,08±0,06	417,31±13,64	233,04±8,15	55,41±0,64	14,03±0,23	4,33±0,16	4,21±0,74	67,62±3,05b	6,69±1,01	5,60±0,74
<i>FABP4-G/C</i>	P = 0,609	P = 0,866	P = 0,804	P = 0,295	P = 0,646	P = 0,573	P = 0,985	P = 0,881	P = 0,610	P = 0,589
GG	139,93±7,64	401,15±12,91	218,26±7,72	53,88±0,61	14,13±0,23	4,41±0,16	5,21±0,75	59,99±3,11	5,78±1,01	6,41±0,74
GC	134,28±3,28	405,66±5,55	223,43±3,32	54,84±0,26	14,09±0,10	4,56±0,06	5,33±0,31	61,55±1,29	6,53±0,42	5,68±0,30
CC	137,17±2,94	407,59±4,97	223,37±2,99	54,65±0,23	14,01±0,09	4,52±0,06	5,34±0,28	61,58±1,15	6,75±0,37	5,63±0,27
<i>FABP4/TasI</i>	P = 0,919	P = 0,176	P = 0,507	P = 0,481	P = 0,169	*P = 0,053	P = 0,939	P = 0,876	*P = 0,052	P = 0,943
GG	136,93±3,81	401,19±6,38	220,46±3,84	54,53±0,30	14,20±0,11	4,55±0,07ab	5,24±0,35	61,64±1,46	6,27±0,47ab	5,62±0,35
GA	136,49±3,01	404,67±5,03	222,88±3,04	54,83±0,24	13,99±0,09	4,45±0,06b	5,36±0,28	61,67±1,19	7,11±0,38a	5,70±0,28
AA	135,02±3,95	415,75±6,61	226,32±4,03	54,51±0,32	13,99±0,11	4,64±0,07a	5,37±0,37	60,88±1,51	6,02±0,49b	5,77±0,36

DCONF= Dias em confinamento para atingir acabamento; PAB = peso do animal em jejum pré-abate; PCQ = peso da carcaça quente; RCQ = rendimento de carcaça quente; MATFIS = maturidade fisiológica (escala de 1 a 15 pontos dividida em classes de A à E e em subclasses = menos, média e mais, sendo 1 = animal mais velho e 15 = animal mais novo); TEXT = textura da carne (escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 = muito grosseira e 5 = muito fina); EGC = espessura de gordura na região dorso-lombar medida na carcaça; AOL = área de olho de lombo medida na carcaça; MARM = escore de marmoreio (valores de 1 a 18, sendo: 1 a 3 = traços, 4 a 6 = leve, 7 a 9 = pequeno, 10 a 12 = médio, 13 a 15, grande e 16 a 18 = abundante,); FC = força de cisalhamento

* P ≤ 0,05

a, b, - Médias na mesma coluna, seguidas de letras diferentes, diferem entre si.

Tabela 7. Valor de significância (P), médias e erro padrão das relações entre área de olho de lombo e peso de carcaça quente (AOLPCQ), teor de gordura na carcaça (EGCCARC) e espessura de gordura por dias de confinamento (EGCDIA) para os genótipos dos marcadores *FABP3-G/A*, *FABP4-G/C* e *FABP4/TasI*

Marcador	Variável		
	AOLPCQ (cm ² /kg)	EGCCARC	EGCDIA (cm ² /dia)
<i>FABP3-G/A</i>	*P = 0,025	P = 0,061	P = 0,143
GG	0,28±0,004a	2,66±0,14	4,44±0,29
GA	0,27±0,004b	2,38±0,15	4,05±0,31
AA	0,29±0,01a	1,98±0,38	3,04±0,79
<i>FABP4-G/C</i>	P = 0,876	P = 0,971	P = 0,801
GG	0,28±0,01	2,61±0,38	3,80±0,80
GC	0,28±0,004	2,51±0,16	4,33±0,33
CC	0,28±0,004	2,52±0,14	4,23±0,29
<i>FABP4/TasI</i>	P = 0,093	P = 0,930	P = 0,940
GG	0,28±0,005	2,56±0,18	4,14±0,37
GA	0,28±0,004	2,53±0,15	4,28±0,31
AA	0,27±0,005	2,47±0,19	4,27±0,39

AOLPCQ = relação da área de olho de lombo por peso de carcaça quente; EGCCARC = índice de distribuição de gordura na carcaça; EGCDIA = relação de espessura de gordura por dias de confinamento

* P ≤ 0,05

a, b, - Médias na mesma coluna, seguidas de letras diferentes, diferem entre si.

Tabela 8. Efeito médio da substituição alélica e erro padrão para os polimorfismos que apresentaram associação significativa

Marcador	Alelo	Variável	Efeito de substituição alélica	P
<i>FABP3-G/A</i>	G	AOL (cm ²)	-0,11 ± 1,06	0,9180
<i>FABP3-G/A</i>	G	AOLPCQ	-0,004± 0,003	0,2766
<i>FABP4/TasI</i>	A	TEXT	0,04 ± 0,05	0,3946
<i>FABP4/TasI</i>	A	MARM (escore)	-0,11 ± 0,30	0,7252

TEXT = textura da carne (escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 = muito grosseira e 5 = muito fina); AOL = área de olho de lombo medida na carcaça; MARM = escore de marmoreio (valores de 1 a 18, sendo: 1 a 3 = traços, 4 a 6 = leve, 7 a 9 = pequeno, 10 a 12 = médio, 13 a 15, grande e 16 a 18 = abundante); AOLPCQ = relação da área de olho de lombo por peso de carcaça quente.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avanços importantes têm sido alcançados com o desenvolvimento de técnicas biomoleculares automatizadas, como o sequenciamento genômico para prospecção de marcadores moleculares e a genotipagem por *chips* de SNPs. Por meio dessas ferramentas, foi possível aprimorar e otimizar tempo nos processos de descoberta e validação de marcadores moleculares associados como características de interesse econômico para a pecuária.

A genotipagem de SNPs possibilita identificar precocemente animais que apresentam maior potencial de serem pais das próximas gerações, por serem portadores de alelos favoráveis para as características de interesse.

De acordo com alguns dados da literatura, os genes *FABP3* (*Heart Fatty Acid Binding Protein*) e *FABP4* (*Adipocyte Fatty Acid Binding Protein*) estão associados com deposição e de gordura em bovinos, porém a magnitude relativa aos efeitos e a importância destes genes no controle de variações fenotípicas ainda necessitam ser avaliadas.

Neste estudo, verificou-se que o sequenciamento foi uma metodologia viável para a identificação de SNPs nos genes *FABP3* e *FABP4* resultando em 14 SNPs encontrados, sendo que um ainda não está depositado no banco de dados (*dbSNP*). Foram observadas associações significativas ($P \leq 0,05$) do polimorfismo *FABP4/TasI* com marmoreio ($P = 0,052$) e textura da carne ($P = 0,053$) seguindo de acordo com o disposto na literatura, e a identificação de um novo polimorfismo no gene *FABP3* que apresentou associação com área de olho de lombo ($P = 0,035$) e com a relação AOLPCQ ($P = 0,025$). No entanto, são necessárias pesquisas adicionais em outras populações para validação desses polimorfismos.

Os resultados obtidos poderão contribuir para seleção de animais com maior potencial para produção de carne de melhor qualidade desde que sejam analisadas outras populações.

APÊNDICE

METODOLOGIA COMPLETA

O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS, nas coordenadas geográficas 20° 27' S e 54° 37' W, a 530 metros de altitude. O clima dessa região é classificado como tropical chuvoso de savana, caracterizado pela distribuição anual irregular das chuvas, com ocorrência bem definida de um período seco, durante os meses mais frios, e um período chuvoso, durante os meses de verão.

Os animais utilizados para avaliação foram produzidos na Fazenda da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS. Para obtenção dos novilhos superprecoces foram utilizadas 50 matrizes 1/2 Valdostana + 1/2 Nelore (VN), 50 matrizes 1/2 Angus + 1/2 Nelore (AN) e 80 matrizes 1/2 Caracu + 1/2 Nelore (CN) nas estações de monta de 2006-2007 e 2007-2008.

Os acasalamentos entre as raças maternas e terminais foram realizadas das seguintes formas: as matrizes VN e AN foram inseminadas com touros Caracu (CR), gerando filhos 75% taurino e 75% adaptado (CRVN e CRAN) e com touros Canchim (CC) gerando filhos 56,25% taurino e 43,75% adaptado (CCVN e CCAN). Já as matrizes CN foram inseminadas com touros Caracu para gerar produtos 75% taurino e 100% adaptado (CRCN); com touros Canchim para gerar filhos 56,25% taurino e 68,75% adaptado (CCCN); e, com Angus para gerar filhos 75% taurino e 50% adaptado (RACN), como pode ser observado na tabela 1. Ao todo, foram produzidos 201 bezerros divididos em sete grupos genéticos, sendo 105 animais produzidos na primeira safra e 96 animais na segunda safra.

Ao nascimento, foi feita a tatuagem do bezerro com número de identificação individual, bem como anotados a identificação da mãe e o peso do bezerro ao nascer, de forma a se ter controle adequado do grupo genético dos animais.

Após a desmama, realizada aos 240 dias de idade, os bezerros (machos e fêmeas) foram confinados e mantidos em baias sob avaliação individual de consumo até o abate, que foi determinado quando cada animal atingiu, no mínimo, cinco milímetros de espessura de gordura depositada na

região dorso-lombar, entre a 12^a e 13^a costelas. Para isto, fez-se avaliação por ultrassonografia a cada 28 dias durante o período de confinamento.

Tabela 1. Touros e matrizes utilizadas nos cruzamentos e grupos genéticos gerados com suas respectivas porcentagens de taurino e adaptado

TOUROS		MATRIZES		
		Caracu X Nelore (CN)	Angus X Nelore (AN)	Valdostana X Nelore (VN)
	Caracu (CR)	CRCN 75% taurino 100% adaptado	CRAN 75% taurino 75% adaptado	CRVN 75% taurino 75% adaptado
	Canchim (CC)	CCCN 56% taurino 69% adaptado	CCAN 56% taurino 44% adaptado	CCVN 56% taurino 44% adaptado
	Angus (RA)	RACN 75% taurino 50% adaptado	X	X

Durante o período de confinamento dos animais foram fornecidas duas dietas à base de silagem de sorgo, milho e farelo de soja com e sem adição de caroço de algodão e casca de soja (Tabela 2).

Tabela 2. Composição e níveis nutricionais das dietas fornecidas aos animais durante o período de confinamento

Ingredientes	Dieta A		Dieta B	
	% MO	% MS	% MO	% MS
Silagem de Sorgo	65,00	40,00	65,00	40,00
Caroço de algodão	-	-	8,50	15,00
Milho grão	31,22	53,16	11,60	19,56
Farelo de Soja 45%	2,03	3,67	1,80	3,13
Casca de Soja	-	-	11,70	20,00
Calcário	0,53	1,00	0,50	1,00
Uréia	0,88	1,41	0,40	0,51
Sal Mineral recria/engorda	0,35	0,76	0,50	0,80
Níveis Nutricionais				
NDT (%)	-	73,70	-	73,00
Extrato etéreo (%)	-	3,60	-	5,80
PDR (%)	-	10,30	-	9,50
Proteína Bruta (%)	-	14,50	-	14,40

MO = Matéria original; MS = Matéria seca; NDT = Nutrientes digestíveis totais; PDR = Proteína degradável no rúmen.

Durante a primeira safra de confinamento foi fornecida apenas a dieta B, e na segunda safra confinada foram fornecidas as dietas A e B (Tabela 3).

Ambas as dietas foram formuladas para apresentarem os mesmos níveis de proteína bruta, proteína degradável no rúmen e nutrientes digestíveis totais, variando quanto aos teores de amido e extrato etéreo. Os animais da segunda safra foram distribuídos aleatoriamente, dentro de cada grupo genético, entre os dois tipos de dieta (Tabela 3).

Antes do momento do abate todos os animais foram pesados em jejum (PAB). Após o abate, foram realizadas avaliações nas carcaças para obtenção das medidas de peso de carcaça quente (PCQ) e rendimento de carcaça quente (RCQ), dado pela relação entre PCQ e PAB.

Vinte e quatro horas após a entrada da carcaça na câmara frigorífica, foram realizadas, entre a 12^a e 13^a costelas da meia-carcaça direita, medidas de espessura de gordura subcutânea mensurada na carcaça (EGC) com um paquímetro; área de olho de lombo (AOL); grau de marmoreio (MARM) analisado no músculo *Longissimus dorsi*; textura da carne (TEXT); e, maturidade fisiológica (MATFIS), conforme metodologia proposta por Muller (1980).

Tabela 3. Frequências dos animais por grupo genético, sexo e tipo de dieta fornecida nos dois anos de confinamento (Safras 2007 e 2008)

Grupo Genético (GG)	Safra 2007		Safra 2008				Total por GG
	Dieta B		Dieta A		Dieta B		
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
	s	s	s	s	s	s	
CCAN	8	4	5	3	3	3	26
CCCN	12	4	3	5	3	5	32
CCVN	9	5	2	2	5	2	25
CRAN	10	5	1	6	3	4	29
CRCN	9	3	5	4	3	4	28
CRVN	7	7	3	1	5	3	26
RACN	6	16	2	4	2	5	35
Total	61	44	21	25	24	26	201

Amostras do músculo *Longissimus dorsi* foram extraídas para análise da maciez, a partir da força de cisalhamento (FC) medida em aparelho de Warner-Bratzler. Foram embaladas à vácuo no frigorífico, transportada até o laboratório de carcaças da Embrapa Gado de Corte e mantida congelada até o momento da avaliação da FC, sendo que este procedimento foi realizado sem que a carne tenha sido maturada (MULLER, 1980).

Para as avaliações genotípicas foram coletadas amostras de sangue dos 201 animais por venopunção em tubos a vácuo de 4,5 mL contendo K3 EDTA. Os DNAs foram obtidos por extração a partir de leucócitos, utilizando o método descrito por Regitano e Coutinho (2001). Os DNAs genômicos extraídos foram quantificados por espectrofotometria em aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific*) e em gel de agarose 0,8%.

Baseando-se nas análises fenotípicas de avaliação de carcaça e de qualidade de carne, 201 animais (machos e fêmeas) foram ordenados conforme o grau de marmoreio e/ou espessura de gordura que apresentaram e aqueles presentes numa fração equivalente aos extremos da distribuição de grau de marmoreio e de espessura de gordura foram utilizados para identificação de novos SNPs por meio de sequenciamento automático de DNA em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

A fração de animais que teve o seu DNA sequenciado foi equivalente a 14 animais no extremo superior e 14 animais no extremo inferior da distribuição das características de interesse, sendo elas, marmoreio e espessura de gordura subcutânea. Os animais selecionados para cada extremo seguiram uma equivalência para sexo e foram equilibrados conforme sua genealogia, ou seja, excluindo filhos de um mesmo touro, para que nenhum animal fosse mais representativo.

Foram montados *pools* para a varredura dos SNPs por meio de sequenciamento. Esses *pools* formaram cinco grupos e foram realizados em duplicatas assegurando que não haveria variação na composição e concentração das montagens. O primeiro *pool* foi composto por DNA de animais com fenótipo superior para marmoreio; o segundo com fenótipo inferior para marmoreio; o terceiro com DNA de animais com fenótipo superior para espessura de gordura; o quarto *pool* com DNA de animais com fenótipo inferior para espessura de gordura; e, o quinto com DNA de 18 touros utilizados no cruzamento para gerar os animais que serão genotipados. Sendo que todos os *pools* foram padronizados para conter 200 ng de DNA de cada amostra, evitando, dessa forma, que houvesse um valor superestimado de algum animal.

Para a amplificação das regiões alvo de interesse em cada um dos genes, *FABP3* e *FABP4*, foram desenhados oligonucleotídeos específicos a

partir das sequências dos genes que estão disponíveis na base pública de dados Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) com auxílio do *software Primer 3 plus*, disponível *on line* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e sua qualidade foi verificada pelo *software OligoAnalyzer* versão 3.1, também disponível *online* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

O gene *FABP3* possui 60.606 pares de bases (pb) está organizado em 4 exons e 3 íntrons, já o gene *FABP4* tem 4.389 pb e também é composto por 4 exons e 3 íntrons. Foi sequenciado tudo o que é transcrito, ou seja, as regiões UTR (*untranslated region*) e os éxons.

Os pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificar os exons de cada gene estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos *oligonucleotídeos direto* (F) e *reverso* (R) utilizadas no sequenciamento e tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicon*)

GENE	EXON	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')	AMPLICON
<i>FABP3</i>	1	GTGACACAGGGGCCTTTTA	GGGAACCAAGATCCCACAT	425 pb
<i>FABP3</i>	2	CTCTTCTCCCTCCCCAACAT	CCCACACAGGCAACAGGTAGAT	481 pb
<i>FABP3</i>	3	TCTGGCTCTCACACCATCAG	TGCAAGCACTCTCTCCTTCA	519 pb
<i>FABP3</i>	4	CTGTCAAGAACCTGGCACAT	TGCTTCCTGAGTAGCAGTCTTT	528 pb
<i>FABP4</i>	1	AAAAAGAGGCAGAAAGCCAAG	CAGAGGGAAACTGCAGAGG	564 pb
<i>FABP4</i>	2	ATGGAATGGCTTTCCTCCTT	TTGTGCCTTGGGTGTTCTTT	510 pb
<i>FABP4</i>	3	CAAGGGCGATTGTCTCTATTCTC	CCCCTATGATGCTATTCCACA	443 pb
<i>FABP4</i>	4	TCCCTGAGAGGGTGTTGTTT	CCTGCTCAACATTGAAGGAGAC	548 pb

Para todos os pares de oligonucleotídeos foi otimizado um único protocolo, sendo que cada reação foi realizada em volume final de 25 µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 80 ng de DNA genômico, 0,164 µM de cada iniciador, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 0,65 unidade (UI) de Taq DNA polimerase (Invitrogen™).

As condições da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram: dois minutos para desnaturação inicial a 95°C, 30 segundos para desnaturação a 94°C, trinta segundos a 60°C para anelamento dos iniciadores, trinta segundos a 72°C para extensão e cinco minutos a 72°C para extensão final. Os passos dois (desnaturação), três (anelamento) e quatro (extensão) corresponderam a um ciclo, o qual foi repetido por 35 vezes.

As reações para amplificação foram realizadas com as duas replicatas dos pools. A reação com uma das duplicatas foi armazenada em freezer a -20°C e a outra foi destinada para o passo de purificação.

Para o método de purificação dos produtos amplificados utilizou-se as enzimas Exonuclease I (Exo I - USB Products) para digerir oligonucleotídeos residuais e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP - USB Products) para degradar excesso de nucleotídeos não incorporados provenientes da PCR.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (version 3.1, Applied Biosystems, Foster City CA, USA), conforme instruções do fabricante.

Para a precipitação da reação de sequenciamento a centrífuga foi mantida a temperatura de 4°C antes do início dos procedimentos. Em cada amostra (poço) adicionou-se 2,5 µL de EDTA 125 mM pH 8,0. Posteriormente, adicionou-se 30 µL/poço de etanol absoluto. A placa (*PCR – Optical 96 well reaction plate number N - 801 –0560*) foi tampada com manta de silicone, invertida por quatro vezes e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos.

Após a incubação, centrifugou-se por 30 minutos a 3.600 rotações por minuto (rpm), seguindo imediatamente para o próximo passo onde o fundo da posição da placa foi forrado com papel toalha, retirou-se a manta, posicionou-se a placa invertida e foi dado um pulso de 3.600 rpm.

Foi adicionado 30 µL/poço de etanol 70% e a placa centrifugada por 15 minutos a 3.600 rpm. Repetiu-se o passo do pulso na centrífuga a 1.200 rpm com a placa invertida no papel toalha. Posteriormente, o material ficou secando por 15 minutos a 37°C. A placa foi embrulhada em papel alumínio e armazenada em freezer a -20°C até o momento de realizar o sequenciamento.

Para o sequenciamento, as amostras da placa foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e submetidas ao equipamento Sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems). O sequenciamento automático de DNA também foi realizado para as duplicatas para garantir maior confiabilidade nos resultados.

As amostras foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e submetidas ao equipamento Sequenciador ABI 3130

(Applied Biosystems). O sequenciamento automático de DNA também foi realizado para as duplicatas para garantir maior confiabilidade nos resultados.

Após o sequenciamento, a detecção de SNPs foi realizada utilizando o *software CodonCode Aligner* (versão demo). SNPs foram identificados quando as sequências continham picos secundários na mesma posição. Para evitar a identificação de variações causadas por erros de sequenciamento, as sequências de um mesmo gene obtidas pelos diferentes *pools* foram alinhadas entre si para verificar a presença da variação em pelo menos dois *pools*.

Por fim, as sequências consenso formadas para cada gene pelo alinhamento dos *pools* foram alinhadas contra sequências de referência de *Bos taurus taurus* retiradas do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Após identificação dos SNPs, foram escolhidos dois em cada gene para validação. Para o estudo de genotipagem e associação com características de interesse foram genotipados todos os 201 animais individualmente para três SNPs identificados dentro da população estudada. Sendo dois polimorfismos no gene *FABP4*, denominados nesse estudo como *FABP4/TasI* (rs109346428) e *FABP4-G/C* (rs110383592) e um no gene *FABP3*, denominado *FABP3-G/A* (sem registro no dbSNP). A relação dos SNPs encontrados e selecionados para genotipagem está representada na Figura 1.

Para o SNP *FABP4/TasI*, genotipado por PCR-RFLP os oligonucleotídeos direto 5'-ATTATCCCCACAGAGCATCG-3' e reverso 5'-TACTGCTGGGGGCACAGTAT-3' foram utilizados para amplificar um fragmento de 297 pares de bases (pb) (Figura 2).

A mistura para amplificação constituiu-se de: 0,164 μ M de cada iniciador, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 3,0 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 unidade (UI) de *Taq* DNA polimerase e 120 ng de DNA. As condições dessas PCRs foram: cinco minutos para desnaturação inicial a 95°C, trinta segundos para desnaturação a 94°C, trinta segundos a 60°C para anelamento dos oligonucleotídeos, trinta segundos a 72°C para extensão e sete minutos a 72°C para extensão final. Os passos dois (desnaturação), três (anelamento) e quatro (extensão) correspondem a um ciclo, o qual foi repetido 28 vezes.

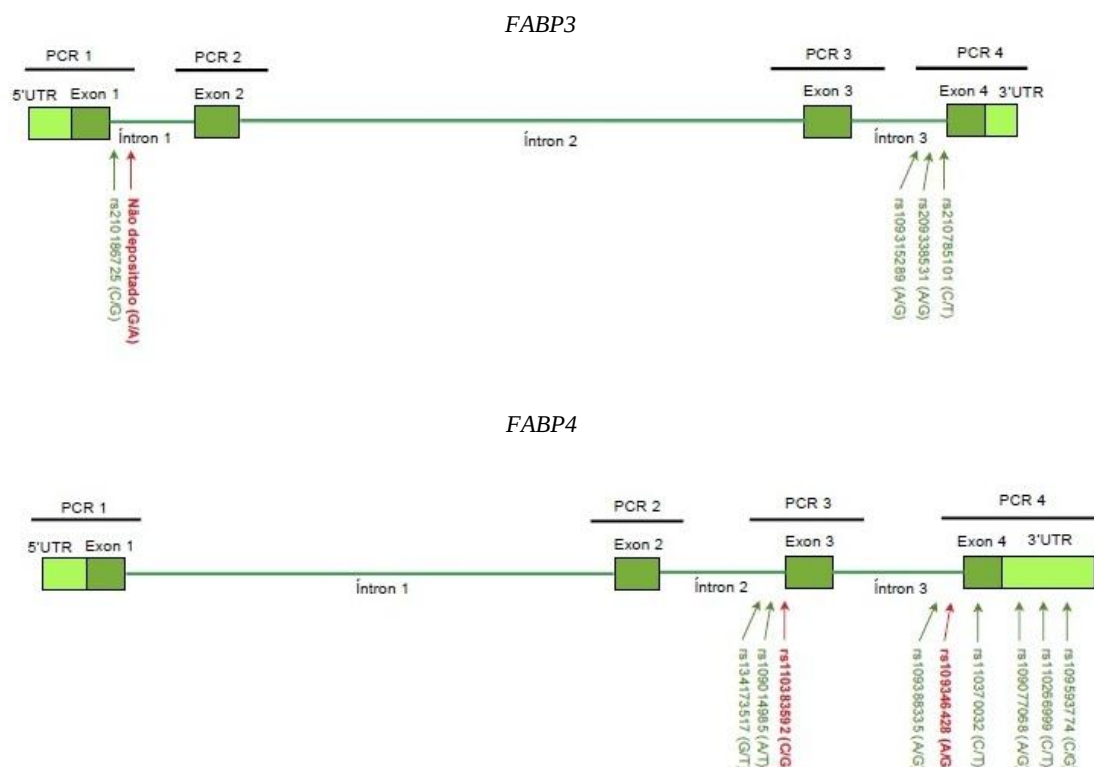


Figura 1. Esquema representativo dos genes bovinos *FABP3* e *FABP4*, com suas respectivas estruturas (exons, íntrons e regiões não traduzidas - UTR), áreas flanqueadas pelos *primers* (PCR) e polimorfismos identificados no sequenciamento (códigos de identificação em verde). Em vermelho: polimorfismos selecionados para genotipagem e estudo de associação com características de interesse comercial.

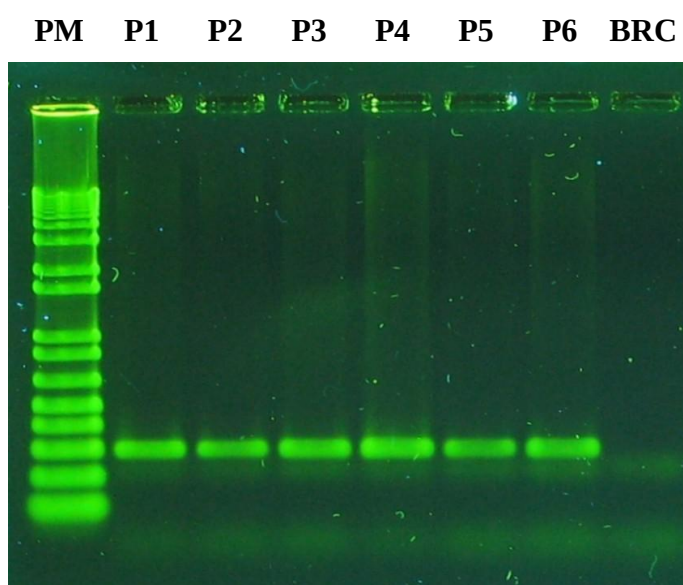


Figura 2. Produto amplificado por PCR do SNP *FABP4/TasI* em gel de agarose 1% corado com *SybrGold*. PM – Peso Molecular de tamanho de 1Kb. Amostras P1, P2, P3, P4, P5 e P6 amplificadas com fragmento de 297 pb. BRC – controle negativo.

Os *amplicons* foram digeridos em meio de reação contendo 7 μ L de produto de PCR e uma unidade da enzima de restrição *TasI*, que reconhece o sítio 5'...↓A A T T ...3', sendo que esta reação foi incubada a 65°C por 3 horas.

Os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 3%, visualizados e fotografados por meio de coloração com *SyberGold* (1:50.000) e exposição à luz ultravioleta.

Após a digestão, o alelo G é caracterizado pela presença de três fragmentos de restrição, com 136, 114 e 47 pb e o alelo A apresenta quatro fragmentos de 136, 83, 47 e 31 pb (Figura 3). Os fragmentos de 136 pb e 47 pb que aparecem em todos os genótipos, são considerados fragmentos controles, garantindo que a etapa de clivagem com endonuclease de restrição funcionou corretamente e não houve erro de genotipagem.

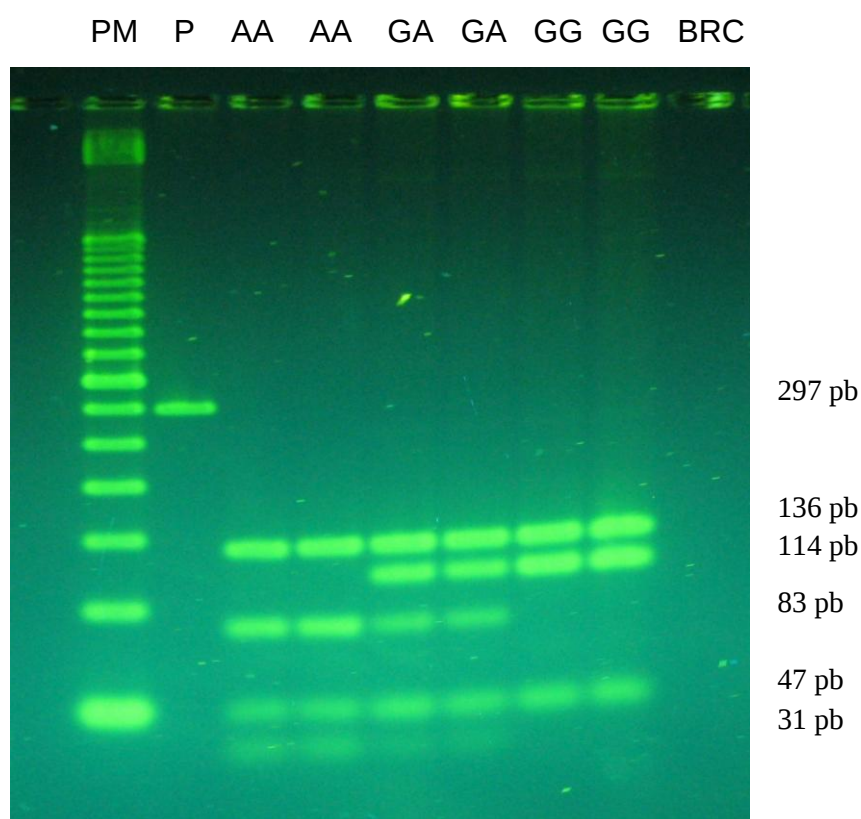


Figura 3. Perfil eletroforético representativo do SNP *FABP4/TasI* após PCR-RFLP. Gel de Agarose 3% corado com *SyberGold* com produto de amplificação (P) e fragmentos do gene *FABP4* após digestão com enzimas de restrição *TasI*. PM – Peso molecular de tamanho de 50 pb. AA – animais homozigotos para alelo A. GA – heterozigotos e GG animais homozigotos para alelo G. BRC – controle negativo.

Os outros dois SNPs (*FABP3-G/A* e *FABP4-G/C*), foram genotipados por PCR Tempo Real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) utilizando o

sistema TaqMan® (Applied Biosystems) já que devido à ausência de um sítio de restrição não foi possível utilizar a metodologia de PCR-RFLP, mesmo essa sendo mais viável. Os oligonucleotídeos e *reporters* foram utilizados na concentração de 36 µM e 8 µM, respectivamente, e suas sequências estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos e *reporters* utilizados na qPCR

Gene	Oligonucleotídeo Direto	Oligonucleotídeo Reverso	Reporter 1	Reporter 2
<i>FABP3</i>	GGTCATTGAGCCCCT TGTACT	GAGGGAAGGGTATGA GCATGAG	TCGCCTCTCGCT CCAG	TCGCCTCTCACT CCAG
<i>FABP4</i>	TGGGATGACCTAGCA CTAAAATCTAGAA	ACCATAAAGAGAAAAC TCGTGGATGAT	AGAAGATACTCA CGAGCACC	AGAAGATACTCA CCAGCACC

O mix para genotipagem por PCR em Tempo Real teve um volume final de 5 uL e foi constituído por 2,5 uL de *Taq Man Master Mix*, 0,125 uL de Assay e 30 ng de DNA.

O programa de termociclagem da qPCR foi: 60°C por 30 segundos (*Pré PCR Read*), 95°C por 10 minutos (*Holding stage*), 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, que correspondem a um ciclo (*Cycling stage*), o qual foi repetido por 40 vezes e 60°C por 30 segundos (*Pós PCR Read*) em termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems, EUA).

Para melhor agrupamento dos diferentes genótipos foi inserido em cada placa controles positivos (amostras confirmadas de cada um dos três genótipos possíveis) e para confirmação da pureza dos reagentes utilizados foi inserido controle negativo (água livre de DNase e estéril no lugar de DNA).

A partir da identificação dos genótipos, foram calculadas, de acordo com Weir (1996), as frequências genotípicas e alélicas, utilizando o teste de Qui-quadrado. Os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram analisados a 5% de significância.

Nos estudos de associação, os dados obtidos para as características relacionadas com qualidade de carne e carcaça foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento *General Linear Model* (GLM) do programa estatístico SAS (SAS, 2004), sob um modelo com os efeitos dos genótipos para cada polimorfismo, ano de nascimento (safra), lote (formado de acordo com a

época de nascimento), sexo, grupo genético, grupo genético do touro, grupo genético da vaca e dieta.

Quando observados efeitos significativos ($P < 0,05$) do genótipo com o marcador, foi estimado o efeito de substituição alélica, calculado por meio da substituição do efeito de genótipo do marcador no modelo estatístico por covariáveis representando a quantidade do alelo menos frequente (0, 1 e 2).