

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS SUPERIORES  
PARA CRESCIMENTO E QUALIDADE DE  
CARÇA EM BOVINOS DE CORTE  
SUBMETIDOS AO MODELO BIOLÓGICO  
SUPERPRECOCE**

**LILIANE SUGUISAWA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia - Área de concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor.

BOTUCATU / SP  
AGOSTO / 2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS SUPERIORES PARA  
CRESCIMENTO E QUALIDADE DE CARCAÇA EM  
BOVINOS DE CORTE SUBMETIDOS AO MODELO  
BIOLÓGICO SUPERPRECOCE**

**LILIANE SUGISAWA**

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Silveira

Co-orientadores: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira

Prof. Dra. Catalina Romero Lopes

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia - Área de concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor.

BOTUCATU / SP

AGOSTO / 2005

Vida é o Amor existencial...  
Razão é o Amor que pondera...  
Estudo é o Amor que analisa...  
Ciência é o Amor que investiga...  
Filosofia é o Amor que pensa...  
Religião é o Amor que busca a Deus...  
Verdade é o Amor que se eterniza...  
Ideal é o Amor que se eleva...  
Fé é o Amor que se transcende...  
Esperança é o Amor que sonha...  
Caridade é o Amor que auxilia...  
Fraternidade é o Amor que se expande...  
Sacrifício é o Amor que se esforça...  
Renúncia é o Amor que se depura...  
Simpatia é o Amor que sorri...  
Trabalho é o Amor que constrói...  
Indiferença é o Amor que se esconde...  
Desespero é o Amor que se desgoverna...  
Paixão é o Amor que desequilibra...  
Ciúme é o Amor que se desvaira...  
Orgulho é o Amor que enlouquece...  
Sensualismo é o Amor que se envenena...

Finalmente, o Ódio, que julgas ser a antítese do Amor, não é senão o próprio Amor que adoeceu gravemente...

*"A vida é construída nos sonhos e concretizada no Amor!"*

Francisco Cândido Xavier

## **DEDICATÓRIA**

A minha família, pelo amor incondicional!

A Dino Potiens Filho (*in memoriam*), pela infinita saudade!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a UNESP – Campus de Botucatu, em especial aos Departamentos de Melhoramento Genético e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e, ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências, pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Agradeço a FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Carlos Silveira pela amizade e orientação

Agradeço a Prof. Dra Catalina Romero Lopes pela confiança depositada.

Agradeço ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira pela essencial colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr Mário de Beni Arrigoni pelo incentivo.

Agradeço ao Dr. Rogério Abdallah Curi pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Agradeço a André Alves de Souza, pelo fiel companheirismo!

Agradeço a Seila e Carmen, pelo carinho e apoio!

Agradeço aos amigos Bin, Sâmia, Sarita, Maurício, Gilberto, Kazuo e tantos outros, pelos bons momentos compartilhados!

Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas da FMVZ e do IB, que de alguma forma contribuíram para o bom andamento desta pesquisa.

E de forma muito especial agradeço a Deus, por sempre me conduzir ao melhor caminho!

## SUMÁRIO

	Pág
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xiii
Summary.....	xiv
CAPÍTULO 1 - Considerações Iniciais.....	1
CAPÍTULO 2 – Revisão de Literatura.....	3
Referências Bibliográficas.....	9
CAPÍTULO 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E DA STAT5A E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE.....	12
Resumo.....	12
Introdução.....	13
Material e métodos.....	16
Animais.....	16
Extração do DNA e genotipagem.....	18
Análise estatística.....	19
Resultados e discussão.....	21
Conclusões.....	27
Agradecimentos.....	27
Referências bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 4 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DO GH E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE.....	38
Resumo.....	38

Introdução.....	39
Material e métodos.....	42
Animais.....	42
Extração do DNA e genotipagem.....	43
Análise estatística.....	45
Resultados e discussão.....	47
Conclusões.....	52
Agradecimentos.....	52
Referências bibliográficas.....	59
<b>CAPÍTULO 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE.....</b>	<b>63</b>
Resumo.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	68
Animais.....	68
Extração do DNA e genotipagem.....	69
Análise estatística.....	71
Resultados e discussão.....	72
Conclusões.....	76
Agradecimentos.....	76
Referências bibliográficas.....	79
<b>CAPÍTULO 6 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DA CALPAÍNA E CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE.....</b>	<b>82</b>
Resumo.....	82
Introdução.....	83
Material e métodos.....	86
Animais.....	86
Extração do DNA e genotipagem.....	88
Análise estatística.....	89
Resultados e discussão.....	91
Conclusões.....	96

Agradecimentos.....	96
Referências bibliográficas.....	102



## LISTA DE TABELAS

		Página
1	Polimorfismos estudados, seqüência dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> (TA) e localização cromossômica dos genes (Cr).....	28
2	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>AluI</i> em um fragmento do gene GH (GH/ <i>AluI</i> ).....	28
3	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>DdeI</i> em um fragmento do gene GH (GH/ <i>DdeI</i> ).....	29
4	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>DdeI</i> em um fragmento do gene STAT5A (STAT5A/ <i>DdeI</i> )..	30
5	Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos GH/ <i>AluI</i> , GH/ <i>DdeI</i> e STAT5A/ <i>DdeI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	31
6	Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos GH/ <i>AluI</i> , GH/ <i>DdeI</i> e STAT5A/ <i>DdeI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	32
7	Polimorfismos estudados, seqüência dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> (TA) e localização cromossômica do gene (Cr).....	53
8	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pelo microsatélite na região promotora P1 em um fragmento do gene GHR (GHRm).....	54

9	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>StuI</i> em um fragmento do gene do receptor do GH (GHR/ <i>StuI</i> ).....	55
10	Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>AluI</i> em um fragmento do gene do receptor do GH (GHR/ <i>AluI</i> ).....	56
11	Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos GHRm, GHR/ <i>StuI</i> e GHR/ <i>AluI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	57
12	Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos GHRm, GHR/ <i>StuI</i> e GHR/ <i>AluI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	58
13	Polimorfismos estudados, seqüência dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> (TA) e localização cromossômica do gene (Cr).....	77
14	Frequência alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>Kpn2I</i> em um fragmento do gene Leptina (LEPT/ <i>Kpn2I</i> ).....	77
15	Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos do polimorfismo LEPT/ <i>Kpn2I</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	78
16	Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos do polimorfismo LEPT/ <i>Kpn2I</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	78
17	Polimorfismos estudados, seqüência dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos <i>primers</i> (TA) e localização cromossômica dos genes (Cr).....	97

18	Frequência alélicas e genóticas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>HhaI</i> em um fragmento do gene Calpaína (CAPN2/ <i>HhaI</i> ).....	97
19	Frequência alélicas e genóticas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição <i>XmnI</i> em um fragmento do gene Calpastatina (CALP/ <i>XmnI</i> ).....	98
20	Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos CAPN2/ <i>HhaI</i> e CALP/ <i>XmnI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	99
21	Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça para os genótipos dos polimorfismos CAPN2/ <i>HhaI</i> e CALP/ <i>XmnI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	100
22	Médias dos quadrados mínimos das características da qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos CAPN2/ <i>HhaI</i> e CALP/ <i>XmnI</i> e número de animais comparados de cada genótipo (n).....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AluI</b>	Enzima de restrição <i>AluI</i>
<b>AOL</b>	Área de olho-de-lombo do músculo <i>Longissimus dorsi</i> , entre a 12 <sup>a</sup> a 13 <sup>a</sup> costela (cm <sup>2</sup> )
<b>CALP</b>	Gene da Calpastatina
<b>CAPN2</b>	Gene da m-Calpaína ou Calpaína II
<b>DdeI</b>	enzima de restrição <i>DdeI</i>
<b>EGAR</b>	Espessura cobertura de gordura subcutânea sobre a garupa (mm)
<b>EGS</b>	Espessura de gordura subcutânea na altura da 12 <sup>a</sup> a 13 <sup>a</sup> costela (mm)
<b>FC</b>	Força de cisalhamento por Warner Bratzler Shear Force (kg)
<b>GH</b>	Gene do Hormônio do Crescimento
<b>GHR</b>	Gene do Receptor do Hormônio do Crescimento
<b>GLM</b>	General Linear Model
<b>GPMD</b>	Ganho de peso médio diário
<b>HhaI</b>	Enzima de restrição <i>HhaI</i>
<b>Kpn2I</b>	Enzima de restrição <i>Kpn2I</i>
<b>LEPT</b>	Gene da Leptina
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCQ</b>	Peso da carcaça quente
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PF</b>	Peso Final
<b>PI</b>	Peso inicial
<b>QTL</b>	Loci de características quantitativas

<b>RFLP</b>	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
<b>SAS</b>	Statistical Analysis System
<b>STAT5A</b>	Gene da STAT5A
<b>STR</b>	Repetições curtas lado a lado
<b>U</b>	Unidades de enzima de restrição
<b>XmnI</b>	Enzima de restrição <i>XmnI</i>

## RESUMO

O Sistema de Produção de Novilhos Superprecoces é considerado hoje o único sistema padronizado de produção de bovinos de corte, em prática no Brasil, que prediz a qualidade total dos produtos cárneos e seus sub-produtos. Tal sistema permite obter animais jovens, em torno de um ano, prontos para o abate, com terminação adequada de cobertura de gordura na carcaça. Atualmente as técnicas de genética molecular permitem identificar e clonar genes responsáveis pela síntese de proteínas que atuam nas vias metabólicas relacionadas ao crescimento animal e partição de nutrientes para os diferentes tecidos auxiliando o melhoramento genético. Considerando a importância do efeito dos genes do Hormônio do Crescimento e seu receptor, Leptina, STAT5A, Calpaína e Calpastatina no metabolismo animal, buscou-se neste trabalho estudar 9 polimorfismos genéticos e verificar a existência de associação com os índices mais importantes de crescimento, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos submetidos ao Sistema Superprecoce, durante três sucessivos anos de confinamento experimental. Para tanto, foram avaliados 500 animais para os polimorfismos do GH/*AluI* e GHRm, e 300 animais para o restante dos polimorfismos gênicos. Os animais foram desmamados aos sete meses de idade em sistema *creep-feeding* e posteriormente submetidos a confinamento por 120 dias. Os polimorfismos foram analisados pela técnica PCR-RFLP e STR. O efeito dos genótipos sobre as características estudadas foi analisado utilizando-se o procedimento GLM (SAS) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos comparadas pelo teste de Tukey. As características mais importantes do crescimento foram influenciadas significativamente pelos polimorfismos do GH/*DdeI*, GHR/*StuI*, LEPT/*Kpn2I*, STAT5A/*DdeI* e CAPN2/*HhaI* ( $P < 0,01$ ). As características de carcaça foram associadas significativamente com os polimorfismos GHR/*StuI*, LEPT/*Kpn2I* e CAPN2/*HhaI* ( $P < 0,01$ ). No entanto, em relação às características mais importantes da qualidade da carne, tal como a maciez, houve relação significativa com os polimorfismos do microsatélite GHRm, LEPT/*Kpn2I* e CAPN2/*HhaI* ( $P < 0,01$ ). Contrariando o esperado, os genótipos do polimorfismo CALP/*XmnI* não foram associados com nenhuma característica de crescimento, carcaça e carne.

Palavras-chaves: bovinos, carcaça, DNA, gordura, marcadores, maciez, musculosidade.

## SUMMARY

The Novilho Superprecoce System is considered the only beef cattle production system in Brazil that determines the total quality of meat products and by-products. The animals were slaughtered at one year old with appropriate carcass backfat. The molecular genetics studies have resulted in the identification of genes with a key role in the determination of production traits, improving the animal breeding. Considering the importance of Growth Hormone, GH receptor, Leptin, STAT5A, Calpain and Calpastatin genes at the animal metabolism, the objectives of this work were the study of 9 genes polymorphisms on the DNA sequence and their associations with the most important growth, carcass and meat quality traits of beef cattle raised at the Superprecoce System, during three years consecutives of feedlot. A total of 500 animals to the GH/*AluI* and GHRm polymorphisms, and 300 animals to the remaining genes polymorphisms were analyzed. The animals were weaned at 7 months old at the *creep-feeding* and raised at the feedlot system for 120 days. The polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP and STR methodology. The genotype effects at the traits were analyzed by GLM procedure of SAS and the least square means of the genotypes were compared by Tukey test. The most important growth traits were influenced by GH/*DdeI*, GHR/*StuI*, LEPT/*Kpn2I*, STAT5A/*DdeI* and CAPN2/*HhaI* genes polymorphisms ( $P < 0,01$ ). The carcass traits were associated with GHR/*StuI*, LEPT/*Kpn2I* and CAPN2/*HhaI* genes polymorphisms ( $P < 0,01$ ). Nevertheless, just tenderness, of the meat quality traits, showed a significant relationship with the GHRm microsatellite, LEPT/*Kpn2I* and CAPN2/*HhaI* polymorphisms ( $P < 0,01$ ). Contradicting the expectations, the genotypes of CALP/*XmnI* gene polymorphism was not associated with none growth, carcass and meat quality traits.

Key-words: bovine, carcass, DNA, fatness, markers, muscle, tenderness.

## CAPÍTULO 1

### CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O crescimento demográfico e a abertura de novos mercados (exportação) demandam produtividade e qualidade em qualquer etapa do processo de produção agropecuário. A crescente competitividade do processo de produção de carne no país vem tornando a eficiência econômica cada vez mais importante para os criadores. Todo e qualquer fator que interfira com o processo produtivo, seja este oriundo do manejo, reprodução, nutrição e genética, deve ser conhecido e explorado ou sanado. Assim, existe um grande interesse do mercado nas tecnologias que proporcionem melhorias no rendimento econômico de cada sistema de produção existente, seja este extensivo, intensivo ou semi-intensivo.

A simples adoção de novas tecnologias e o emprego de metodologias mais eficientes em programa de Melhoramento Genético vêm causando profundas mudanças nos procedimentos adotados pelos criadores, quanto ao manejo seletivo e reprodutivo dos seus rebanhos (HERRING et al, 1992). A disponibilidade de informações mais precisas sobre o mérito genético de cada reprodutor, aliada às técnicas que permitem ampliar as taxas de multiplicação de genótipos de interesse, têm tornado as decisões dos criadores mais objetivas, principalmente no que se refere à escolha dos animais para reprodução (REED, 1984). Estas metodologias permitem mudanças genéticas em um ritmo cada vez mais acelerado dentro da população (BARENSE et al., 2004).

Existe grande variação genética entre indivíduos dentro de cada raça, o que possibilita a realização de Melhoramento Genético através da seleção. Considerando a grande variabilidade genética presente no rebanho brasileiro, e sabendo que apenas uma pequena parte desta população é submetida a processos seletivos, uma vez que testes de progênie são dispendiosos quanto ao custo e tempo, quaisquer acréscimos ocasionados pela detecção de genes que proporcionem melhorias na produção e qualidade de carne, incorreriam em grande retorno econômico (SWITONSKI, 2002). Com isto, dados de mapeamento genético podem ser utilizados tanto para determinar a amplitude da variação genética em uma dada população, indicando quão diferentes são os indivíduos



avaliados, como para disponibilizar ferramentas decisivas para o progresso genético das raças.

Desta forma, a utilização de testes genéticos, baseados no conhecimento do potencial genético dos indivíduos em idades muito jovens, se mostra como alternativa promissora em programas de seleção de bovinos de corte. Estes testes baseiam-se exclusivamente em decifrar as informações contidas no DNA de cada animal, fazendo o uso da tecnologia dos marcadores moleculares (COUTINHO & REGITANO, 2001). Atualmente, a Austrália, que foi por muito tempo país líder em exportação mundial de carne bovina, adquiriu patente de dois marcadores moleculares que fornecem informações sobre o potencial individual do animal quanto à produção de carne macia ou marmorizada no abate (BARENSE et al., 2004; GENENOTE 4, 2004; GENENOTE 7, 2004).

Existe ainda um vasto campo na identificação de marcadores moleculares para características de crescimento, precocidade, rendimentos de cortes cárneos, fertilidade, resistência a parasitas, etc em bovinos (PEREIRA, 2001). De uma maneira generalizada, até hoje, não há consenso ou repetibilidade dos resultados de testes genéticos e sua associação com as características economicamente importantes de bovinos, embora a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho-de-lombo (AOL) da carcaça e a produção de músculo tenham valores de herdabilidade moderados a altos (CREWS & KEMP, 2001). Espera-se que, em um futuro próximo, o número de trabalhos que analisam o efeito do polimorfismo de genes candidatos em características de produção animal aumente substancialmente, a fim de se obter resultados mais conclusivos, possibilitando utilização prática desta ferramenta na seleção e no Melhoramento Genético de bovinos de corte.

## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

O desenvolvimento sócio-econômico que vem ocorrendo em muitos países, resultado do crescimento industrial, aliado ao crescimento demográfico, provoca aumento da demanda de produtos de origem animal, gerando mudanças e conseqüências drásticas nas cadeias produtivas. Entende-se como parte destas mudanças, os esforços empregados para a obtenção de produtos de qualidade garantida que satisfaça o novo perfil do mercado consumidor, muito mais exigente.

Atualmente, a pecuária de corte se consolida como um dos mais importantes setores do agronegócio brasileiro (CURI et al., 2003). O grande contingente numérico de bovinos criados em sistemas de pastagens extensivas confere-nos a possibilidade de exportação, graças ao preço competitivo da produção da carne nacional. No entanto, no tocante da qualidade de carcaça e carne, existe uma ampla gama de aspectos a serem implementados. A genética é uma ferramenta imprescindível para a melhoria das características de importância econômica (HALE et al., 2000). No melhoramento genético animal tradicional, o progresso genético de características ligadas à qualidade de carne tem sido dificultado pela falta de clareza dos objetivos de qualidade e pelas dificuldades de se mensurar as características no animal vivo, sendo a maioria dos dados recolhidos de animais descartados e não selecionados, apesar da grande maioria das características de qualidade de carne possuírem valores de herdabilidade de moderados a altos (CREWS & KEMP, 2001; DA SILVA et al., 2003). Desta forma, a biotecnologia representa uma oportunidade e um desafio, pois há necessidade de produzir animais com maior eficiência e menor custo. Esta técnica se torna amplamente aplicada à produção animal, quando direcionada às melhorias no metabolismo do crescimento, reprodução e qualidade da carcaça (REGITANO & COUTINHO, 2001; DA SILVA et al., 2003).

A última década do século XX foi marcada por grande progresso no conhecimento de muitos genomas vegetais e animais e desenvolvimento de mapas genômicos comparativos (DA SILVA et al., 2003). Os mapas possibilitam à identificação das regiões que afetam as características mais importantes

economicamente (KAPPES, 1999), já que neste caso, marcadores moleculares polimórficos são empregados para localizar regiões cromossômicas que estão ligadas às regiões do DNA determinantes da expressão normal de características ou variações nessa expressão (PEREIRA, 2001). No entanto, a seleção de regiões cromossômicas, em vez de alelos individuais, pode ser menos efetiva em razão da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL (DA SILVA et al., 2003).

Embora a maior parte das características de interesse econômico sejam quantitativas, ou seja, controladas por um grande número de genes, cada um contribuindo com pequeno efeito sobre o caráter (MASSEY & GEORGES, 1992), debate-se a existência de genes principais, que contribuiriam com a maior parte da variação fenotípica de um caráter quantitativo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Como as características de crescimento possuem herdabilidade moderada, sabe-se que o número de QTL com grande efeito é limitado a 6 genes ou menos, dependendo da frequência gênica de cada locus (LIMA, 2003). Atualmente, os avanços da Genética Molecular permitem estudar, com maior profundidade, os genes envolvidos nas principais vias metabólicas relacionadas ao crescimento animal e partição de nutrientes para os diferentes tecidos (CURI, 2004). O simples conhecimento dos genes importantes para as características bio-econômicas no sistema de produção pode oferecer importantes benefícios à agroindústria (KAPPES, 1999).

Assim tem-se que as informações obtidas por meio de DNA, juntamente com os registros fenotípicos, podem ser extremamente úteis no aumento da acurácia de predição dos valores genéticos, e conseqüentemente, da resposta obtida no processo de seleção (PEREIRA, 2001). A detecção individual de genes pode levar a aplicações úteis em várias áreas, tal como identificação de genes relacionados com o aumento da eficiência de seleção no melhoramento animal, especialmente em características de baixa herdabilidade ou naquelas que só podem ser mensuradas após o abate dos animais, ou em apenas um sexo (REGITANO & COUTINHO, 2001; PEREIRA, 2001). Ainda, informações a respeito dos animais selecionados podem ser obtidas em idades mais precoces, que se refletirá em aceleração do progresso genético anual (DA SILVA et al., 2003). As informações genômicas também podem ser instrumentos importantes para fixação, flutuação e eliminação de genes de efeitos importantes, possibilitando a

indústria especificar uma série de genes que deverão estar presentes ou ausentes em determinados produtos (KAPPES, 1999; DA SILVA et al., 2003).

Desta maneira, o estudo do polimorfismo gênico de espécies domésticas, principalmente relacionado a genes ligados a processos metabólicos importantes, vem sendo utilizado com frequência por pesquisadores, para relacionar possíveis diferenças genéticas e características produtivas dos animais (FERRAZ, 2001; SILVEIRA et al., 2002). Assim, a utilização de testes de DNA, com base no uso de marcadores moleculares, tem se mostrado como alternativa promissora em programas de seleção de bovinos de corte (COUTINHO & REGITANO, 2001), já que pode permitir um melhor planejamento dos sistemas de acasalamento, objetivando o aumento da frequência de determinados alelos na população (WOMACK, 1993; PEREIRA, 2001; DA SILVA et al., 2003).

Sabe-se que dentre os principais fatores que alteram o crescimento dos ruminantes, destacam-se as relações entre o tamanho corporal à maturidade e utilização dos nutrientes para formação dos diversos tecidos corporais (CURI, 2004). A maior parte das diferenças encontradas no metabolismo de animais de distintos tamanhos à maturidade, nas diversas fases do crescimento animal, é explicada através da ação do eixo-somatotrófico (PARMENTIER et al., 1999; SILVEIRA, 2002), essencialmente constituído pelo hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II), suas proteínas carregadoras associadas e seus receptores (SCHLEE et al., 1994; RENAUILLE et al., 2002). Assim, a identificação de variações nos hormônios do eixo somatotrófico, muito relacionados com o potencial produtivo de bovinos de corte, têm levado a mecanismos auxiliares para seleção dos bovinos (FERRAZ, 2001). Desta forma, devido à grande importância no metabolismo animal, polimorfismos no gene do Hormônio do Crescimento (GH), assim como no gene do Receptor do GH vêm sendo muito estudados na literatura (HALE et al., 2000; FERRAZ, 2001; SILVEIRA, 2002; CURI, 2004). A possível influência de genes descobertos recentemente, como da STAT5A, também está sendo avaliada no metabolismo de ação do GH (OPRZADEK et al., 2003).

O metabolismo do tecido adiposo possui grande influência nas características da carcaça. Desta maneira, o gene da Leptina aparece como potencial gene candidato na determinação da quantidade de EGS e de marmoreio na carcaça (SALMAN, 2004). Até

agora, os genes da Calpaína e Calpastatina são os genes mais importantes na determinação na maciez da carne bovina (BARENSE et al., 2004). Resultados relevantes em que se usou a abordagem de genes candidatos estão sendo obtidos nos estudos sobre a Calpaína, Calpastatina e Catepsina. Em bovinos de corte e ovelhas, há evidências sobre o papel do sistema da Calpaína, um conjunto de proteases cálcio-dependentes e seu inibidor, a Calpastatina, no *turnover* de proteínas *in vivo* e *post mortem* (DA SILVA et al., 2003). As Catepsinas estão sendo investigadas na proteólise dos produtos condimentados, como o presunto curado de suínos.

Assim, a utilização de genes candidatos na seleção de animais domésticos parece ser uma maneira eficiente de se obter melhorias significativas, do ponto de vista genético, da qualidade da carcaça e da carne. No entanto, a identificação dos efeitos de genes sobre os fenótipos será tão mais difícil, quanto mais variáveis forem as condições de ambiente, já que a expressão do fenótipo depende da interação dos efeitos do genótipo e do ambiente (PEREIRA, 2001). Com isto, a avaliação dos efeitos dos genótipos em um ambiente controlado, onde todos os animais tenham acesso a condições plenas de desenvolvimento do seu potencial genético, pode levar a maior poder de detecção dos testes para identificação de marcadores moleculares. O Sistema de Produção do Novilho Superprecoce, baseado em confinamento coberto com alta ingestão de energia diária, é a maneira mais adequada de avaliar as variações de desenvolvimento de grupos genéticos de diferentes tamanhos à maturidade (SILVEIRA et al., 1999), pois controla boa parte dos efeitos de manejo, idade e nutrição, determinantes destas diferenças. Desta forma, consegue-se, através deste sistema de produção pecuário controlado e de ciclo curto, uma acurada avaliação dos reais efeitos do genótipo dos animais sobre as características de desempenho, qualidade da carcaça e carne. Como estas informações ainda são muito pouco conhecidas e extrapoladas para animais com algum grau de sangue da raça Nelore, estas poderão ser utilizadas na seleção de reprodutores, visando à produção de animais de melhor desempenho, rendimento de cortes comerciais e qualidade de carne assegurada.

De uma maneira generalizada, até hoje, não há consenso ou repetibilidade dos resultados de testes genéticos e sua associação com características economicamente importantes de bovinos. Muitos dos trabalhos que detectam efeito dos genótipos dos polimorfismos em determinada população de bovinos, muitas vezes não têm seus

resultados confirmados quando se avaliam outras raças, indicando a possibilidade de ligações provisórias. Porém, quando passa a se estudar, ao mesmo tempo, o efeito comum de determinado polimorfismo em um conjunto de grupos genéticos diferentes, o efeito detectado será um efeito do genótipo comum a todo o conjunto, e portanto, embora mais difícil de ser detectado, uma vez encontrado, este deverá apresentar resultados mais consistentes.

O capítulo 3, intitulado ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E DA STAT5A E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE, teve como objetivos estudar polimorfismos genéticos na seqüência do DNA do gene do GH e STAT5A, pela técnica de PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com os índices de crescimento, características de carcaça e carne de 500 animais inteiros, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

O capítulo 4, intitulado ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DO GH E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE, teve como objetivos estudar três polimorfismos genéticos na seqüência do DNA do gene do Receptor do GH, pelas técnicas de PCR-RFLP e STR, e verificar a existência de associação com os índices de crescimento, características de carcaça e carne de 500 animais inteiros, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

O capítulo 5, intitulado ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE, teve como objetivos estudar polimorfismo genético na seqüência do DNA no gene da Leptina, pela técnica de PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com os índices de crescimento, características de carcaça e carne de 300 animais inteiros, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

O capítulo 6, intitulado ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DA CALPAÍNA E CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARCAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE, teve como objetivos estudar polimorfismos genéticos na seqüência do DNA do

gene da m-Calpaína e Calpastatina, pela técnica de PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com os índices de crescimento, características de carcaça e carne de 300 animais inteiros, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

Todos os trabalhos foram apresentados de acordo com as normas da Revista **Meat Science**.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARENSE, W.; BUNCH, R.; THOMAS, M. et al. The TG5 DNA Marker Test for marbling capacity in Australian Feedlot Cattle. **CSIRO Molecular Genetics Centre Level 3** - Austrália, 2004.
- COUTINHO, L.L & REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: **Congresso Brasileiro De Reprodução Animal**, 11. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.195-205, 1995.
- CREWS, D. H & KEMP., D. J. Genetic parameter for ultrasound and carcass measures of yield and quality among replacement and slaughter beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 3008-3020, 2001.
- CURI, R. A. Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico Superprecoce. Tese (Doutorado) – UNESP/IB, março/2004, 126 p.
- CURI, R.A.; SUGUISAWA, L; OLIVEIRA, H.N. et al. Associação entre genótipos para o receptor do hormônio do crescimento e características de produção em novilhos superprecoces. **Anais do 49º Congresso Brasileiro de Genética**, p. 159, 2003.
- DA SILVA, M.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E. et al. Utilização de marcadores genéticos em suínos. I. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archives Latinoamericano Produccion Animal**, v.11, p.1-10, 2003.
- FERRAZ, A. L. J. Identificação de polimorfismos no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte. Monografia/Graduação–FCAV–UNESP/Jaboticabal. 62 p. junho/2001.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.
- GENENOTE4 - **GENESTAR TENDERNESS** - Genetic Solutions Ltd - Austrália  
<http://www.geneticsolutions.com.au>, 01/01/2004.
- GENENOTE7 - **GENESTAR TENDERNESS 2** - Genetic Solutions Ltd - Austrália  
<http://www.geneticsolutions.com.au>, 01/01/2004.



- HALE, C.S.; HERRING, W.O.; SHIBUYA, H. et al. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. **Journal of Animal Science**, v.78, p. 2099-2104, 2000.
- HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K. et al. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 2216-2226, 1992.
- KAPPES, S.M. Utilization of gene mapping information in livestock animals. **Theriology**, v.5, p. 136-147, 1999.
- LIMA, S.P.G. Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino (bGH) em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. Dissertação – FCAV – UNESP/Jaboticabal. 46 p. 2003.
- LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. 134 p.
- MASSEY, J.M. & GEORGES, M. Genmark's approach to marker assisted selection. **Animal Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 95-110, 1992.
- OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al. Polymorphisms at loci of Leptn (Lep), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black-in-white bulls. **Animal Science Papers and Reports**, v. 21, n.3, p.135-145, 2003.
- PARMENTIER, L.; PORTELLE, D.; GENGLER, N. et al. Candidate genes markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 139-148, 1999.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 555 p
- REED, C.A. The beginnings of the animal domestication. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p 1-6.
- REGITANO, L.C.A. & COUTINHO, L.L. **Biologia Molecular aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 213 p.
- RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 351-360, 2002.

- SALMAN, A.K.D. Polimorfismos dos genes da obesidade (Leptina) em diferentes grupos genéticos de bovinos de corte terminados no sistema Superprecoce. Tese (Doutorado) – FMVZ-UNESP/ Botucatu/SP. Julho/2004, 42 p.
- SCHLEE, P.; GRAMI, R.; SCHALLENBERGER, E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994a.
- SILVEIRA, L.G.G. Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (GH) como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos de corte. 2002. 50p. Dissertação (Mestrado) – FMVZ/ UNESP, Botucatu/SP.
- SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.D.B.; CHARDULO, L.A.L. et al. Sistema de produção de novilhos superprecoces. **Anais do 1º Simpósio Goiano Sobre Produção De Bovinos De Corte**, Goiânia/GO - CBNA, 1999. p.105-122.
- SILVEIRA, L.G.G.; SUGISAWA, L.; MARTINS, C.L. et al. Análise de polimorfismos do GH em bovinos da raça Canchim. **Anais do 49º Congresso Brasileiro de Genética**, p.68, 2003.
- SWITONSKI, M. Molecular genetics in beef cattle breeding – a review. **Animal Science Papers and Reports**. v. 20, p. 7-18, 2002.
- WOMACK, J.E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1199- 1203, 1993.

### CAPÍTULO 3

## ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E DA STAT5A E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE

### RESUMO

Considerando a importância do efeito do gene do GH e da possibilidade do gene da STAT5A ser mediador da ação do GH no metabolismo animal, buscou-se estudar os polimorfismos *GH/AluI*, *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI*, por PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com índices de crescimento, carcaça e carne de 500 animais inteiros (251 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 Brangus, 40 Simental x Nelore, 12 Simental, 11 Simbrasil, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 29 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 78 Nelore), submetidos a sistema intensivo de produção. O efeito dos genótipos sobre as características foi analisado pelo procedimento GLM (SAS) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos comparadas pelo teste de Tukey. O modelo incluiu o efeito do genótipo, grupo genético x ano x fazenda de origem do animal e interações. Os resultados não mostraram nenhuma associação significativa do *GH/AluI* e características estudadas. No entanto, houve influência dos polimorfismos do *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* sobre as medidas, por ultra-som, da área de olho-de-lombo e gordura subcutânea, respectivamente ( $P < 0,01$ ).

**Palavras chave:** bovinos de corte, carcaça, crescimento, gene candidato, polimorfismo.

## INTRODUÇÃO

Apesar da pecuária brasileira, atualmente, abranger o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 186 milhões de cabeças (IBGE, 2002), suas características são muito distintas dos principais países exportadores de carne, pelo fato da população bovina nacional ser constituída principalmente de zebuínos, criados em sistemas de pastagens extensivas. Desta forma, graças às variações sazonais e, na maioria dos casos, comprometimento do consumo total de energia por animal, intrínsecas a este tipo de sistema de produção, há prejuízos no padrão de crescimento dos bovinos de corte, o que confere aumento expressivo na idade de abate dos animais (ao redor dos 36 meses).

O Sistema de Produção de Novilhos Superprecoces é um modelo que permite obter animais jovens, em torno de um ano, prontos para o abate, com terminação adequada de cobertura de gordura na carcaça (SILVEIRA et al., 1999). Este modelo permite avaliar a taxa de crescimento e as transformações e desenvolvimento dos tecidos, notadamente o muscular-esquelético, na fase de crescimento rápido, auxiliando na redução da idade de abate e no aumento da eficiência de produção (SILVEIRA et al., 1999). O crescimento, dentre todas as características do desenvolvimento corporal dos bovinos de corte, caracteriza-se como um processo de elevada importância econômica sendo influenciado principalmente pelas relações entre o tamanho corporal à maturidade e a utilização dos nutrientes para a formação dos diversos tecidos corporais. Basicamente, à ação dos hormônios do eixo-somatotrófico, constituído pelo hormônio de crescimento (GH), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II), suas proteínas carregadoras associadas e seus receptores, nas diversas fases do crescimento animal, é que determina as diferenças encontradas no metabolismo de animais de tamanhos distintos à maturidade (OWENS et al., 1993; SCHLEE et al., 1994; RENAUILLE et al., 2002).

O Hormônio do Crescimento (GH), isolado pela primeira vez em 1944, possui cadeia polipeptídica simples, com 190 ou 191 aminoácidos, dependendo da presença de uma alanina ou uma fenilalanina na posição aminoterminal, respectivamente (LIMA, 2003), de peso molecular de 21,819 kDa e duas pontes dissulfeto. O GH, direta ou indiretamente, por meio do IGF-I, é o principal regulador do crescimento somático pós-

natal, estimulando processos anabólicos como a divisão celular, crescimento do esqueleto e síntese de proteínas (GOODMAN, 1993; CURI, 2004). Há indícios de que o aumento de área de olho-de-lombo e a redução na quantidade de gordura subcutânea e de marmorização têm sido observados em animais de maior tamanho à maturidade e com elevada concentração de GH e IGF-I (ELSASSER et al., 1989; DALKE et al., 1992; MOSELEY et al., 1992).

STAT5 são fatores de transcrição, membros do eixo-somatotrófico, da sinalização do Hormônio do Crescimento (GH) e da prolactina, principalmente conhecidos como mediadores da ação do GH nos genes alvo e também como mediadores intracelulares da sinalização da prolactina, podendo ativar a transcrição dos genes da proteína do leite em resposta à mesma (PARMENTIER et al., 1999). Os fatores de transcrição STAT5 interagem e funcionam sinergeticamente com receptores dos glucocorticóides e insulina. O STAT5 possui duas isoformas (A e B), que são codificadas por poucos genes e se diferem por poucos aminoácidos no final carboxílico da molécula de proteína (OPRZADEK et al., 2003). Em bovinos, o gene STAT5A está no cromossomo 19q17 dentro de 40 locus STAT Kpz que contém genes STAT3 e STAT5B (FLISIKOWSKI et al., 2003).

Assim, tem-se que o gene do GH e o gene da STAT5A podem ser considerados importantes genes candidatos para crescimento (THUE & SCHMUTZ, 1994). Várias mutações em regiões diferentes do gene do GH de bovinos foram descritas e muitos trabalhos têm evidenciado associação entre os polimorfismos no gene do GH com as características produtivas em bovinos, possivelmente graças à relação entre os polimorfismos e variações na expressão do gene (LUCY et al., 1993; SCHLEE et al., 1994; YAO et al., 1996; GE et al., 2003; LIMA, 2003). O polimorfismo do GH mais estudado é baseado na troca de nucleotídeo C por G no códon 127 do gene do hormônio do crescimento que provoca a substituição do aminoácido leucina (alelo L) por valina (alelo V) na seqüência da proteína (LUCY et al., 1993). Em trabalho com animais da raça Simental foi evidenciado que bovinos machos heterozigotos (LV) apresentaram menores concentrações plasmáticas de GH e maiores níveis circulantes de IGF-I que os homozigotos LL (SCHLEE et al., 1994). No entanto, o comportamento oposto, dos genótipos sobre as variáveis, foi evidenciado em estudo com bovinos da raça Friesian (GROCHOWSKA et al., 2001). Há ainda trabalhos que não evidenciaram nenhuma

variação do efeito do polimorfismo GH sobre as concentrações plasmáticas de GH e de IGF-1 em Friesian (GROCHOWSKA et al, 1999) e Canchim (SILVEIRA, 2002). O polimorfismo GH/*DdeI* é ocasionado por uma troca de nucleotídeo (A por C) na posição 2291 (exon 5) do gene do GH que não implica em substituição de aminoácido na seqüência da proteína (YAO et al., 1996).

O polimorfismo do STAT5A, descrito por FLISIKOWSKI et al. (2003), que corresponde a uma substituição da cisteína por timina na posição 6853 do exon 7, que codifica 250-480 aminoácidos, foi significativamente associado a algumas características de produção de bovinos de corte, cujos animais com genótipos CC obtiveram os melhores índices de crescimento enquanto os bovinos com genótipos CT demonstraram características superiores de carcaça (FLISIKOWSKI et al., 2003). Desta forma, os animais de genótipo CC apresentavam não só maior peso da carcaça fria, como também superior rendimento de cortes cárneos comerciais, enquanto que os indivíduos de genótipo CT apresentaram maior peso de osso do “sirloin”, “best ribs” e seção torácico-lombar mais comprida. A ausência de animais homozigotos TT no estudo de FLISIKOWSKI et al. (2003), pode também ter contribuído para atenuar as diferenças entre os polimorfismos gênicos do gene da STAT5A.

Entretanto, apesar dos recentes avanços na área de biologia molecular, trabalhos sobre a identificação de polimorfismos no gene do GH e STAT5A e suas relações com as características produtivas do gado de corte ainda são considerados escassos na literatura (DI STASIO et al., 2002). Há uma demanda crescente por estudos aprofundados sobre a base genética dos polimorfismos e sua associação com características fenotípicas, de modo a possibilitar sua aplicação na seleção de vários grupos genéticos de diferentes padrões de crescimento (SCHELEE et al., 1994; REGITANO et al., 1999; SWITONSKI, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar polimorfismos na seqüência do DNA do gene do GH (GH/*AluI* e GH/*DdeI*), e no gene da STAT5A (STAT5A/*DdeI*), e suas associações com os índices mais importantes de crescimento, carcaça e qualidade de carne de 500 bovinos de corte, de diversos grupos genéticos, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Animais.**

O projeto foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, ambos da UNESP/Botucatu-SP.

Para a análise experimental foram colhidas amostras de sangue de 500 animais dos seguintes grupos genéticos: 250 animais Angus x Nelore, 10 Angus puro, 18 Brangus (3/8 Nelore x 5/8 Angus), 41 Simental x Nelore, 12 Simental puro, 11 Simbrasil (3/8 Nelore x 5/8 Simental), 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 29 Canchim (3/8 Nelore x 5/8 Charolês), 16 Brahman x Nelore e 78 animais Nelore puro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os bezerros foram desmamados aos 210 dias de idade em sistema *creep-feeding*. No início do experimento, todos os animais foram identificados individualmente, tratados contra endo e ectoparasitas e distribuídos aos currais de confinamento, com cinco animais cada, de acordo com o grupo genético e tamanho, sendo alimentados com dietas formuladas segundo as normas do NRC (1996), para ganhos de pesos médios diários acima de 1,2 kg. Os dados de três anos de confinamento experimental foram utilizados, e embora houvesse diferenças entre o tempo de confinamento por grupo genético e por ano avaliado, em média, todos os animais amostrados foram abatidos após 120 dias.

Os animais foram pesados no início do confinamento (**PI**) e próximo ao abate (**PF**). O ganho de peso médio diário (**GPMD**) foi calculado pela média de ganho de peso entre todas as pesagens. As medidas de área de olho de lombo, ou seja, área do músculo *Longissimus dorsi* (**AOL**), cobertura de gordura subcutânea na altura da 12<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup> costela (**EGS**) e cobertura de gordura subcutânea sobre a garupa (**EGAR**) foram avaliadas por ultra-sonografia, conforme o método de HERRING et al. (1992), utilizando um aparelho de ultra-sonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02), na ocasião da última pesagem. As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

O critério de abate utilizado foi peso final mínimo de 450 kg e EGS mínima de 3 milímetros (mm), monitorado por ultra-sonografia para todos os grupos genéticos. No momento do abate foram medidos o peso da carcaça quente (**PCQ**). Após o abate, as carcaças foram identificadas, pesadas e resfriadas por 24 horas. Foram determinados os pesos dos cortes Contra-filé (**Contra-filé**) e Lagarto (**Lagarto**), durante a desossa, como indicativos dos cortes cárneos comerciais da carcaça. O peso do Corte Contra-filé compreendeu a porção entre a 6<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> costela.

Foram coletadas, após o resfriamento, amostras da seção da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para a obtenção da medida de área de olho-de-lombo (**AOL**) e gordura de cobertura na carcaça (**EGS**), força de cisalhamento (**FC**), como medida objetiva da maciez da carne, e perdas por cozimento. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, onde as peças permaneceram armazenadas sob resfriamento de -5° C, sendo a AOL obtida através da utilização da régua de quadrantes de pontos (LUCHIARI FILHO, 2000), e a EGS através de mensuração com paquímetro. Foram realizadas análises laboratoriais para a determinação da maciez e das perdas por cozimento no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, segundo metodologia proposta por SHACKELFORD et al. (1991).

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para analisar os polimorfismos genéticos, sendo o DNA extraído do sangue através do *kit* de extração *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (AMERSHAM PHARMACIA). A presença de marcadores moleculares no DNA genômico foi analisada no gene do Hormônio do Crescimento (**GH**) em duas regiões, no sítio de restrição da enzima *AluI* (**GH/AluI**), segundo metodologia de SCHLEE et al. (1994), e no sítio de restrição da enzima *DdeI* (**GH/DdeI**), segundo metodologia de YAO et al. (1996), e no gene da **STAT5A** (**STAT5A**), no sítio de restrição da enzima *DdeI*, segundo metodologia de FLISIKOWSKI et al. (2003). Os *primers* necessários para a amplificação das regiões de interesse, bem como a enzima de restrição necessária para a digestão dos fragmentos amplificados para o gene do GH e STAT5A, foram determinados com base na literatura.



### **Extração do DNA e genotipagem.**

Amostras de 5 ml de sangue total foram colhidas por flebocentese da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos a vácuo, contendo 7,5 mg de EDTA. A extração do DNA genômico utilizando-se o *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) foi feita a partir de uma alíquota de 300 µL de sangue total. A quantidade e a integridade das moléculas de DNA foram avaliadas em gel de agarose a 0,8%.

A genotipagem dos animais foi feita pela técnica de PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose (2%), no gene do Hormônio do Crescimento (**GH**) e no gene da **STAT5A (STAT5A)**. Os polimorfismos estudados, os cromossomos de localização dos genes, os *primers* e as temperaturas de anelamento necessárias à amplificação das regiões de interesse, estão apresentados na Tabela 1.

Para a determinação dos alelos L e V do polimorfismo **GH/AluI** um fragmento de 223 pares de bases desse gene foi amplificado pela técnica de PCR, e em seguida digerido com a enzima de restrição *AluI*. O alelo L foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 171 e 52 pares de bases. O alelo V foi determinado pela ausência de restrição no fragmento amplificado, apresentando-se como um fragmento de 223 pares de bases. Os heterozigotos LV apresentaram três bandas de 223, 171 e 52 pares de bases.

Para a identificação dos alelos + e - do gene do **GH/DdeI**, um segmento de 403 pares de bases desse gene foi amplificado pela técnica de PCR, e em seguida digerido com a enzima de restrição *DdeI*. O alelo + foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 192 e 157 pares de bases. Dois fragmentos de 45 e de 9 pares de bases não puderam ser visualizados em função da técnica aplicada. O alelo - indica a não digestão do fragmento amplificado, e é caracterizado como um fragmento de 349 pares de bases.

Para o polimorfismo do gene **STAT5A/DdeI** são encontrados 2 alelos C e T. Os animais homozigotos para o alelo C apresentam corte pela enzima de restrição mostrando 2 bandas, uma com 181 pb e outra com 34 pb. Os heterozigotos CT apresentam uma banda de 181 pb, uma de 34 pb e outra banda de 215 pb (sem corte). Os homozigotos para TT apresentam somente uma banda de 215 pb (sem corte).

Cada PCR foi feita em um volume final de 25  $\mu$ L e a mistura para amplificação foi constituída de: 50 ng de DNA genômico; 0,20  $\mu$ M de cada *primer*; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase. As amplificações consistiram de 5 passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla à 94°C por 4 minutos; (2) desnaturação à 94°C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* entre 54 e 66°C, dependendo da constituição dos mesmos, por 45 segundos; (4) extensão à 72°C por 1 minuto e (5) extensão final à 72°C por 4 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituem um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10 $\mu$ L de produto de PCR e 3U de enzima de restrição. As misturas para digestão foram incubadas em termociclador à 37°C por 4 horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose à 2%, em um sistema de eletroforese horizontal. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. Esses fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A documentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi feita utilizando-se um sistema digital de fotodocumentação. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pb.

### **Análise Estatística.**

A partir dos genótipos identificados nos géis foram calculadas, de acordo com WEIR (1990), as frequências genótípicas e alélicas para cada um dos polimorfismos.

Nos estudos de associação, as características de interesse foram analisadas utilizando-se o procedimento GLM (*General Linear Model*) do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1987) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas incluiu além do efeito do genótipo, o efeito de grupo contemporâneo que considerou a interação entre grupos genéticos (1,...,4), ano de confinamento (1,...,3) e fazendas de origem (1,...,6), como segue:  $Y_{ijk} = \mu + G_i + GC_j + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  = característica de produção,  $\mu$  = média geral,  $G_i$  = efeito fixo do  $i$

ésimo genótipo,  $GC_j$  = efeito fixo do  $j$  ésimo grupo contemporâneo, e  $e_{ijk}$  = erro aleatório.

Foram excluídos das análises grupos genéticos que apresentaram genótipo único e genótipos cujas frequências foram muito baixas (menor que 0,10) na amostra total de animais estudados, como foi o caso do genótipo VV do polimorfismo GH/*AluI* do gene GH e o genótipo TT no polimorfismo STAT5A/*DdeI*, na população estudada. Também foram eliminados das análises dados de animais cujos genótipos apresentavam frequência muito baixa dentro do grupo genético.

O efeito de touro não foi incluído no modelo linear uma vez que o número de animais genotipados filhos dos mesmos touros era muito pequeno (em média 8,5). Em razão desse grande número de pais, a possibilidade de confundimento entre efeito de genótipo e touro nas características de produção fica diminuída.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos grupos genéticos estudados foram encontradas as duas variantes genéticas (L e V) para o polimorfismo GH/*AluI*. Conforme pode ser observado na Tabela 2, o polimorfismo GH/*AluI* apresentou segregação na maioria dos grupos genéticos, com exceção dos animais ½ Santa Gertrudes Nelore, ½ Brahman Nelore e Nelore em que o alelo L mostrou-se fixado, resultando apenas na ocorrência do genótipo LL, o que corrobora outros trabalhos com animais zebuínos (ROSA et al., 1996; KEMENES et al., 1999). Assim, na raça Santa Gertrudes, que apresenta raças zebuínas em sua formação, espera-se naturalmente que a frequência do alelo L seja superior, e que quando acasalada com a raça Nelore, resultaria mesmo na alta frequência do alelo L apresentada (Tabela 2). As raças Canchim e Simbrasil, que também possuem zebuínos em sua composição genética, também apresentaram o alelo L em alta frequência genotípica (0,87; 0,73; respectivamente).

Os únicos grupos genéticos que apresentaram valores de frequência genotípica de LV superiores aos de LL, foram os animais Angus e ½ Simental Nelore, contradizendo a premissa que parâmetros fenotípicos utilizados no processo de seleção de bovinos para produção de carne resultaram na elevação da frequência do genótipo LV nas populações (SCHLEE et al., 1994). Esta suposição tinha sido bem evidenciada em trabalho com bovinos mestiços (3/4 europeu x 1/4 zebu), com predominância de raças especializadas para produção de carne, observando-se maior frequência do genótipo LV (0,59) em relação aos homozigotos VV (0,35) e LL (0,06) (FURLAN et al., 1998). Desta forma, se a seleção favorece o genótipo LV, e em menor grau, o genótipo LL, sendo contrária ao genótipo VV, as frequências alélicas ficariam equilibradas entre 0,1 a 0,5 para o alelo V, resultado este que tem sido encontrado em algumas populações das raças taurinas, como Angus, Hereford, Charolês, Canchim, Simental e Piemontês (CHIKUNI et al., 1991; KEMENES et al., 1999; REGITANO et al., 2000; DI STASIO et al., 2002; SILVEIRA, 2002; VASCONCELLOS et al., 2003).

O genótipo VV só foi observado nos animais das raças Brangus, Simental e ½ Pardo-suíço Nelore, comprovando o baixo número de animais com este genótipo na população e colocando em discussão a fixação do alelo L em raças zebuínas. Em trabalho com gado Friesian foi demonstrado que os genótipos LV e VV apresentam alta

correlação com a produção de leite e a quantidade de GH circulante (GROCHOWSKA et al., 2001), o que explicaria, em parte, estes resultados.

O sítio *GH/DdeI* apresentou pequena variação nos grupos genéticos Nelore, ½ Brahman Nelore e Simental (Tabela 3). O alelo + se mostrou fixado no grupo Angus, e em alta frequência no Simental, enquanto no Nelore e ½ Brahman Nelore, a frequência deste alelo foi quase nula, resultados estes semelhantes aos encontrados por FERRAZ, (2001). Considerando-se as diferenças entre as frequências observadas nos animais taurinos e zebuínos, a alta frequência de heterozigotos observadas nos animais oriundos do cruzamento de Nelore e raças européias era esperada (Tabela 3). Nas raças formadas à partir dos cruzamentos entre taurinos e zebuínos, as frequências genótípicas estão mais próximas do esperado no equilíbrio. Outros estudos também mostram resultados semelhantes (FERRAZ, 2001; SILVEIRA, 2002).

Os resultados obtidos no estudo de YAO et al. (1996), encontraram valores de 74, 24 e 2%, respectivamente para os genótipos +/+, +/- e -/- em bovinos da raça Holandesa. Estes valores são diferentes daqueles encontrados para taurinos neste trabalho (Tabela 3). Estas diferenças podem ser, atribuídas possivelmente, aos diferentes tipos de seleção genética, para produção de carne ou leite, impostas a estas raças.

Os resultados encontrados das frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo gênico da *STAT5A* encontram-se na Tabela 4. Nesta observa-se que a frequência do alelo C é muito superior a do alelo T em todos os grupos genéticos estudados. Estes dados corroboram os resultados observados no trabalho de FLISIKOWSKI et al. (2003), nas raças Polônês vermelho, Polônês preto e branco, Red Angus, Charolês, Limousin, Hereford e Simental, cujas frequências do alelo C variaram entre 0,73 e 0,94. No trabalho de FLISIKOWSKI et al. (2003), apenas duas, das raças estudadas, apresentaram animais com genótipo TT (Polônês vermelho e Polônês preto e branco). No entanto, nesta presente pesquisa, nenhum grupo genético envolvido apresentou indivíduos de genótipo TT (Tabela 4). A frequência do alelo C também foi superior a do alelo T em estudo de OPRZADEK et al. (2003), avaliando a raça Polônês preto e branco (frequência alélica de 0,90 para o alelo C). Para os polimorfismos *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* foram avaliados somente 300 bovinos de corte (126 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 Brangus, 24 Simental x Nelore, 12 Simental, 11

Simbrasil, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore). No entanto, devido a problemas ocorridos com a amplificação de amostras de DNA, conseguiu-se resultados de genotipagem de 291 animais para o polimorfismo *GH/DdeI* e 294 animais para o *STAT5A/DdeI* (Tabela 3 e 4, respectivamente). As comparações entre as médias dos quadrados mínimos das variáveis quantitativas de crescimento, carcaça e qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos *GH/AluI*, *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

O polimorfismo *GH/AluI* não apresentou associação significativa com nenhuma característica de crescimento dos animais (Tabela 5), resultado este também encontrado em estudo avaliando o efeito deste polimorfismo nas características de produção da raça Piemontesa (DI STASIO et al., 2002). A superioridade, quanto ao GPMD, do genótipo LL em relação aos LV já foi observada, entre o nascimento e a desmama, em bovinos de corte ½ Canchim Nelore, ½ Simental Nelore e ½ Angus Nelore, porém com efeito contrário da desmama a 1 ano de idade (TAMBASCO et al.; 2003). No entanto, em bovinos da raça Simental, o genótipo LV foi associado a maiores ganhos de peso (SCHLEE et al., 1994).

O polimorfismo *GH/DdeI* apresentou associação significativa com a característica AOL ultra-som, cujos animais homozigotos *+/+* possuíam maiores valores desta medida que o restante dos indivíduos (Tabela 5). A medida de AOL está positivamente correlacionada com a musculosidade animal e com a quantidade de cortes cárneos comerciais da carcaça (LUCHIARI FILHO, 2000), sugerindo que animais homozigotos para este mutação possam ter maior quantidade de músculos na carcaça. No entanto, não foi confirmada esta expectativa, pois não foi verificada nenhuma relação do polimorfismo *GH/DdeI* com as características de crescimento (PI, PF), e carcaça (PCQ, AOL), ou com os indicadores de cortes cárneos (Tabela 6). Esta constatação de superioridade do genótipo *+/+* já foi bem evidenciada em trabalho avaliando o efeito do genótipo sobre a DEP de peso à desmama em bovinos Canchim, cujos animais *+/+* tinham 5 kg a mais na desmama que os animais *+/-* (SILVEIRA, 2002). Apesar de TAYLOR et al (1998), ter associado significativamente a região do polimorfismo *GH/DdeI* com a EGS da carcaça, os genótipos demonstrados não tiveram

nenhum relação significativa com EGS por ultra-som ou carcaça, e com EGAR por ultra-som (Tabelas 5 e 6).

Devido à distribuição dos genótipos gerados pelo polimorfismo *STAT5/DdeI* nos grupos genéticos estudados, o número de animais avaliados foi pequeno e o genótipo TT foi retirado das análises. Ainda assim, foi possível verificar-se uma associação significativa com a medida da EGS por ultra-som (Tabela 5), tendo os animais CC maior valor de gordura subcutânea, por ultra-sonografia, que os animais CT ( $P < 0,01$ ). Porém, a superioridade dos animais CC quanto à deposição de EGS por ultra-som não foi evidenciada quando se observou a EGS da carcaça (Tabela 5). Esta informação corrobora o estudo de FLISIKOWSKI et al. (2003), cujo alelo C tende a ter correlação com a musculosidade do animal, já que bovinos portadores do genótipo CC tiveram os maiores valores de GPMD e melhor conversão alimentar, dos 8 aos 15 meses. A maioria dos grupos genéticos desta pesquisa era caracterizada por alta musculosidade, e somente pequena parte dos animais tinham alta precocidade de acabamento de carcaça.

Ao se avaliar as características de carcaça e qualidade de carne, os polimorfismos *GH/AluI*, *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* também não demonstraram nenhuma associação significativa (Tabela 6). Em estudo com bovinos da raça Simental, os animais de genótipo VV, do polimorfismo *GH/AluI*, foram os que apresentaram melhores características de carcaça (SCHLEE et al., 1994). Entretanto, na grande maioria dos estudos realizados com bovinos de corte, foi demonstrado que os animais VV possuem menor taxa de crescimento e peso de carcaça em relação aos demais genótipos (SWITONSKI, 2002), porém quando o objetivo é produção de leite, o genótipo VV associa-se a animais superiores (PARMENTIER et al., 1999). Provavelmente, devido ao pequeno número de animais VV encontrados, o que promoveu a retirada destes das análises estatísticas, e a alta incidência do alelo L na população em estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos, já que o alelo L estava fixado na maioria dos grupamentos genéticos estudados, pois somente os animais da raça Angus e Simental não tinham sangue zebuíno (Nelore) na sua formação. Em bovinos da raça Canchim e Piemontesa sugere-se que há aumento linear significativo do alelo V ao longo das gerações, que pode estar associado às características fenotípicas sujeitas à seleção indireta (REGITANO et al.,

1999; SARTORE & DI STASIO, 2000), situação esta não evidenciada nas populações envolvidas nesta pesquisa.

Em relação às características da qualidade da carne, sabe-se que dentre todos os atributos de um corte cárneo, os consumidores consideram a maciez o fator de maior importância no grau de satisfação da compra (KOOHMARAIE, 2003). O valor de força de cisalhamento (FC), encontrado na Tabela 6, indica a força necessária (pico máximo) para rompimento das fibras musculares de uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* de 12,7 mm de diâmetro. Esta é uma metodologia aceita para a obtenção de um valor objetivo de maciez da carne (SHACKELFORD et al., 1991). Assim, quanto maior o valor de FC obtido, menos macia é a carne e vice-versa. Neste caso, não houve associação significativa dos genótipos dos polimorfismos GH/*AluI*, GH/*DdeI* e STAT5A/*DdeI* com a maciez da carne ( $P < 0,05$ ). Os polimorfismos GH/*AluI* e GH/*DdeI* também não demonstraram nenhuma relação significativa com os pesos dos cortes comerciais do Contra-filé e Lagarto (Tabela 6). Devido ao insuficiente número de animais amostrados para a avaliação dos pesos do Contra-filé e Lagarto, não foi possível analisar estes dados para avaliar o efeito dos genótipos gerados pelo polimorfismo STAT5A/*DdeI*.

O conjunto de dados utilizados neste trabalho, por representar um amplo espectro de grupamentos genéticos, poderia identificar um efeito destes polimorfismos comum a todos os grupos estudados. Entretanto, como não foi detectado praticamente nenhum efeito significativo, este trabalho corrobora a afirmação de CURI, (2004), de que os efeitos encontrados em trabalhos que estudaram estes polimorfismos anteriormente podem ser atribuídos à ligações transitórias com QTL's. Desta forma, resultados discordantes encontrados na literatura sugerem que os polimorfismos do GH e STAT5A podem não ser os responsáveis diretos por variações fenotípicas e que, contradições como estas, podem ser explicadas por diferenças no desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTLs nas diferentes populações estudadas, por interações epistáticas diferentes entre as bases genéticas dessas populações e QTLs, ou ainda por fatores epigenéticos característicos de cada situação experimental (CURI, 2004). Além disto, outros tipos de ocorrência relacionadas ao gene do GH podem ser os maiores responsáveis pelas variações fenotípicas (4 isoformas de proteínas). Assim, tem-se que em relação ao gene do GH e STAT5A há ainda um vasto campo de estudos com a



descoberta de novos marcadores estreitamente ligados a esses QTLs (RODRIGUES et al., 1998; FERRAZ et al., 2003), o que demonstra que a simples utilização de polimorfismos neste gene em programas de seleção de bovinos de corte pode parecer, até agora, um tanto prematura.

Como os dois sítios de restrição no gene do GH para as enzimas *AluI* e *DdeI* são muito próximos, estudos recentes indicam a formação de haplótipos, devido a forte ligação entre os genótipos (SILVEIRA, 2002). Desta forma, ambos polimorfismos podem ser analisados conjuntamente para serem associados com os índices mais importantes de produção. Neste trabalho, a pouca efetividade de ambos polimorfismos em quaisquer das características envolvidas, quando analisados separadamente, fortalece a suspeita da formação de haplótipos entre estes dois marcadores e sugere novas metodologias de análise.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que não existem efeitos dos polimorfismos do gene do GH (*GH/AluI* e *GH/DdeI*) e do gene da STAT5A (*STAT5A/DdeI*) sobre as características de produção e qualidade de carne estudadas, comuns a todos os grupamentos genéticos envolvidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa e pela concessão de bolsa de estudos a autora Liliane Sugisawa.

**Tabela 1** – Polimorfismos estudados, seqüência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos *primers* (TA) e localização cromossômica dos genes (Cr).

Polimorfismo	Seqüência dos <i>primers</i> 5' → 3'	TA °C	Cr
GH/ <i>AluI</i>	5'- GCT GCT CCT GAG GGC CCT TCG – 3'	58°	19
	5'- GCG GCG GCA CTT CAT GAC CCT – 3'		
GH/ <i>DdeI</i>	5'- TAG GGG AGG GTG GAA AAT GGA – 3'	59°	19
	5'- GAC ACC TAC TCA GAC AAT GCG – 3'		
STAT5A/ <i>DdeI</i>	5'-CTGCAGGGCTGTTCTGAGAG – 3' 5'-TGGTACCAGGACTGTAGCACAT – 3'	55°	19

**Tabela 2** - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *AluI* em um fragmento do gene GH (GH/*AluI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		LL	LV	VV	L	V
Angus	10	0,40	0,60	0,00	0,70	0,30
Brangus	18	0,61	0,33	0,06	0,78	0,22
½ Angus Nelore	249	0,85	0,15	0,00	0,93	0,07
Simental	12	0,50	0,42	0,08	0,71	0,29
Simbrasil	11	0,73	0,27	0,00	0,86	0,14
½ Simental Nelore	41	0,44	0,56	0,00	0,72	0,28
Canchim	30	0,87	0,13	0,00	0,93	0,07
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,67	0,28	0,06	0,81	0,19
½ Santa Gertrudes Nelore	17	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Brahman Nelore	16	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Nelore	78	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>Média</b>	500	0,82	0,18	0,01	0,91	0,09

**Tabela 3** - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *DdeI* em um fragmento do gene GH (GH/*DdeI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		+ / +	+ / -	- / -	+	-
Angus	10	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Brangus	17	0,35	0,47	0,18	0,59	0,41
½ Angus Nelore	119	0,03	0,97	0,00	0,52	0,48
Simental	12	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04
Simbrasil	11	0,09	0,73	0,18	0,45	0,55
½ Simental Nelore	24	0,04	0,92	0,04	0,50	0,50
Canchim	12	0,33	0,33	0,34	0,50	0,50
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,11	0,83	0,06	0,53	0,47
½ Santa Gertrudes Nelore	17	0,06	0,47	0,47	0,29	0,71
½ Brahman Nelore	16	0,00	0,06	0,94	0,03	0,97
Nelore	35	0,00	0,03	0,97	0,01	0,99
<b>Média</b>	291	0,14	0,63	0,23	0,45	0,50

**Tabela 4** - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *DdeI* em um fragmento do gene *STAT5A* (*STAT5A/DdeI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		CC	CT	TT	C	T
Angus	10	0,30	0,70	0,00	0,65	0,35
Brangus	18	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Angus Nelore	121	0,88	0,12	0,00	0,94	0,06
Simental	12	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Simbrasil	11	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Simental Nelore	24	0,96	0,04	0,00	0,98	0,02
Canchim	12	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,89	0,11	0,00	0,96	0,04
½ Santa Gertrudes Nelore	17	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Brahman Nelore	15	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Nelore	36	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>Média</b>	294	0,92	0,08	0,00	0,96	0,04

**Tabela 5.** Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos *GH/AluI*, *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de Crescimento					
		PI (kg)	PF (kg)	GPMD (kg/d)	AOL ultra- som (cm <sup>2</sup> )	EGS ultra- som (mm)	EGAR ultra- som (mm)
<i>GH/AluI</i> *	LL	304,63 <sup>A</sup> (238)	476,72 <sup>A</sup> (237)	1,33 <sup>A</sup> (237)	72,94 <sup>A</sup> (236)	4,64 <sup>A</sup> (236)	5,95 <sup>A</sup> (184)
	LV	303,82 <sup>A</sup> (91)	472,67 <sup>A</sup> (91)	1,29 <sup>A</sup> (91)	72,40 <sup>A</sup> (88)	4,50 <sup>A</sup> (89)	5,88 <sup>A</sup> (69)
<i>GH/DdeI</i>	+/+	306,42 <sup>A</sup> (16)	474,04 <sup>A</sup> (15)	1,26 <sup>A</sup> (15)	78,26 <sup>A</sup> (14)	4,67 <sup>A</sup> (15)	7,07 <sup>A</sup> (15)
	+/-	308,06 <sup>A</sup> (158)	472,67 <sup>A</sup> (158)	1,23 <sup>A</sup> (87)	72,33 <sup>B</sup> (156)	4,78 <sup>A</sup> (156)	6,43 <sup>A</sup> (85)
	-/-	310,83 <sup>A</sup> (18)	469,80 <sup>A</sup> (18)	1,19 <sup>A</sup> (17)	71,68 <sup>B</sup> (18)	4,84 <sup>A</sup> (18)	6,55 <sup>A</sup> (17)
<i>STAT5A/DdeI</i> **	CC	269,45 <sup>A</sup> (57)	485,97 <sup>A</sup> (57)	1,57 <sup>A</sup> (57)	72,32 <sup>A</sup> (57)	4,94 <sup>A</sup> (57)	6,19 <sup>A</sup> (57)
	CT	275,33 <sup>A</sup> (20)	482,97 <sup>A</sup> (20)	1,48 <sup>A</sup> (20)	72,71 <sup>A</sup> (20)	4,33 <sup>B</sup> (20)	5,96 <sup>A</sup> (20)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo VV do polimorfismo *GH/AluI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

\*\* O genótipo TT do polimorfismo *STAT5A/DdeI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

**Tabela 6.** Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos *GH/AluI*, *GH/DdeI* e *STAT5A/DdeI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de carcaça				Qualidade de carne		
		RC (%)	PCQ (kg)	AOL (cm <sup>2</sup> )	EGS (mm)	FC (kg)	Contra-filé (kg)	Lagarto (kg)
<i>GH/AluI</i> *	LL	55,03 <sup>A</sup> (255)	261,74 <sup>A</sup> (255)	79,76 <sup>A</sup> (105)	4,44 <sup>A</sup> (105)	3,64 <sup>A</sup> (96)	3,61 <sup>A</sup> (45)	2,38 <sup>A</sup> (101)
	LV	54,64 <sup>A</sup> (91)	257,65 <sup>A</sup> (91)	79,14 <sup>A</sup> (52)	4,52 <sup>A</sup> (51)	3,76 <sup>A</sup> (50)	3,55 <sup>A</sup> (31)	2,37 <sup>A</sup> (64)
<i>GH/DdeI</i>	+/+	55,62 <sup>A</sup> (27)	269,91 <sup>A</sup> (27)	78,02 <sup>A</sup> (17)	5,75 <sup>A</sup> (17)	3,54 <sup>A</sup> (28)	3,24 <sup>A</sup> (13)	2,31 <sup>A</sup> (13)
	+/-	55,16 <sup>A</sup> (128)	261,33 <sup>A</sup> (128)	75,56 <sup>A</sup> (73)	5,69 <sup>A</sup> (73)	3,45 <sup>A</sup> (74)	3,43 <sup>A</sup> (45)	2,30 <sup>A</sup> (45)
	-/-	55,49 <sup>A</sup> (27)	265,33 <sup>A</sup> (27)	78,23 <sup>A</sup> (17)	5,10 <sup>A</sup> (17)	3,03 <sup>A</sup> (9)	3,64 <sup>A</sup> (9)	2,44 <sup>A</sup> (9)
<i>STAT5A/DdeI</i> **	CC	55,00 <sup>A</sup> (57)	267,22 <sup>A</sup> (57)	77,28 <sup>A</sup> (38)	3,64 <sup>A</sup> (38)	3,36 <sup>A</sup> (38)	***	***
	CT	54,87 <sup>A</sup> (20)	264,94 <sup>A</sup> (20)	77,70 <sup>A</sup> (20)	3,68 <sup>A</sup> (20)	3,37 <sup>A</sup> (20)	***	***

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo VV do polimorfismo *GH/AluI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

\*\* O genótipo TT do polimorfismo *STAT5A/DdeI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

\*\*\* O número de animais amostrados foi insuficiente para analisar o efeito dos genótipos sobre estas características

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; et al.. Association of missense mutation in bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.
- BURTON, J.L. et al. A review of bovine growth hormone. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, p.167, 1994.
- CHIKUNI, K.; TERADA, F.; KAGEYAMA, S. et al. Identification of DNA sequence variants for amino acid residues 127 of bovine growth hormone using the polymerase chain reaction method. **Animal Science and Technology**, v. 62, p. 660- 666, 1991.
- CREWS, D. H & KEMP., D. J. Genetic parameter for ultrasound and carcass measures of yield and quality among replacement and slaughter beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 3008-3020, 2001.
- CURI, R. A. Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaca e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico Superprecoce. Tese (Doutorado) – UNESP/IB, março/2004, 126 p.
- DA SILVA, M.V.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E. et al. Utilização de marcadores genéticos em suínos. I. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archives Latinoamericano Produccion Animal**, v.11, p.1-10, 2003.
- DALKE, B. S., ROEDER, R. A., KASSER, T. R., et al. Dose-response effects of recombinat bovine somatotropin implants on feedlot performance in steers. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2130, 1992.
- DI STASIO, L.; SARATORE, S.; ALBERTA, A. Lack of association of GH1 and Pou1f1 gene variants with meat production traits in Piedmontese cattle. **Animal Genetics**, v. 33, p. 61-64, 2002.
- ELSASSER, T.H.; RUMSEY, T.S.; HOMMOND, A.C. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. **Journal of Animal Science**. v. 67, p.128- 141, 1989.
- FELÍCIO, P.E. Qualidade da carne Nelore e o mercado mundial. [File:///D:/palestras/pedro\\_felicio.html](File:///D:/palestras/pedro_felicio.html), 01/01/2001.



- FERRAZ, A. L. J. Identificação de polimorfismos no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte. Monografia/Graduação – FCAV – UNESP/Jaboticabal. 62 p. junho/2001.
- FERRAZ, A.L.J.; FURLAN, L.R.; FERRO, J.A. et al. Polymorphism identification in the promoter region of bovine growth hormone gene. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu/SP, p. 21, 2003.
- FLISIKOWSKI, K.; OPRZADEK, J.; DYMNICI, E. et al. New polymorphism in the bovine STAT5A gene and its association with meat production in beef cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, n.3, p.147-157, 2003.
- FURLAN, L.R., FERRO, J.A., SILVEIRA, A.C., et al. Expression of the growth hormone receptor (GHR) and insuline-like growth factor -I (IGF-I) genes in liver and skeletal muscle tissues in rbST- treated young bulls. **Biotechnology Agronomy Social Environment**, v.2, p.20, 1998.
- GEARY, T.W.; MACFADIN, E.L.; MACNEIL, M.D. et al. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1-8, 2003.
- GOODMAN, H.M. Growth hormone and metabolism. Ed. Academic Press, Inc. **In: The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates**, p. 93-115, 1993.
- GROCHOWSKA, R.; SORENSEN, P.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 470-476, 2001.
- GROCHOWSKA, R.; ZWIERZCHOWSKI, L.; SNOCHOWSKI, M. et al. Stimulated growth hormone (GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, p. 171-180, 1999.
- HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K. et al. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 2216-2226, 1992.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Site: [www.ibge.org.br](http://www.ibge.org.br), 01/01/2002.

- KEMENES, P.A.; REGITANO, L.C.A.; ROSA, A.J.M. et al. K-casein,  $\beta$ -lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzerá, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis Cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 539-541, 1999.
- KOOHMARAIE, M. et al. Managing meat tenderness. **Anais da 40° Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2003 (CD room).
- LIMA, S.P.G. Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino (bGH) em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. Dissertação – FCAV – UNESP/Jaboticabal. 46 p. 2003.
- LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. 134 p.
- LUCY, M.H.; HAUSER, S.D.; EPPARD, P.J. et al. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. **Journal of Dairy Science**, 74 (1): 284, 1993.
- MOSELEY, W.M.; PAULISSEN, J.B.; GOODWIN, M.C.; et al. Recombinant bovine somatotropin improves growth performance in finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 412, 1992.
- NRC. Nutrient Requirement of Beef Cattle. **National Academy Press**. Washington, DC. 1996.
- OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al. Polymorphisms at *loci* of Leptina (LEP), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black-and-white bulls. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, n.3, p.135-145, 2003.
- OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factor that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**. v.71, p. 3138- 3150, 1993.
- PARMENTIER, L.; PORTELLE, D.; GENGLER, N. et al. Candidate genes markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 139-148, 1999.
- REGITANO, L. C. A.; AZEVEDO, J. L.; VENCOVSKY, R. et al. Selection for breed specific growth hormone and IGF-I alleles in a synthetic beef cattle cross, Canchim. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 531-537, 1999.

- REGITANO, L.C.A.; VASCONCELLOS, L.P.M.K.; JACINTO, E. et al. Genetic distances among Aberdeen Angus, Canchim, Caracu, Nellore and Simmental beef cattle breeds **Proceedings of 5° Global Conference On Conservation Of Domestic Animal Genetic Resources**, Brasília/DF- Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 2000 (CD-room).
- RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 351-360, 2002.
- RODRIGUES, C.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; NETO, E.D. et al. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the bovine growth hormone gene. **Animal Genetics**, v. 29, p. 65-66, 1998.
- ROSA, A.J.M.; REGITANO, L.C.A.; MERZEL, M. et al. Polymorphism of growth hormone, microsatellite IGF-1 and association with feedlot performance in Nellore cattle. **Anais do 42° Congresso Brasileiro de Genética**, p.298, 1996.
- SARTORE S. & DI STASIO L. Analisi genetica del locus GH (ormone della crescita) nella razza bovina Piemontese. **Proceedings of 54th Convegno Societa Italiana Delle Scienze Veterinarie (LIV)**. p. 411- 412, 2000.
- SAS. Statistical Analysis System, Systems for windows. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC, 1999.
- SCHLEE, P.; GRAMI, R.; SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; ROTTMANN, R.; OLBRICH-BLUDAU, A.; PIRCHNER, F. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994a.
- SCHLEE, P.; GRAML, R.; ROTTMANN, O. et al. Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. v.111, p. 253-256, 1994b.
- SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford x Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.
- SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford x Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.

- SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.D.B.; CHARDULO, L.A.L. et al. Sistema de produção de novilhos superprecoces. **Anais do 1º Simpósio Goiano Sobre Produção De Bovinos De Corte**, Goiânia/GO - CBNA, 1999. p.105-122.
- SILVEIRA, L.G.G. Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (GH) como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos de corte. 2002. 50p. Dissertação (Mestrado) – FMVZ, UNESP, Botucatu.
- SWITONSKI, M. Molecular genetics in beef cattle breeding – a review. **Animal Science Papers and Reports**. v. 20, p. 7-18, 2002.
- TAMBASCO, D.D.; PAZ, C.C.P.; TAMBASCO-STUDART, M. D. et al. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. **Journal of Animal Breeding**, v.120, p.51 - 56, 2003.
- TAYLOR, J.F.; COUTINHO, L.L.; HERRING, K. L. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 24, p. 194-201, 1998.
- THUE, T. D.; SCHMUTZ, L. Localization of somatostatin to bovine chromosome 1q23-q25 by in situ hybridization. **Proceedings of 5º World Congress On Genetics Applied To Livestock Production**, Guelph: University of Guelph, Deptº Animal and Poultry Science, 1994. v. 21, p. 60- 62.
- VASCONCELLOS, L.P.M.K.; TAMBASCO, D. D.; PEREIRA, A.P. et al. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.2, p.133 - 137, 2003.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sinauer Associates: Massachusetts, 1990. 377p.
- YAO, J.; AGREY, S.E.; ZADWORNYY, D. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics**, v.144, p.1809-1816, 1996.

## CAPÍTULO 4

### ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DO GH E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE

#### RESUMO

Considerando a importância do efeito do Receptor do gene do Hormônio do Crescimento no metabolismo animal, buscou-se estudar os polimorfismos GHR<sub>m</sub>, GHR/*StuI* e GHR/*AluI*, por STR e PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com índices de crescimento, carcaça e carne de 500 bovinos de corte (251 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 3/8 Nelore x 5/8 Angus, 40 Simental x Nelore, 12 Simental, 11 3/8 Nelore e 5/8 Simental, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 29 3/8 Nelore e 5/8 Charolês, 16 Brahman x Nelore e 78 Nelore), submetidos a sistema intensivo de produção. O efeito dos genótipos sobre as características avaliadas foi analisado utilizando-se o procedimento GLM (SAS) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo incluiu além do efeito do genótipo, grupo genético x ano x fazenda de origem do animal e interações. Os resultados demonstraram que a única característica afetada pelo GHR<sub>m</sub> foi a maciez, cujos animais LS apresentavam carne mais macia que os animais SS (P<0,01), enquanto o polimorfismo GHR/*AluI* não afetou nenhuma das características estudadas. Porém, o polimorfismo GHR/*StuI* afetou importantes características de crescimento e carcaça (P<0,01).

**Palavras chave:** bovinos de corte, carcaça, crescimento, gene candidato, receptor.

## INTRODUÇÃO

Os hormônios envolvidos na regulação das reações metabólicas, diretamente através do controle das reações enzimáticas, ou indiretamente mediante regulação da expressão gênica, assumem especial importância no crescimento animal (FERRAZ, 2001). Assim, sabe-se que animais com terminação de carcaça precoce apresentam perfil metabólico hormonal diferenciado daqueles apresentados por animais com maior crescimento de massa muscular (ELSASSER et al., 1989), sendo a responsabilidade por estas diferenças atribuídas ao papel dos hormônios do eixo-somatotrófico nas diversas fases do crescimento animal (OWENS et al., 1993). Tem-se então que o eixo-somatotrófico, essencialmente constituído pelo hormônio de crescimento (GH), fatores de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II), suas proteínas carregadoras associadas e seus receptores (GHR, IGF-IR e IGF-IIR), apresenta papel chave na regulação do metabolismo e fisiologia do crescimento em mamíferos (PARMENTIER et al., 1999).

O GH, isolado pela primeira vez em 1944, é um hormônio protéico sintetizado pela adenohipófise, que pertence à mesma família dos hormônios prolactina e lactogênio placentário. Este possui cadeia polipeptídica simples, com 190 ou 191 aminoácidos, dependendo da presença de uma alanina ou uma fenilalanina na posição aminoterminal, respectivamente (LIMA, 2003), de peso molecular de 21,819 kDa e duas pontes dissulfeto. Sua estrutura é composta por 4 cadeias  $\alpha$  hélices, antiparalelas que sofrem rotação à esquerda, sendo as duas primeiras voltadas para cima e outras duas voltadas para baixo (WELL & VOS, 1993). Este hormônio é liberado por exocitose dos somatotrófos da adenohipófise mediante uma série de estímulos fisiológicos (FERRAZ, 2001; SILVEIRA, 2002), envolvendo ações do Fator Liberador de GH (GHRH) e da Somatostatina (SRIF), além das flutuações nas concentrações sanguíneas de glucagon, insulina, IGF-I e II, hormônios estrogênicos e do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (ENRIGHT et al., 1993). Assim, a identificação de variações nos hormônios do eixo somatotrófico, muito relacionados com o potencial produtivo de bovinos de corte, pode levar a mecanismos auxiliares para seleção dos bovinos (CURI, 2004).

O passo inicial da ação de um hormônio peptídico é sua ligação com os receptores nos tecidos alvo. Os receptores do GH têm sido encontrados em vários

tecidos incluindo hepatócitos, adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos, células  $\beta$  do pâncreas e osteoblastos (FERRAZ, 2001). Desta forma, assim como o GH, o seu receptor (GHR) tem um papel chave na regulação do crescimento pós-natal. O GHR consiste de 9 exons e está associado ao cromossomo 20. O GHR é uma proteína de 620 aminoácidos que compreende um domínio extra-celular de ligação ao GH com 246 aminoácidos, uma região trans-membrana simples de 24 aminoácidos e um comprido domínio citoplasmático (PARMENTIER et al., 1999). Sabe-se que mutações no gene do receptor do GH causam, freqüentemente, retardamento do crescimento em humanos, caracterizado por uma resistência ou insensibilidade ao GH (GE et al., 2003). Recentes estudos associaram polimorfismos, gerados pela enzima de restrição *AluI*, na região do gene receptor do GH (GHR) com características de produção de leite em gado Holandês (AGGREY et al., 1999) e com características de desempenho em bovinos de corte (CURI et al., 2003; CURI, 2004).

Todos os genes de mamíferos possuem uma região anterior ao seu 1° exon, denominada região do promotor, na qual se fixam as RNA polimerases para dar início à transcrição do gene. Nesta região, também se encontram sítios de ligação de proteínas que são responsáveis pelo controle da velocidade e pelo estímulo ou impedimento da transcrição (WATSON et al., 1997). A ocorrência de um microsatélite polimórfico, localizado na região promotora P1 do gene do receptor de GH (GHRm), contribui para a complexidade de sua expressão (LUCY et al., 1998). Este polimorfismo está localizado a 90 e 64 pares de bases *upstream* do códon de iniciação, e da seqüência TATA do gene GHR. Em rebanhos *Bos indicus* é mais freqüente o alelo curto (S) com 11 repetições TG consecutivas enquanto que, em rebanhos *Bos taurus* predominam os alelos longos (L) com 16 à 20 repetições TG consecutivas (LUCY et al., 1998; HALE et al., 2000). Resultados demonstrando efeito negativo do alelo S sobre o peso à desmama e o peso de carcaça, sugerem que o comprimento do microsatélite GHRm pode afetar diretamente a transcrição gênica, em bovinos da raça Angus (HALE et al., 2000). Há, ainda, mais estudos envolvendo outros polimorfismos do GHR e características de produção de bovinos (MOODY et al., 1995; PARMENTIER et al., 1999). O polimorfismo GHR/*StuI* (AGGREY et al., 1999), é uma alteração de ponto localizada entre as posições -1053 e + 63 na região reguladora do gene GHR, e foi avaliado em bovinos da raça Holandesa. O polimorfismo GHR/*AluI* demonstrado por MOODY et al.

(1995), também se encontra em uma região regulatória do GHR e foi estudado em diversas raças de bovinos de corte.

Apesar dos recentes avanços na área de biologia molecular, trabalhos sobre a identificação de polimorfismos no gene do GHR e suas relações com às características produtivas do gado de corte ainda são considerados escassos na literatura. Há uma demanda crescente por estudos aprofundados sobre a base genética dos polimorfismos e sua associação com características fenotípicas de modo a possibilitar sua aplicação na seleção de vários grupos genéticos de diferentes padrões de crescimento.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo de três polimorfismos na seqüência do DNA do gene do Receptor do GH (GHRm, RGH/*StuI* e RGH/*AluI*), e suas associações com importantes indicadores de crescimento, qualidade da carcaça e carne de 500 bovinos de corte, de diversos grupos genéticos, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.



## MATERIAL E MÉTODOS

### **Animais.**

O projeto foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, ambos da UNESP/Botucatu-SP.

Para a análise experimental foram colhidas amostras de sangue de 500 animais dos seguintes grupos genéticos: 250 animais Angus x Nelore, 10 Angus puro, 18 Brangus (3/8 Nelore x 5/8 Angus), 41 Simental x Nelore, 12 Simental puro, 11 Simbrasil (3/8 Nelore x 5/8 Simental), 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 29 Canchim (3/8 Nelore x 5/8 Charolês), 16 Brahman x Nelore e 78 animais Nelore puro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os bezerros foram desmamados aos 210 dias de idade em sistema *creep-feeding*. No início do experimento, todos os animais foram identificados individualmente, tratados contra endo e ectoparasitas e distribuídos aos currais de confinamento, com cinco animais cada, de acordo com o grupo genético e tamanho, sendo alimentados com dietas formuladas segundo as normas do NRC (1996), para ganhos de pesos médios diários acima de 1,2 kg. Os dados de três anos de confinamento experimental foram utilizados, e embora houvesse diferenças entre o tempo de confinamento por grupo genético e por ano avaliado, em média, todos os animais amostrados foram abatidos após 120 dias.

Os animais foram pesados no início do confinamento (**PI**) e próximo ao abate (**PF**). O ganho de peso médio diário (**GPMD**) foi calculado pela média de ganho de peso entre todas as pesagens. As medidas de área de olho de lombo, ou seja, área do músculo *Longissimus dorsi* (**AOL**), cobertura de gordura subcutânea sobre a AOL (**EGS**) e cobertura de gordura subcutânea sobre a garupa (**EGAR**) foram avaliadas por ultra-sonografia, conforme o método de HERRING et al. (1992), utilizando um aparelho de ultra-sonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02), na ocasião da última pesagem. As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

O critério de abate utilizado foi peso final mínimo de 450 kg e EGS mínima de 3 milímetros (mm), monitorado por ultra-sonografia para todos os grupos genéticos. No momento do abate foram medidos o peso da carcaça quente (**PCQ**). Após o abate, as carcaças foram identificadas, pesadas e resfriadas por 24 horas. Foram determinados os pesos dos cortes Contra-filé (**Contra-filé**) e Lagarto (**Lagarto**), durante a desossa, como indicativos dos cortes cárneos comerciais da carcaça. No entanto, o peso do Corte Contra-filé compreendeu somente a porção entre a 6<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> costela.

Foram coletadas, após o resfriamento, amostras da seção da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para a obtenção da medida de área de olho-de-lombo (**AOL**) e gordura de cobertura (**EGS**) na carcaça, força de cisalhamento (**FC**), como medida objetiva da maciez da carne, e perdas por cozimento. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, onde as peças permaneceram armazenadas sob resfriamento de - 5° C, sendo a AOL obtida através da utilização da régua de quadrantes de pontos (LUCHIARI FILHO, 2000), e a EGS através de mensuração com paquímetro. Foram realizadas análises laboratoriais para a determinação da maciez e das perdas por cozimento no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, segundo metodologia proposta por SHACKELFORD et. al. (1991).

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para analisar os polimorfismos genéticos, sendo o DNA extraído do sangue através do *kit* de extração *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (AMERSHAM PHARMACIA). A presença de marcadores moleculares no DNA genômico foi analisada no gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (**GHR**), no microssatélite da região promotora P1 do gene do receptor do GH (GHRm), segundo metodologia de LUCY et al (1998), no sítio de restrição da enzima *StuI* (RGH/*StuI*), segundo metodologia de AGGREY et al. (1999), e no sítio de restrição da enzima *AluI* (RGH/*AluI*), segundo metodologia de MOODY et al. (1995). Os *primers* necessários para a amplificação das regiões de interesse, bem como a enzima de restrição necessária para a digestão dos fragmentos amplificados para o gene do GHR, foram determinados com base na literatura.

#### **Extração do DNA e genotipagem.**

Amostras de 5 ml de sangue total foram colhidas por flebocentese da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos a vácuo, contendo 7,5 mg de EDTA.

A extração do DNA genômico utilizando-se o *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) foi feita a partir de uma alíquota de 300 µL de sangue total. A quantidade e a integridade das moléculas de DNA foram avaliadas em gel de agarose a 0,8%.

A genotipagem dos animais foi feita pelas técnicas de STR e PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose (2%), no gene do Receptor do GH (**GHR**). Os polimorfismos estudados, o cromossomos de localização do gene, os *primers* e as temperaturas de anelamento necessárias à amplificação das regiões de interesse, estão apresentados na Tabela 7.

Para a identificação do polimorfismo do microssatélite na região promotora P1 do gene do receptor do GH (GHRm), a determinação dos alelos S (curto) e L (longo) varia, em função do número de elementos repetitivos, entre 94 e 112 pares de bases. O alelo S apresenta 11 repetições TG consecutivas e fragmento amplificado de 94 pares de bases. O alelo L apresenta 16 a 20 repetições TG consecutivas e fragmentos amplificados de 104, 106, 108, 110 e 112 pares de bases.

Para a identificação dos alelos + e - do gene do GHR/*StuI*, um segmento de 1119 pares de bases desse gene foi amplificado pela técnica de PCR, e em seguida digerido com a enzima de restrição *StuI*. O alelo + foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 824 e 295 pares de bases. O alelo - indica a não digestão do fragmento amplificado, e foi caracterizado como um fragmento de 1119 pares de bases.

Para a identificação do polimorfismo GHR/*AluI*, um fragmento de 1945 bp foi amplificado, e posteriormente digerido pela enzima de restrição *AluI*, resultando na formação de 2 alelos A e B. Os animais homozigotos para o alelo A não apresentam corte pela enzima de restrição mostrando 3 bandas, 785 bp, 670 bp e 375 bp. Os homozigotos BB apresentam bandas de 785 bp, 475 bp, 375 bp e 195 bp (com corte). Os animais heterozigotos AB apresentam bandas de 785 bp, 670 bp, 475 bp, 375 bp e 195 bp.

Cada PCR foi feita em um volume final de 25 µL e a mistura para amplificação foi constituída de: 50 ng de DNA genômico; 0,20 µM de cada *primer*; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase. As amplificações consistiram de 5 passos: (1) desnaturação inicial da

fitas duplas à 94°C por 4 minutos; (2) desnaturação à 94°C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* entre 54 e 66°C, dependendo da constituição dos mesmos, por 45 segundos; (4) extensão à 72°C por 1 minuto e (5) extensão final à 72°C por 4 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituem um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10µL de produto de PCR e 3U de enzima de restrição. As misturas para digestão foram incubadas em termociclador à 37°C por 4 horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose à 2%, em um sistema de eletroforese horizontal. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. Esses fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A documentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi feita utilizando-se um sistema digital de fotodocumentação. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pb.

### **Análise Estatística.**

A partir dos genótipos identificados nos géis foram calculadas, de acordo com WEIR (1990), as frequências genótípicas e alélicas para cada um dos polimorfismos.

Nos estudos de associação, as características de interesse foram analisadas utilizando-se o procedimento GLM (*General Linear Model*) do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1987) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas incluiu além do efeito do genótipo, o efeito de grupo contemporâneo que considerou a interação entre grupos genéticos (1,...,4), ano de confinamento (1,...,3) e fazendas de origem (1,...,6), como segue:  $Y_{ijk} = \mu + G_i + GC_j + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  = característica de produção,  $\mu$  = média geral,  $G_i$  = efeito fixo do  $i$ ésimo genótipo,  $GC_j$  = efeito fixo do  $j$ ésimo grupo contemporâneo, e  $e_{ijk}$  = erro aleatório.

Foram excluídos das análises grupos genéticos que apresentaram genótipo único e genótipos cujas frequências foram muito baixas (menor que 0,10) na amostra total de animais estudados, como foi o caso do genótipo +/+ do polimorfismo GHR/*StuI* do gene

do receptor do GH na população estudada. Também foram eliminados das análises dados de animais cujos genótipos apresentavam frequência muito baixa dentro do grupo genético.

O efeito de touro não foi incluído no modelo linear uma vez que o número de animais genotipados filhos dos mesmos touros era muito pequeno (em média 8,5). Em razão desse grande número de pais, a possibilidade de confundimento entre efeito de genótipo e de touro nas características estudadas fica diminuída.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim como o GH, o seu receptor (GHR) tem um papel chave na regulação do crescimento pós-natal. A partir dos alelos e genótipos identificados nos géis foram calculadas frequências alélicas e genótípicas para os marcadores no gene do GHR, sendo os polimorfismos GHRm, GHR/*StuI* e GHR/*AluI* descritos nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

O polimorfismo do microssatélite da região promotora P1 do gene do receptor do GH classifica os animais em homozigotos para o alelo longo (LL), homozigotos para o alelo curto (SS) e heterozigotos (LS). Todos os grupos genéticos estudados, com exceção da raça Angus, apresentaram polimorfismo GHRm (Tabela 8). Na amostra considerada, a raça europeia de origem britânica Angus apresentou o alelo longo fixado, com 100% de frequência de indivíduos LL. Outros estudos na literatura confirmam a alta frequência deste alelo (HALE et al., 2000). Também LUCY et al. (1998), mostram que os alelos longos (L), predominam em rebanhos *Bos taurus*, enquanto a frequência do alelo curto (S), é maior em rebanhos *Bos indicus*. Concordando com estes resultados, os animais zebuínos (Nelore e ½ Brahman Nelore) apresentaram maior quantidade de indivíduos SS na população estudada (frequência genotípica de 0,83 e 0,94, respectivamente), sugerindo ser o alelo S (curto), favorecido no tipo de seleção a qual os animais *Bos indicus* foram submetidos. Resultados semelhantes a este já foram demonstrados em outras pesquisas (LUCY et al., 1998; HALE et al., 2000). Conforme esperado, animais das raças compostas (Simbrasil, Canchim e Brangus) apresentaram frequências alélicas intermediárias, enquanto os animais resultantes de cruzamentos apresentaram alta frequência de heterozigotos. A exceção, novamente, foram os animais ½ Pardo Suíço Nelore que apresentaram maior frequência de LL (Tabela 8).

O polimorfismo do sítio de restrição GHR/*StuI* apresentou distribuição particular (Tabela 9). Exceto nos grupos genéticos em que o alelo + estava fixado (Brangus, Nelore e ½ Santa Gertrudes Nelore), a frequência de heterozigotos era maior do que a esperada. As frequências alélicas obtidas no estudo de AGGREY et al. (1999), avaliando touros da raça Holandesa, foram de 0,07-0,14 para o alelo - e de 0,86-0,93 para o alelo +, sem, no entanto, detectar o genótipo -/-, que levou à especulação, por parte dos autores, que este genótipo pudesse ser deletério. Os resultados encontrados no

presente trabalho sugerem que, especialmente nas raças Angus, Simental e Simbrasil, onde a frequência dos alelos é intermediária e a frequência genotípica aponta quase exclusivamente animais heterozigotos (Tabela 9), dificilmente os animais genotipados poderiam ser considerados uma amostra aleatória dos rebanhos de origem, a menos que uma situação muito particular de acasalamentos com relação a este locus ocorresse nos rebanhos de origem, ou ainda, que os homozigotos fossem deletérios. Contudo, parece mais plausível supor que os animais selecionados para o confinamento fossem preferencialmente heterozigotos. Diferentemente do observado no trabalho de AGGREY et al (1999), os grupos genéticos: ½ Angus Nelore, Canchim e ½ Pardo-Suíço Nelore apresentaram indivíduos de genótipos -/- (Tabela 9).

Ao analisar o polimorfismo GHR/*AluI*, mostrado na Tabela 10, ficou evidenciado que o alelo A estava fixado para a raça Angus, o que corrobora o postulado por MOODY et al., (1995), a respeito da fixação deste alelo nas raças Angus, Hereford, Gelbvieh e Holandês. Todos os grupamentos genéticos, com exceção dos animais Nelore, ½ Brahman Nelore, Simbrasil e ½ Pardo-suíço Nelore, apresentaram frequências alélicas superiores para o alelo A. MOODY et al. (1995), encontraram os alelos A e B segregando em zebuínos, o que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho. Assim, explicam-se as frequências similares dos alelos A e B nas populações de Nelore e ½ Brahman Nelore (Tabela 10). No entanto, a frequência obtida para animais descendentes de zebu foi de 0,58 para o alelo A e 0,42 para o alelo B (MOODY et al., 1995), valor este bastante diferente da presente pesquisa (0,33 e 0,67, respectivamente para alelo A e B de animais Nelore). O cruzamento da raça Pardo-suíço e Nelore revelou frequência genotípica AB muito alta, o que não seria esperado supondo-se que no Nelore os dois alelos estão presentes na população (Tabela 10). Para os polimorfismos GHR/*StuI* e GHR/*AluI* foram avaliados somente 300 bovinos de corte (126 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 Brangus, 24 Simental x Nelore, 12 Simental, 11 Simbrasil, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore). Entretanto, ao final do trabalho conseguiu-se resultados de genotipagem de 225 animais para o polimorfismo GH/*StuI* (Tabela 9), e de 276 animais para o polimorfismo GHR/*AluI* (Tabela 10), devido à falhas ocorridas na amplificação do DNA. As comparações entre as médias dos quadrados mínimos das variáveis quantitativas de crescimento, carcaça e qualidade de

carne para os genótipos dos polimorfismos GHRm, GHR/*StuI* e GHR/*AluI* são apresentados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

O GHRm não apresentou nenhuma associação significativa com as características de crescimento da população estudada (Tabela 11). Mesmo sabendo que o polimorfismo do comprimento do microssatélite pode afetar à taxa de transcrição e é importante fonte de variação da característica quantitativa (HALE et al, 2000), as diferenças entre os tamanhos dos alelos (longo ou curto) não influenciaram nas características de crescimento dos animais deste estudo. No trabalho de HALE et al. (2000), somente a presença do alelo S (curto) em animais da raça Angus foi responsável por importantes diferenças no crescimento, incidindo em diferenças médias de até 17 kg a desmama e 23 kg ao abate.

O polimorfismo GHR/*StuI* primeiramente foi associado às características de produção de gordura e de proteína no leite de animais da raça Holandesa (AGGREY et al., 1999), cujo genótipo alelo + parecia ser o alelo favorável. No entanto, ao avaliar o efeito deste polimorfismo GHR/*StuI* nas características de crescimento dos bovinos de corte deste estudo (Tabela 11), ficou constatado efeito significativo do genótipo sobre o ganho de peso médio diário (GPMD) e peso final (PF), sendo que os homozigotos -/- apresentavam valores cerca de 8% maiores que os indivíduos heterozigotos +/- ( $P < 0,01$ ). Ao longo de um confinamento de 168 dias, este valor representaria 15 kg a mais por animal, valor este superior aos 6,5 kg encontrados para um polimorfismo no gene do GH (LIMA, 2003). Com relação ao polimorfismo GHR/*AluI*, verificou-se que o mesmo não apresentou efeito significativo com as características mais importantes do crescimento de bovinos (Tabela 11).

Ao se avaliar às principais características de carcaça (Tabela 12), o polimorfismo GHRm também não apresentou associações significativas com as características de carcaça dos animais, o que corrobora parcialmente o estudo de HALE et al. (2000), que apesar de ter encontrado efeito negativo do alelo S (curto) sobre o peso à desmama e peso da carcaça, não demonstrou nenhuma influência deste polimorfismo sobre AOL e EGS da carcaça dos bovinos. Embora os resultados do presente trabalho mostrem que o alelo S não está fixado nos animais de origem zebuína, conforme havia sido sugerido por LUCY et al. (1998), pode-se inferir a ausência do efeito deste polimorfismo à falta de um número expressivo de animais com genótipos diferentes dentro da mesma raça.



Da mesma forma que o observado por CURI et al. (2003), não foram demonstradas associações significativas entre os genótipos do polimorfismo GHRm, e o GPMD, RC, AOL e EGS, em bovinos deste trabalho (Tabelas 11 e 12).

Entretanto o polimorfismo do GHR/*StuI* demonstrou haver relação significativa com o PCQ e o RC dos animais ( $P < 0,01$ ), cujos genótipos homozigotos -/- tinham maiores valores destas características que os indivíduos heterozigotos +/- (Tabela 12). Estas associações estão de acordo com as características de crescimento, sugerindo que o alelo - em homozigose promove maior desenvolvimento muscular nos animais, já que o GPMD e o PF foram também influenciados positivamente por este genótipo (Tabela 11). Pode-se então especular que os diferentes tipos de melhoramento genético das raças é que possibilitaram a constatação, por AGGREY et al. (1999), de que o genótipo -/- era raro ou deletério, já que um maior desenvolvimento muscular não é característica de interesse para bovinos de leite da raça Holandesa. Em relação ao polimorfismo GHR/*AluI* foi verificado que este, assim como o GHRm, não demonstrou nenhuma relação significativa entre seus respectivos genótipos e as variáveis analisadas.

Segundo KOOHMARAIE et al. (2003), a maciez é a característica mais importante da qualidade da carne. Uma medida objetiva de maciez pode ser obtida pela mensuração da força necessária para rompimento das fibras musculares em uma amostra de *Longissimus dorsi* de 12,7 mm de diâmetro, chamada de força de cisalhamento (FC) (SHACKELFORD et al., 1991). Assim, quanto maior o valor de FC encontrado (Tabela 12), menos macia é a carne e vice-versa. Neste trabalho, não houve associação significativa dos genótipos dos polimorfismos estudados GHR/*StuI* e GHR/*AluI* com a maciez da carne ( $P < 0,01$ ). No entanto, ao se avaliar o polimorfismo GHRm percebe-se que este influenciou na FC da carne (Tabela 12), cujos animais SS produziram carne menos macia que os animais LS. Sabe-se que diferenças de atuação do complexo enzimático calpaína-calpastatina são as principais responsáveis pela menor maciez encontrada na carne zebuína, quando comparada aos valores de maciez obtidos com taurinos (KOOHMARAIE et al., 2003). Como o tamanho curto do microssatélite (S) é característico e mais freqüente em animais de origem zebuína, corrobora-se esta afirmação. Apesar disto, todos os valores de força de cisalhamento encontrados neste experimento são considerados provenientes de carnes muito macias e adequadas ao consumo humano ( $< 3,9$  kg) (FELÍCIO, 2001). Os polimorfismos GHRm, assim como o

RGH/*StuI* e RGH/*AluI*, não demonstraram associação significativa com os pesos dos cortes cárneos comerciais da carcaça, tal como Contra-filé e Lagarto (Tabela 12).

Os resultados até hoje encontrados na literatura não são conclusivos em indicar que os polimorfismos do GHR sejam ou não associados com características economicamente importantes de bovinos de corte. Vários trabalhos indicam esta associação e vários outros, mesmo realizados com as mesmas raças, não as indicam. Desta forma salienta-se a afirmação de que os efeitos encontrados em trabalhos que estudaram estes polimorfismos anteriormente podem ser atribuídos à ligações transitórias com QTL's (CURI, 2004). Assim, tem-se que em relação ao gene do GHR há ainda um vasto campo de estudos com a descoberta de novos marcadores estreitamente ligados a esses QTLs (RODRIGUES et al., 1998; FERRAZ et al., 2003), o que demonstra que a simples utilização de polimorfismos neste gene em programas de seleção de bovinos de corte pode parecer, até agora, um tanto prematura.

Estudos recentes alertam para a formação de haplótipos no gene do GH, dado à proximidade de sítios de restrição de certas enzimas que possibilitam forte ligação entre os genótipos (SILVEIRA, 2002). Neste trabalho, a pouca efetividade dos polimorfismos GHRm e RGH/*AluI*, quando analisados separadamente, em quaisquer das características envolvidas, fortalece a suspeita da formação de haplótipos entre estes dois marcadores moleculares, conforme sugerido anteriormente por MOODY et al. (1995), e sugere novas metodologias de análise. Desta forma, ambos polimorfismos podem ser analisados conjuntamente para serem associados com os índices mais importantes de produção de bovinos.

## **CONCLUSÕES**

Apesar do polimorfismo GHR<sub>m</sub> ter demonstrado associação com a maciez da carne de bovinos de corte e o polimorfismo GHR/*StuI* ter sido associado as características de crescimento e carcaça de bovinos de corte, a utilização de marcadores no gene do GHR para seleção de bovinos de corte ainda é prematura.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa e concessão de bolsa de estudos a autora Liliane Sugisawa.

**Tabela 7** – Polimorfismos estudados, seqüência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos *primers* (TA) e localização cromossômica do gene (Cr).

Polimorfismo	Seqüência dos <i>primers</i> 5'→3'	TA °C	Cr
GHRm	5'- GTG CTC TAA TCT TTT CTG GTA CCA GG – 3' 5'- CCT CCC CAA ATC AAT TAC ATT TTG TC – 3'	62°	20
GHR/ <i>StuI</i>	5'- ATG CCC AGC AGT GGG GTT GCT – 3' 5'- GGC AAA CAG TGC GGG GTT GGA – 3'	66°	20
GHR/ <i>AluI</i>	5'-CAGATGAACCCATCTGCATGT – 3' 5'-AATGTCACTGCTAGCCCAAGT – 3'	55°	20

**Tabela 8** - Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pelo microssatélite na região promotora P1 em um fragmento do gene GHR (GHRm).

Grupo Genético	N	Freqüência Genotípica			Freqüência Alélica	
		LL	LS	SS	L	S
Angus	10	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Brangus	18	0,61	0,39	0,00	0,81	0,19
½ Angus Nelore	249	0,05	0,90	0,05	0,50	0,50
Simental	12	0,75	0,08	0,17	0,79	0,21
Simbrasil	11	0,27	0,36	0,36	0,45	0,55
½ Simental Nelore	41	0,05	0,95	0,00	0,52	0,48
Canchim	30	0,10	0,73	0,17	0,47	0,53
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,78	0,22	0,00	0,89	0,11
½ Santa Gertrudes Nelore	17	0,12	0,59	0,29	0,41	0,59
½ Brahman Nelore	16	0,00	0,06	0,94	0,03	0,97
Nelore	78	0,00	0,17	0,83	0,08	0,92
<b>Média</b>	500	0,13	0,62	0,22	0,46	0,54

**Tabela 9** - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *StuI* em um fragmento do gene do GHR (*GHR/StuI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		+/+	+/-	-/-	+	-
Angus	9	0,11	0,89	0,00	0,56	0,44
Brangus	13	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Angus Nelore	112	0,04	0,87	0,09	0,47	0,53
Simental	12	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Simbrasil	11	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
½ Simental Nelore	22	0,05	0,95	0,00	0,53	0,47
Canchim	12	0,08	0,67	0,25	0,42	0,58
½ Pardo Suíço Nelore	17	0,00	0,76	0,24	0,38	0,62
½ Santa Gertrudes Nelore	12	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
½ Brahman Nelore	1	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
Nelore	4	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
<b>Média</b>	225	0,24	0,76	0,08	0,54	0,46

**Tabela 10** - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *AluI* em um fragmento do gene do GHR (*GHR/AluI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		AA	AB	BB	A	B
Angus	9	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00
Brangus	18	0,67	0,28	0,06	0,81	0,19
½ Angus Nelore	120	0,24	0,75	0,01	0,62	0,38
Simental	10	0,90	0,00	0,10	0,90	0,10
Simbrasil	10	0,20	0,60	0,20	0,50	0,50
½ Simental Nelore	23	0,26	0,74	0,00	0,63	0,27
Canchim	6	0,50	0,50	0,00	0,75	0,25
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
½ Santa Gertrudes Nelore	15	0,47	0,40	0,13	0,67	0,33
½ Brahman Nelore	12	0,25	0,58	0,17	0,54	0,46
Nelore	35	0,14	0,37	0,49	0,33	0,67
<b>Média</b>	276	0,31	0,60	0,09	0,61	0,39

**Tabela 11.** Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos GHRm, GHR/*StuI* e GHR/*AluI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de Crescimento					
		PI (kg)	PF (kg)	GPMD (kg/d)	AOL ultra-som (cm <sup>2</sup> )	EGS ultra-som (mm)	EGAR ultra-som (mm)
GHRm	LL	305,40 <sup>A</sup> (40)	468,71 <sup>A</sup> (39)	1,27 <sup>A</sup> (38)	71,83 <sup>A</sup> (38)	4,30 <sup>A</sup> (39)	6,29 <sup>A</sup> (38)
	LS	307,76 <sup>A</sup> (317)	472,68 <sup>A</sup> (317)	1,27 <sup>A</sup> (288)	72,60 <sup>A</sup> (315)	4,80 <sup>A</sup> (315)	6,22 <sup>A</sup> (223)
	SS	303,84 <sup>A</sup> (69)	471,08 <sup>A</sup> (69)	1,27 <sup>A</sup> (69)	71,76 <sup>A</sup> (67)	4,59 <sup>A</sup> (67)	6,08 <sup>A</sup> (61)
GHR/ <i>StuI</i> *	+/-	308,50 <sup>A</sup> (48)	459,61 <sup>B</sup> (48)	1,18 <sup>B</sup> (48)	72,92 <sup>A</sup> (47)	4,16 <sup>A</sup> (48)	5,57 <sup>A</sup> (28)
	-/-	316,90 <sup>A</sup> (24)	477,52 <sup>A</sup> (24)	1,27 <sup>A</sup> (24)	73,44 <sup>A</sup> (23)	4,58 <sup>A</sup> (23)	5,88 <sup>A</sup> (10)
GHR/ <i>AluI</i>	AA	304,71 <sup>A</sup> (66)	468,27 <sup>A</sup> (66)	1,23 <sup>A</sup> (66)	71,55 <sup>A</sup> (66)	4,80 <sup>A</sup> (66)	6,14 <sup>A</sup> (57)
	AB	309,53 <sup>A</sup> (148)	476,46 <sup>A</sup> (148)	1,24 <sup>A</sup> (148)	73,28 <sup>A</sup> (147)	4,90 <sup>A</sup> (147)	6,35 <sup>A</sup> (120)
	BB	307,78 <sup>A</sup> (23)	479,66 <sup>A</sup> (23)	1,27 <sup>A</sup> (23)	72,05 <sup>A</sup> (22)	5,18 <sup>A</sup> (22)	6,71 <sup>A</sup> (21)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo +/- do polimorfismo GHR/*StuI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.



**Tabela 12.** Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos GHRm, GHR/*StuI* e GHR/*AluI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de carcaça				Qualidade de carne		
		RC (%)	PCQ (kg)	AOL (cm <sup>2</sup> )	EGS (mm)	FC (kg)	Contra-filé (kg)	Lagarto (kg)
GHRm	LL	54,99 <sup>A</sup> (36)	258,94 <sup>A</sup> (36)	75,71 <sup>A</sup> (36)	5,33 <sup>A</sup> (36)	3,65 <sup>AB</sup> (33)	4,46 <sup>A</sup> (22)	2,31 <sup>A</sup> (30)
	LS	55,47 <sup>A</sup> (283)	262,43 <sup>A</sup> (283)	77,34 <sup>A</sup> (133)	4,84 <sup>A</sup> (133)	3,22 <sup>B</sup> (87)	4,65 <sup>A</sup> (41)	2,45 <sup>A</sup> (87)
	SS	55,49 <sup>A</sup> (93)	260,42 <sup>A</sup> (93)	75,77 <sup>A</sup> (49)	4,62 <sup>A</sup> (49)	3,81 <sup>A</sup> (30)	4,38 <sup>A</sup> (40)	2,41 <sup>A</sup> (46)
GHR/ <i>StuI</i> *	+/-	55,65 <sup>B</sup> (48)	255,87 <sup>B</sup> (48)	82,20 <sup>A</sup> (28)	4,87 <sup>A</sup> (28)	3,55 <sup>A</sup> (48)	3,34 <sup>A</sup> (20)	2,33 <sup>A</sup> (28)
	-/-	56,48 <sup>A</sup> (24)	269,95 <sup>A</sup> (24)	77,86 <sup>A</sup> (10)	4,33 <sup>A</sup> (10)	3,58 <sup>A</sup> (24)	3,57 <sup>A</sup> (8)	2,42 <sup>A</sup> (11)
GHR/ <i>AluI</i>	AA	55,02 <sup>A</sup> (68)	261,06 <sup>A</sup> (68)	77,77 <sup>A</sup> (52)	4,22 <sup>A</sup> (52)	3,86 <sup>A</sup> (54)	3,67 <sup>A</sup> (25)	2,36 <sup>A</sup> (37)
	AB	55,35 <sup>A</sup> (142)	265,31 <sup>A</sup> (142)	76,49 <sup>A</sup> (119)	4,49 <sup>A</sup> (118)	3,78 <sup>A</sup> (86)	3,86 <sup>A</sup> (42)	2,40 <sup>A</sup> (66)
	BB	54,78 <sup>A</sup> (22)	267,01 <sup>A</sup> (22)	77,19 <sup>A</sup> (23)	4,42 <sup>A</sup> (23)	4,02 <sup>A</sup> (24)	4,00 <sup>A</sup> (13)	2,35 <sup>A</sup> (21)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo +/- do polimorfismo GHR/*StuI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGREY, S.E.; YAO, J.; SABOUR, M.P. et al. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holstein. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 148-151, 1999.
- CURI, P.R. & MORAES, R.V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 712- 722, 1981.
- DI STASIO, L.; SARATORE, S.; ALBERTA, A. Lack of association of GH1 and Pou1f1 gene variants with meat production traits in Piedmontese cattle. **Animal Genetics**. v. 33, p. 61-64, 2002.
- ELSASSER, T.H.; RUMSEY, T.S.; HOMMOND, A.C. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. **Journal of Animal Science**. v. 67, p.128- 141, 1989.
- FERRAZ, A. L. J. Identificação de polimorfismos no gene do hormônio de crescimento (GH) em raças de bovinos de corte. Monografia / Graduação – FCAV – UNESP/Jaboticabal. 62 p. junho/2001.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 220 p.
- GOODMAN, H.M. Growth hormone and metabolism. Ed. Academic Press, Inc. In **The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates**. p. 93-115, 1993.
- GROCHOWSKA, R.; SORENSEN, P.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 470-476, 2001.
- HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K. et al. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. *Journal of Animal Science*, v.72, p. 2216-2226, 1992.
- KOOHMARAIE, M. et al. Managing meat tenderness. **Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40º**, (CD room), 2003.

- LIMA, S.P.G. Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino (bGH) em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. Dissertação – FCAV – UNESP/Jaboticabal. 46 p. 2003.
- LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. 134 p.
- MASSEY, J.M.; GEORGES, M. Genmark's approach to marker assisted selection. **Animal Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 95-110, 1992.
- MOODY, D.E.; POMP, D.; BARENDSE, W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene assignment of PIT1 to bovine chromosome 1. **Animal Genetics**, v. 26, p. 45-47, 1995.
- NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Beef Cattle. **7<sup>th</sup> Rev. Edition. National Academy Press**. Washington, DC, 1996.
- OPRZADEK, J.; DYMNICKI, E.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al The effect of growth hormone (GH),  $\kappa$ -casein (CASK) and  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) genotypes on carcass trait in Friesian bulls. **Animal Science Papers and Reports**, v.17, p. 85-92, 1999.
- OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factor that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**. v.71, p. 3138- 3150, 1993.
- PARMENTIER, L.; PORTELLE, D.; GENGLER, N. et al. Candidate genes markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 139-148, 1999.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 555 p
- REED, C.A. The beginnings of the animal domestication. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p 1-6.
- REGITANO, I.C.A. & COUTINHO, L.L. **Biologia Molecular aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 213 p.
- RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 351-360, 2002.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, pp 7.46-7.50, 1989.

- SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 774p.
- SANTOS, R. **Nelore: a vitória brasileira**. 1ed. Agropecuária Tropical: Uberaba, 1995, 392p.
- SAS. Statistical Analysis System, Systems for windows. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC, 1999.
- SCHLEE, P.; GRAMI, R.; SCHALLENBERGER, E. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 497-500, 1994a.
- SCHLEE, P.; GRAML, R.; ROTTMANN, O. et al. Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**. v.111, p. 253-256, 1994b.
- SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford x Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.
- SILVEIRA, L.G.G. Níveis plasmáticos de IGF-I e polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (GH) como possíveis indicadores do potencial produtivo em bovinos de corte. 2002. 50p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SORENSEN M.T.; CHAUDHURI S.; LOUVEAU I.; COLEMAN M.E.; ETHEERTON T.D. Growth hormone binding proteins in pig adipose tissue: number, size and effects of pGH treatment on pGH and bGH binding. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 9, p. 13-24, 1992.
- SUGISAWA, L.; CURI, R.A., SILVEIRA, A.C. et al. Polimorfismo do GH e do receptor do GH como indicadores do potencial produtivo de bovinos de corte. **Anais da 41ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 2004 (CD room).
- SWITONSKI, M. Molecular genetics in beef cattle breeding – a review. **Animal Science Papers and Reports**. v. 20, p. 7-18, 2002.
- TAMBASCO, D.D.; PAZ, C.C.P.; TAMBASCO-STUDART, M. D. et al. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. **Journal of Animal Breeding**, v.120, p.51 - 56, 2003.

- TAYLOR, J.F.; COUTINHO, L.L.; HERRING, K. L. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 24, p. 194-201, 1998.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Sinauer Associates: Massachusetts, 1990. 377p.
- WOMACK, J.E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1199- 1203, 1993.
- YAO, J.; AGREY, S.E.; ZADWORNYY, D. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics**, v.144, p.1809-1816, 1996.
- ZWIERZCHOWSKI, L.; OPRZADEK, J.; DYMNIKI, P. et al. An association of growth hormone, k-casein, B-lactoglobulin, leptin and Pit-1 loci with growth rate and carcass traits in beef cattle. **Animal Science Papers and Reports**. v. 19, p. 65-78, 2001.

## CAPÍTULO 5

### ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE

#### RESUMO

Considerando a importância do efeito do gene da Leptina no metabolismo do tecido adiposo, buscou-se estudar o polimorfismo *LEPT/Kpn2I*, por PCR-RFLP, e verificar a existência de associação, características de carcaça e qualidade de carne de 300 bovinos de corte (126 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 Brangus, 24 Simental x Nelore, 12 Simental, 11 Simbrasil, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore), submetidos a sistema intensivo de produção. O efeito dos genótipos sobre as características avaliadas foi analisado utilizando-se o procedimento GLM (SAS) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo incluiu além do efeito do genótipo, grupo genético x ano x fazenda de origem do animal e interações. Os resultados demonstraram que este polimorfismo influenciou a gordura da garupa por ultra-som, cujos animais com genótipo CT apresentaram maiores valores ( $P < 0,05$ ). Este polimorfismo também afetou o rendimento de carcaça, peso do contra-filé e força de cisalhamento da carne dos animais, cujos animais com genótipo CT apresentaram maiores valores ( $P < 0,01$ ). Desta forma, os animais CC foram produtores da carne mais macia ( $P < 0,01$ ).

**Palavras chave:** adiposo, gene candidato, gordura, metabolismo, obesidade

## INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, postulou-se a existência de um mecanismo lipostático de controle do apetite, modulado pelas reservas energéticas do organismo sob a forma de tecido adiposo (HERVEY, 1969). Neste modelo, quando as reservas energéticas (tecido adiposo) estão elevadas, os centros da saciedade no hipotálamo são ativados, provocando redução na ingestão de alimentos. Por outro lado, durante restrição alimentar ou jejum prolongado, as reservas de tecido adiposo são mobilizadas para produção de energia, ocorrendo um aumento concomitante do apetite. Apesar das evidências experimentais da existência de um mecanismo endócrino de sinalização para este mecanismo, obtidas em experimentos de parabiose, a identificação do agente sinalizador ocorreu somente em 1994, quando Zhang e colaboradores noticiaram a clonagem do gene da obesidade (ObG), cujo produto foi denominado Leptina (ZHANG et al., 1994). De acordo com o conhecimento atual, a Leptina é produzida e secretada pelas células do tecido adiposo, sendo transportada para os tecidos-alvo pela corrente sanguínea, onde interage com receptores celulares específicos (HOUSEKNECHT et al., 1999; UNGER, 2000; VERNON et al., 2001).

Muitos dos estudos sobre os mecanismos de ação da Leptina ainda se encontram em andamento. Entretanto, resultados de experimentos realizados com seres humanos e com linhagens de ratos obesos (ob/ob) ou diabéticos (db/db), têm demonstrado o envolvimento da Leptina no controle do apetite e na modulação da secreção da insulina pelo pâncreas (CHEN et al., 1996; CHUA et al., 1996). Numa ação autócrina, a Leptina, exerce um efeito inibitório sobre a captação insulino-estimulada de glicose pelos adipócitos, reduz lipogênese e estimula lipólise no tecido adiposo. De maneira endócrina, a Leptina estimula captação de glicose e síntese de glicogênio pelas células do tecido muscular, além acelerar a taxa de oxidação de ácidos graxos neste tecido. Tais evidências sugerem que a Leptina exerce um papel central na regulação das reservas energéticas do organismo, deslocando o fluxo de metabólitos do tecido adiposo para a musculatura esquelética (CEDDIA et al., 1998; CHILLIARD et al., 2001).

Tendo em vista sua relevância na regulação da ingestão de alimentos, no metabolismo dos nutrientes e na composição corporal dos animais (POMP et al., 1997; HOSSNER, 1998), a Leptina é considerada um forte gene candidato, no processo de seleção assistida por marcadores moleculares, como ferramenta para alterar a

quantidade de gordura na carcaça de bovinos (BUCHANAN et al., 2002). A utilização do nível sérico de Leptina como ferramenta de predição da quantidade de gordura, em bovinos, não é adequada, já que a quantidade de Leptina circulante no plasma sofre influências de uma gama de fatores como idade, nutrição, ambiente, grupo genético, etc (KAWAKITA et al., 2001; WEGNER et al., 2001; GEARY et al., 2003; NARRO et al., 2003; NKRUMAH et al., 2003).

Em bovinos, o gene da Leptina apresenta-se com aproximadamente 18,9 kb, localiza-se no cromossomo 4 (POMP et al., 1997) e é composto por três exons que perfazem aproximadamente 3,2 kb e dois íntrons que somados representam 15,7 kb (SALMAN, 2004). Sabe-se, atualmente, que o gene da Leptina bovina tem alta homologia com os genes da Leptina de eqüinos, ovinos e suínos (BUFF et al., 2002). Existem alguns polimorfismos do gene da Leptina descritos na literatura (POMP et al., 1997; LIEN et al., 1997) que foram relacionados aos índices de produção de bovinos (HAEGEMAN et al, 2000; OPRZADEK et al., 2003; TESSANNE et al., 2004). O polimorfismo da Leptina descrito por POMP et al. (1997), primeiramente associado às características de produção de leite, devido à estreita relação com balanço energético e fertilidade, foi extrapolado para características de crescimento em bovinos de corte, demonstrando associações significativas com consumo de alimento (OPRZADEK et al., 2003), sem afetar medidas da área de olho-de-lombo (AOL) e gordura subcutânea (EGS) da carcaça de novilhos de quatro grupo genéticos ( $\frac{1}{2}$  Angus Nelore, Nelore, Canchim e  $\frac{1}{2}$  Simental Nelore), submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce (SALMAN, 2004). Entretanto, o polimorfismo da Leptina descrito por LIEN et al. (1997), não estabeleceu nenhuma associação significativa com as características de desempenho de animais de duas linhagens de bovinos de corte da raça Angus, selecionadas para alta e baixa concentração de IGF-1 sérico (TESSANNE et al., 2004). Esta ausência de efeito dos genótipos, gerados por alguns polimorfismos no gene da Leptina, sobre as características de crescimento, dos animais de produção, já foi descrita anteriormente também em suínos (HARDGE et al., 1998).

Quando se passa a estudar o efeito do polimorfismo da Leptina sobre às características de carcaça, é mais visível e comum a influência do genótipo do animal, principalmente no tocante ao metabolismo de gordura (TESSANNE et al., 2004; HAEGEMAN et al, 2000). Assim, o polimorfismo da Leptina, descrito por POMP et al.



(1997), demonstrou correlações significativas com peso, deposição de gordura na carcaça e qualidade dos cortes cárneos comerciais de bovinos (OPRZADEK et al., 2003); enquanto que o polimorfismo descrito por STRAIL et al. (1997), mostrou associações significativas com proporção músculo:gordura e espessura de gordura subcutânea em suínos (HARDGE et al., 1998). Entretanto, foi com a descoberta de uma mutação de ponto, analisada por PCR-RFLP, localizada no exon 2 do gene da Leptina de bovinos de corte (BUCHANAN et al., 2002), que foram observadas importantes variações nos níveis de expressão de RNAm e conteúdo de gordura na carcaça. A forte associação entre o alelo T e a produção de carcaças com quantidade de gordura superior e, entre o alelo C com carcaças mais magras encontradas em estudo de BUCHANAN et al. (2002), persistiu até mesmo entre grupos genéticos, cujos animais de origem britânica possuíam maior frequência do alelo T e animais de origem continental, maior frequência do alelo C. O alelo T é oriundo de uma mutação que produz uma cisteína extra à proteína, que em parte gera perda de função biológica desta (BUCHANAN et al., 2002). Em outro trabalho, os animais de genótipo TT também foram superiores para “yield grade” e EGS na carcaça, mas inferiores na produção de músculos (%), sem afetar, entretanto, características como peso ao abate, peso da carcaça, AOL e marmoreio (NKRUMAH et al., 2003). A importância do alelo T consolida-se até na avaliação de bovinos de leite, cujos animais que apresentavam genótipo TT tinham maior produção de leite, de proteína do leite, de reservas corporais em forma de gordura, sem, no entanto, afetar à quantidade de gordura do leite (BUCHANAN et al., 2003).

De uma maneira geral, até hoje, não há consenso ou repetibilidade dos resultados de testes genéticos e sua associação com as características economicamente importantes de bovinos, embora a EGS, a AOL e a produção de músculo tenham valores de herdabilidade moderados a altos (CREWS & KEMP, 2001). Espera-se que, em um futuro próximo, o número de trabalhos que analisam o efeito do polimorfismo de genes candidatos em características de produção animal aumente substancialmente, produzindo resultados mais conclusivos e possibilitando à utilização prática desta ferramenta na seleção e no melhoramento genético de bovinos de corte.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo do polimorfismo na seqüência do DNA do gene da Leptina (*LEPT/Kpn2I*) e sua associação com os índices

mais importantes de crescimento e características da carcaça e qualidade de carne de 300 bovinos de corte, de diversos grupos genéticos, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Animais.**

O projeto foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, ambos da UNESP/Botucatu-SP.

Para a análise experimental foram colhidas amostras de sangue de 300 animais dos seguintes grupos genéticos: 126 animais Angus x Nelore, 10 Angus puro, 18 Brangus (3/8 Nelore x 5/8 Angus), 24 Simental x Nelore, 12 Simental puro, 11 Simbrasil (3/8 Nelore e 5/8 Simental), 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore puro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os bezerros foram desmamados aos 210 dias de idade em sistema *creep-feeding*. No início do experimento, todos os animais foram identificados individualmente, tratados contra endo e ectoparasitas e distribuídos aos currais de confinamento, com cinco animais cada, de acordo com o grupo genético e tamanho, sendo alimentados com dietas formuladas segundo as normas do NRC (1996), para ganhos de pesos médios diários acima de 1,2 kg. Os dados de três anos de confinamento experimental foram utilizados, e embora houvesse diferenças entre o tempo de confinamento por grupo genético e por ano avaliado, em média, todos os animais amostrados foram abatidos após 120 dias.

Os animais foram pesados no início do confinamento (**PI**) e próximo ao abate (**PF**). O ganho de peso médio diário (**GPMD**) foi calculado pela média de ganho de peso entre todas as pesagens. As medidas de área de olho de lombo, ou seja, área do músculo *Longissimus dorsi* (**AOL**), cobertura de gordura subcutânea sobre a AOL (**EGS**) e cobertura de gordura subcutânea sobre a garupa (**EGAR**) foram avaliadas por ultra-sonografia, conforme o método de HERRING et al. (1992), utilizando um aparelho de ultra-sonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02), na ocasião da última pesagem. As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

O critério de abate utilizado foi peso final mínimo de 450 kg e EGS mínima de 3 milímetros (mm), monitorado por ultra-sonografia para todos os grupos genéticos. No momento do abate foram medidos o peso da carcaça quente (**PCQ**). Após o abate, as carcaças foram identificadas, pesadas e resfriadas por 24 horas. Foram determinados os pesos dos cortes Contra-filé (**Contra-filé**) e Lagarto (**Lagarto**), durante a desossa, como indicativos dos cortes cárneos comerciais da carcaça. No entanto, o peso do Corte Contra-filé compreendeu somente a porção entre a 6<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> costela.

Foram coletadas, após o resfriamento, amostras da seção da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para a obtenção da medida de área de olho-de-lombo (**AOL**) e gordura de cobertura (**EGS**) na carcaça, força de cisalhamento (**FC**), como medida objetiva da maciez da carne, e perdas por cozimento. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, onde as peças permaneceram armazenadas sob resfriamento de - 5° C, sendo a AOL obtida através da utilização da régua de quadrantes de pontos (LUCHIARI FILHO, 2000), e a EGS através de mensuração com paquímetro. Foram realizadas análises laboratoriais para a determinação da maciez e das perdas por cozimento no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, segundo metodologia proposta por SHACKELFORD et al. (1991).

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para analisar os polimorfismos genéticos, sendo o DNA extraído do sangue através do *kit* de extração *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (AMERSHAM PHARMACIA). A presença de marcadores moleculares no DNA genômico foi analisada no gene da Leptina (**LEPT**), no sítio de restrição da enzima *Kpn2I*, segundo metodologia de BUCHANAN et al. (2002). Os *primers* necessários para a amplificação das regiões de interesse, bem como a enzima de restrição necessária para a digestão dos fragmentos amplificados de cada região foram determinados com base na literatura.

### **Extração do DNA e genotipagem.**

Amostras de 5 ml de sangue total foram colhidas por flebocentese da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos a vácuo, contendo 7,5 mg de EDTA. A extração do DNA genômico utilizando-se o *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) foi feita a partir de uma alíquota de 300

$\mu$ L de sangue total. A quantidade e a integridade das moléculas de DNA foram avaliadas em gel de agarose a 0,8%.

A genotipagem dos animais foi feita pela técnica de PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose (2%), no gene da Leptina (**LEPT**). O polimorfismo estudado, o cromossomo de localização do gene, os *primers* e a temperatura de anelamento necessária à amplificação da região de interesse, estão apresentados na Tabela 13.

São encontrados dois alelos (C e T) para o polimorfismo LEPT/*Kpn2I* (BUCHANAN et al., 2002). Os animais homozigotos para o alelo C apresentam corte pela enzima de restrição mostrando 2 bandas, uma com 75 e outra com 19 pares de bases (pb). Os heterozigotos CT apresentam uma banda de 75 pb, uma de 19 pb e outra banda de 94 pb (sem corte). Os homozigotos para TT apresentam somente uma banda de 94 pb (sem corte).

Cada PCR foi feita em um volume final de 25  $\mu$ L e a mistura para amplificação foi constituída de: 50 ng de DNA genômico; 0,20  $\mu$ M de cada *primer*; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase. As amplificações consistiram de 5 passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla à 94°C por 4 minutos; (2) desnaturação à 94°C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* entre 54 e 66°C, dependendo da constituição dos mesmos, por 45 segundos; (4) extensão à 72°C por 1 minuto e (5) extensão final à 72°C por 4 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituem um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10 $\mu$ L de produto de PCR e 3U de enzima de restrição. As misturas para digestão foram incubadas em termociclador à 37°C por 4 horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose à 2%, em um sistema de eletroforese horizontal. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. Esses fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A documentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi feita utilizando-se um sistema digital de fotodocumentação. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pb.

### **Análise Estatística.**

A partir dos genótipos identificados nos géis foram calculadas, de acordo com WEIR (1990), as frequências genóticas e alélicas para o polimorfismo.

Nos estudos de associação, as características de interesse foram analisadas utilizando-se o procedimento GLM (*General Linear Model*) do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1987) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas incluiu além do efeito do genótipo, o efeito de grupo contemporâneo que considerou a interação entre grupos genéticos (1,...,4), ano de confinamento (1,...,3) e fazendas de origem (1,...,6), como segue:  $Y_{ijk} = \mu + G_i + GC_j + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  = característica de produção,  $\mu$  = média geral,  $G_i$  = efeito fixo do  $i$ ésimo genótipo,  $GC_j$  = efeito fixo do  $j$ ésimo grupo contemporâneo, e  $e_{ijk}$  = erro aleatório.

Foram excluídos das análises grupos genéticos que apresentaram genótipo único e genótipos cujas frequências foram muito baixas (menor que 0,10) na amostra total de animais estudados, como foi o caso do genótipo TT do polimorfismo LEPT/*Kpn2I*. Também foram eliminados das análises dados de animais cujos genótipos apresentavam frequência muito baixa dentro do grupo genético.

O efeito de touro não foi incluído no modelo linear uma vez que o número de animais genotipados filhos dos mesmos touros era muito pequeno (em média 8,5). Em razão desse grande número de pais, a possibilidade de confundimento entre efeito de genótipo e de touro nas características estudadas fica diminuída.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polimorfismo do gene Leptina, gerado pela ação da enzima *Kpn2I*, classifica os animais em duas variantes genéticas (C e T), sendo o alelo T oriundo de uma mutação que inclui uma cisteína extra a proteína, gerando perda parcial da função biológica desta (BUCHANAN et al., 2002). Os resultados encontrados das frequências genóticas e alélicas para ambos polimorfismos gênicos, da Leptina, encontram-se na Tabela 14.

Conforme postulado por BUCHANAN et al. (2002), a maior frequência do alelo T foi observada na raça Angus (Tabela 14), confirmando que quanto maior a aptidão da raça para deposição de gordura na carcaça, maior a frequência deste alelo. Os valores de frequência do alelo T obtidos para as raças Angus e Simental (0,58; 0,32, respectivamente) no trabalho de BUCHANAN et al. (2002), foram menores que aqueles obtidos neste estudo (0,65; 0,42, respectivamente). Também o trabalho de NKRUMAH et al. (2003), mostrou a superioridade da frequência do alelo T nas raças de deposição precoce de gordura. Com exceção da raça Angus, a maioria dos grupos genéticos, neste trabalho, teve alta frequência do alelo C na população (Tabela 14).

Em todos os grupos genéticos, as frequências de heterozigotos é maior que a esperada caso a população estivesse em equilíbrio. No caso dos cruzamentos isto poderia ser conseqüência de diferenças nas frequências entre as raças, mas no caso das raças Simental, Smbrasil, Canchim e Nelore não era o esperado (Tabela 14). Ainda, as populações estudadas das raças Simental, Canchim e Nelore também não apresentaram nenhum animal com genótipo homozigoto TT. Sabe-se que, a probabilidade de que isto ocorresse ao acaso em uma amostra proveniente de um população em equilíbrio, nas condições da raça Nelore, seria da ordem de 1%. Considerando às frequências observadas para as raças puras, os resultados observados não seriam esperados mesmo nos cruzamentos. Em outros estudos, os resultados obtidos para frequência genotípica do heterozigoto nas raças puras Angus, Charolês, Hereford e Simental variaram entre 0,41 e 0,50 (BUCHANAN et al., 2002; NKRUMAH et al., 2003).

Em estudo de BUCHANAN et al (2003), a raça Pardo-suíço apresentou frequência de 0,55 para o alelo C e de 0,45 para o alelo T, diferentemente dos animais ½ Pardo-suíço Nelore deste trabalho (Tabela 14). Ao se avaliar os bovinos de leite,

verificou-se que o genótipo TT está associado a aumento da produção de leite, da quantidade de proteína do leite, das reservas corporais de gordura, sem, no entanto alterar a quantidade de gordura do leite produzido (BUCHANAN et al, 2003). Desta forma, os diferentes objetivos de seleção da raça Pardo-suíço leite e corte podem ser os principais responsáveis pelas diferenças de frequência gênica encontradas. Ao final do trabalho, conseguiu-se resultados de genotipagem de 294 animais para o polimorfismo LEPT/*Kpn2I*, devido à ocorrência de 6 falhas ocorridas na amplificação do DNA (Tabela 14). As comparações entre as médias dos quadrados mínimos das variáveis quantitativas de crescimento, carcaça e qualidade de carne para os genótipos do polimorfismo LEPT/*Kpn2I* estão apresentados na Tabela 15.

Segundo BUCHANAN et al. (2002), tudo parece indicar que o alelo T do polimorfismo do gene da Leptina está relacionado com a maior deposição de gordura, indicativo da precocidade de acabamento dos animais. No entanto, como a frequência de animais TT, para o polimorfismo LEPT, foi baixa neste trabalho, este genótipo teve que ser retirado das análises estatísticas, provavelmente porque o número de indivíduos puros provenientes de raças de alta precocidade foi pequeno, já que a maior parte dos animais genotipados eram provenientes do cruzamento com a raça zebuína Nelore (Tabela 15).

No presente estudo, foram encontradas diferenças significativas dos genótipos estabelecidos pelo polimorfismo da Leptina (BUCHANAN et al., 2002), e a espessura de gordura subcutânea da garupa por ultra-sonografia (EGAR), sendo que os animais CT apresentavam maiores valores que os animais CC (Tabela 15). Esta constatação concorda com o postulado por BUCHANAN et al., (2002), segundo o qual o alelo T incide em animais em maior deposição de gordura subcutânea. Entretanto, este efeito não foi observado na medida de EGS ultra-som, diferentemente do estudo de NKRUMAH et al. (2003).

Da mesma forma que o ocorrido no presente trabalho, em pesquisa de NKRUMAH et al. (2003), também não ficou constatada nenhuma associação significativa entre os genótipos estudados gerados pelo mesmo polimorfismo da Leptina e os índices de crescimento de bovinos de corte (GPMD, consumo de alimento e eficiência alimentar). Desta forma, foi sugerido que animais de genótipos homozigotos para o alelo T, que possuem a função biológica da Leptina reduzida (BUCHANAN et



al., 2002), já que a troca da citosina pela timina faz com que a proteína perca parte da sua função biológica, poderiam ter sido compensados por uma maior síntese do hormônio Leptina, incorrendo em menor efeito deste polimorfismo no desempenho animal.

No entanto, no presente estudo foi encontrada associação significativa dos genótipos CC e CT, gerados pelo polimorfismo do gene da Leptina (BUCHANAN et al., 2002), com o RC, sendo que os animais CT possuíam valores maiores que os animais CC (Tabela 16). O RC, apesar de ser uma variável influenciada por inúmeros fatores, tem forte associação com a quantidade de gordura do animal (LUCHIARI FILHO, 2000), o que poderia explicar em parte este resultado.

A ausência de efeito dos genótipos gerados pelo polimorfismo da Leptina na EGS da carcaça do presente trabalho possivelmente, deve-se à pequena quantidade de animais homozigotos TT (14) encontrada nesta população, que promoveu a retirada deste genótipo das análises estatísticas. Apesar do estudo de NKRUMAH et al., (2003), ter avaliado um número menor de amostras (144 animais), a população estudada estava em equilíbrio, de acordo com a lei *Hardy-Weinberg* para os genótipos CC, CT e TT (32; 74 e 38, animais respectivamente), resultado este não demonstrado pelo presente estudo, já que dos 300 animais avaliados, a relação entre os genótipos CC, CT e TT foi de 92; 188 e 14, respectivamente.

Ao se avaliar as características de qualidade de carne, o polimorfismo LEPT/*Kpn2I* apresentou efeito significativo sobre o peso do corte Contra-filé (Tabela 16), sendo as peças dos animais CT mais pesadas que aquelas dos animais CC ( $P > 0,01$ ). No entanto, em relação ao Lagarto, não houve efeito significativo do genótipo.

O polimorfismo LEPT/*Kpn2I* influenciou a força de cisalhamento (FC), que é uma metodologia aceita para obtenção de um valor objetivo de maciez da carne, pois indica a força necessária para rompimento das fibras musculares de uma amostra de 12,7 mm de diâmetro (SHACKELFORD et al., 1991). Assim, quanto maior o valor de FC encontrado, menos macia é a carne. Sabe-se que a maciez da carne é a característica mais importante para os consumidores da carne bovina (KOOHMARAIE et al., 2003). Neste caso, os animais portadores do genótipo CC demonstraram possuir carne mais macia que os indivíduos CT ( $P < 0,01$ ). Esta informação é importante, pois pode vir, depois da realização de muitos estudos comprobatórios, auxiliar à seleção de

reprodutores para aumentar a incidência de carne macia na população, através do aumento da frequência deste genótipo.

É válido lembrar que todos os animais deste estudo foram submetidos a um sistema curto de produção do tipo confinamento do Novilho Superprecoce com alta ingestão de energia total, o que proporcionou que todos os animais avaliados atingissem adequados índices de desempenho, qualidade de carcaça e carne (Tabela 16). Provavelmente devido à ausência de representatividade de animais homozigotos TT, não foi constatado que o alelo T do polimorfismo do gene da Leptina ao promover maior precocidade, poderia promover certo comprometimento na deposição de tecido muscular.

## **CONCLUSÕES**

O polimorfismo *LEPT/Kpn2I* demonstrou associações com a gordura da garupa por ultra-som, rendimento de carcaça, força de cisalhamento e peso do corte Contra-filé, comuns a todos os grupamentos genéticos envolvidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa de estudos a autora Liliane Sugisawa.

**Tabela 13** – Polimorfismo estudado, seqüência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados na amplificação da região gênica de interesse, temperatura de anelamento dos *primers* (TA) e localização cromossômica do gene (Cr).

Polimorfismo	Seqüência dos <i>primers</i> 5' → 3'	TA °C	Cr
LEPT/ <i>Kpn2I</i>	5'- ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC – 3' 5'- TGGTGTTCATCCTGGACCTCC – 3'	56°	4

**Tabela 14** - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *Kpn2I* em um fragmento do gene Leptina (LEPT/*Kpn2I*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		CC	CT	TT	C	T
Angus	10	0,10	0,50	0,40	0,35	0,65
Brangus	18	0,17	0,67	0,17	0,50	0,50
½ Angus Nelore	120	0,29	0,68	0,03	0,63	0,37
Simental	12	0,17	0,83	0,00	0,58	0,42
Simbrasil	11	0,09	0,82	0,09	0,50	0,50
½ Simental Nelore	24	0,17	0,79	0,04	0,56	0,44
Canchim	12	0,50	0,50	0,00	0,75	0,25
½ Pardo Suíço Nelore	18	0,39	0,50	0,11	0,64	0,36
½ Santa Gertrudes Nelore	17	0,29	0,71	0,00	0,65	0,35
½ Brahman Nelore	16	0,88	0,13	0,00	0,94	0,06
Nelore	36	0,39	0,61	0,00	0,69	0,31
<b>Média</b>	294	0,31	0,64	0,05	0,63	0,37

**Tabela 15.** Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos do polimorfismo *LEPT/Kpn2I* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de Crescimento					
		PI (kg)	PF (kg)	GPMD (kg/d)	AOL ultra-som (cm <sup>2</sup> )	EGS ultra-som (mm)	EGAR ultra-som (mm)
<i>LEPT/Kpn2I</i> *	CC	301,26 <sup>A</sup> (90)	469,99 <sup>A</sup> (90)	1,26 <sup>A</sup> (90)	70,45 <sup>A</sup> (89)	4,69 <sup>A</sup> (89)	5,52 <sup>B</sup> (78)
	CT	299,91 <sup>A</sup> (151)	466,93 <sup>A</sup> (151)	1,24 <sup>A</sup> (151)	71,79 <sup>A</sup> (150)	4,67 <sup>A</sup> (151)	6,15 <sup>A</sup> (118)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo TT do polimorfismo *LEPT/Kpn2I* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

**Tabela 16.** Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça e qualidade de carne para os genótipos do polimorfismo *LEPT/Kpn2I* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de carcaça				Qualidade de carne		
		RC (%)	PCQ (kg)	AOL (cm <sup>2</sup> )	EGS (mm)	FC (kg)	Contra- filé (kg)	Lagarto (kg)
<i>LEPT/Kpn2I</i> *	CC	55,59 <sup>A</sup> (85)	262,17 <sup>A</sup> (85)	77,15 <sup>A</sup> (65)	4,85 <sup>A</sup> (65)	3,48 <sup>B</sup> (44)	3,07 <sup>B</sup> (29)	2,32 <sup>A</sup> (52)
	CT	55,14 <sup>B</sup> (139)	257,72 <sup>A</sup> (139)	75,24 <sup>A</sup> (110)	4,73 <sup>A</sup> (110)	3,77 <sup>A</sup> (107)	3,36 <sup>A</sup> (48)	2,31 <sup>A</sup> (77)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo TT do polimorfismo *LEPT/Kpn2I* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; et al.. Association of missense mutation in bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.
- BUCHANAN, F. C.; VAN KESSEL, A. G.; WALDNER, C. et al. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk ad protein yield. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3164-3166, 2003.
- BUFF, P.R.; DODDS, A.C.; MORRISON, C.D.; et al. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2942-2948, 2002.
- CEEDDIA, R.B.; WILLIAM, W.N.; CURI, R. Leptin increases glucose transport and utilization in skeletal muscle in vitro. **Genetic Pharmacology**, p.799:801, 1998.
- CHEN, H. et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Indentification of a mutation in the leptin recepetot gene in db/db mice. **Cell**, v.84, p.491-5, 1996.
- CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C. et al. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mamary gland and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p. 271-295, 2001.
- CHUA, S.C. et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. **Science**, v.271, p.994-996, 1996.
- GEARY, T.W.; MACFADIN, E.L.; MACNEIL, M.D. et al. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1-8, 2003.
- HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v.31, p.79, 2000.
- HARDGE, T.; KOPKE, K.; WIMMERS, K. et al. Association between polymorphism of the leptin gene (LEP) and performance traits in a porcine resource family and in a commercial outbred populations. **Animal Genetics**, v.29, p.70, 1998.
- HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K. et al. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 2216-2226, 1992.

- HERVEY, G.R. Regulation of energy balance. **Nature**, v.17, p.629-31, 1969.
- HOUSEKNECHT, K.L. et al. The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1405-20, 1998.
- KAWAKITA, Y.; ABE, H.; HODATE, K.; et al. The relation between leptin concentrations and carcass lipid content in Japanese black steers. **Livestock Production Science**, v.73, p. 25-34, 2001.
- LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. 134 p.
- NARRO, L.A.; THOMAS, M.G.; SILVER, G.A.; et al. Body composition, leptin, and the leptin receptor and their relationship to the growth hormone (GH) axis in growing wethers treated with zeranol. **Domestic Animal Endocrinology**, v.24, p.243-255, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL.. Nutrient requirements of beef cattle. 7. ed. Washington: Academy Press, 1996. 242p.
- NKRUMAH, J.D.; BASARAB, J.B.; GUERCIO, S.; et al. 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, 2003.
- OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L. et al. Polymorphisms at *loci* of Leptina (LEP), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black-and-white bulls. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, n.3, p.135-145, 2003.
- POMP, D.; ZOU, T.; CLUTEER, A.C.; BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1427, 1997.
- SALMAN, A. K. D. Polimorfismos no Gene da Obesidade (Leptina) em Diferentes Grupos Genéticos de Bovinos de Corte Terminados no Sistema Superprecoce. Tese (Doutorado) – UNESP/FMVZ, julho/2004, 42 p.
- SAS INSTITUTE. SAS/STATTM guide for personal computers. 6.ed. Cary, 1987. 1028p.
- SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford x Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.

- TESSANNE, K.; HINES, H.C.; DAVIS, M.E. Relationship of polymorphisms in the bovine leptin gene with differences in beef carcass traits. *Research and Reviews: Beef and Sheep, Special Circular*, p.170-199, [www.ohioline.ag.ohio-state.edu](http://www.ohioline.ag.ohio-state.edu), 10/01/2004.
- UNGER, R, H. Leptin physiology: a second look. **Regulatory peptides**, v.92, p.87-95, 2000.
- VERNON, R.,G.; DENIS, R.G.P.; SORENSEN, A. Signals of adiposity. **Domestic Animal Endocrinology**, v.21, p. 197-214, 2001.
- WEGNER, J.; HUFF, P.; XIE, C.P. et al. Relationship of plasma leptin concentration to intramuscular fat content of breed from crossbred Wagyu cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.81, p.451-457, 2001.
- ZHANG, Y et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p.425-32, 1994.



## CAPÍTULO 6

### ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES DA CALPAÍNA E CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO, CARÇAÇA E QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS DE CORTE

#### RESUMO

Considerando a importância do efeito do gene da m-Calpaína e do gene da Calpastatina na qualidade da carne bovina, buscou-se estudar os polimorfismos *CAPN2/HhaI* e *CALP/XmnI*, por PCR-RFLP, e verificar a existência de associação com índices de crescimento, carcaça e carne de 300 bovinos de corte (126 animais Angus x Nelore, 10 Angus, 18 Brangus, 24 Simental x Nelore, 12 Simental, 11 Simbrasil, 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore), submetidos a sistema intensivo de produção. O efeito dos genótipos sobre às características avaliadas foi analisado utilizando-se o procedimento GLM (SAS) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo incluiu o efeito do genótipo, grupo genético x ano x fazenda de origem do animal e interações. Os resultados demonstraram que *CAPN2/HhaI* influenciou o peso inicial e final, área de olho-de lombo e gordura subcutânea por ultra-som, rendimento e largura da carcaça e peso da carcaça quente, cujos animais AB apresentaram maiores valores que os BB ( $P < 0,01$ ). No entanto, os animais BB possuíam maior peso do corte contra-filé e carne menos macia que os animais AB ( $P < 0,01$ ). Em relação a *CALP/XmnI* não foi encontrado nenhuma associação entre os genótipos e as características avaliadas.

**Palavras chave:** gene candidato, complexo enzimático, maciez, musculosidade.

## INTRODUÇÃO

O Brasil, atualmente, possui o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo (186 milhões de cabeças – IBGE, 2002). Graças a este contingente numérico, a produção de carne bovina brasileira é capaz de suprir toda a demanda do mercado interno e, concomitantemente, aumentar sua participação no mercado internacional. Diferentemente dos principais países exportadores de carne, o rebanho nacional é composto principalmente de animais zebuínos (maioria Nelore), sob regime de pastagens, o que confere preços competitivos no mercado internacional e transforma o panorama da produção pecuária em um nicho bastante promissor.

Desta forma, a preocupação crescente com a qualidade da carne bovina é fundamental para um mercado em expansão, já que esta diretamente relacionada com a aceitabilidade do produto. No entanto, o desenvolvimento de sistemas de determinação da qualidade da carne bovina e a classificação de carcaças ainda são incipientes no país. (SUGISAWA, 2002). Estudos comprovam que a maciez é a característica mais importante na avaliação da qualidade da carne, sendo influenciada desde a composição genética do animal, até os manejos pré e pós-abate (DEVITT et al., 2002; KOOHMARAIE et al., 2003). Desta forma, as técnicas de melhoramento genético tradicionais não se mostram eficientes na detecção dos animais que produzem carcaça com qualidade de carne adequada dentro de uma população (PAGE et al., 2002).

O sistema proteolítico cálcio-dependente “calpaína-calpastatina”, composto pelas enzimas:  $\mu$ -calpaína (que atua em baixa concentração de cálcio), m-calpaína (que atua em alta concentração de cálcio) e a calpastatina (inibidora específica das calpaínas) é responsável por grande parte das variações da maciez da carne bovina (CROAL & DE MARTINO, 1991; KOOHMARAIE et al., 1993). Durante o processo de maturação, as enzimas calpaínas enfraquecem as estruturas miofibrilares do sarcolema das fibras musculares (interação filamentos finos/disco-Z nas proteínas titina, nebulina, desmina e troponina T), amaciando a carne (DRANSFIELD, 1994; TAYLOR et al., 1995). Como a calpastatina inibe a ação das enzimas calpaínas (CIOBANU et al., 2004), esta é em plena atividade, potencial inibidora da maciez da carne. Entretanto, existe grande dificuldade em avaliar tanto a quantidade como a atividade das calpaínas *in vivo* e no *post mortem* (DRANSFIELD, 1994). Como esta dificuldade não acontece com a

calpastatina, consolida-se assim a mensuração da sua atividade como principal fator regulador da maturação da carne (KOOHMARAIE, 1988, KOOHMARAIE et al., 1994). O modelo de ação da calpastatina sobre seu substrato é bastante específico (SHACKELFORD et al., 1994), sendo que os principais agentes são as variações do pH intracelular (KOOHMARAIE, 1992, GEESINK et al., 1995), juntamente com as variações de temperatura e o tempo de desenvolvimento do *rigor mortis* (DRANSFIELD, 1994).

Estudos avaliando os fatores mais importantes sob a extensão do processo de maturação da carne concluíram que, embora o próprio desempenho animal (idade de abate e ganho de peso médio diário) tivesse pouca relevância (BRACKEBUSCH et al., 1991, SHACKELFORD et al., 1991, HUFF-LONERGAN et al., 1995, WULF et al., 1996), a raça do animal tem grande influência sobre a maciez da carne, graças as diferentes atuações, determinadas geneticamente, do complexo enzimático “calpaína-calpastatina” (KOOHMARAIE et al., 2003). Assim foram constatadas diferenças entre a concentração muscular da calpastatina quanto a espécies, grupos genéticos dentro de uma mesma espécie, sexo e até entre indivíduos de uma mesma população (KOOHMARAIE, 1988; KOOHMARAIE, 1992; KOOHMARAIE et al., 2003). Isto explicaria facilmente os baixos valores de maciez encontrados para os animais com mais de 25% de zebu (KOCH et al., 1982; CROUSE et al., 1989; JOHNSON et al., 1990; CUNDIFF et al., 1993; WHEELER et al., 1994; KOOHMARAIE et al., 1994), pois estes animais, quando comparados aos de origem britânica, possuem maior quantidade da calpastatina. Assim, a atividade da calpastatina 24 horas *post mortem* seria a possível causa da diferença existente entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus* (SHACKELFORD et al., 1991).

Alguns modelos sustentam a associação da calpastatina com maior eficiência de crescimento muscular em ovinos Callipyge (KOOHMARAIE et al., 1995); touros (MORGAN et al., 1993) e em animais recebendo beta-adrenérgicos (WHEELER & KOOHMARAIE, 1992; KILLEFER & KOOHMARAIE, 1994). O antagonismo genético entre rendimento de cortes cárneos e a atividade da calpastatina pós *rigor mortis* (SHACKELFORD et al., 1994), demonstra existir relação entre calpastatina e favorecimento da massa muscular em detrimento da gordura na carcaça. Muitos estudos demonstram que, no músculo vivo, quando se detecta uma redução na degradação da

proteína, há, concomitante, aumento da atividade da enzima calpastatina (WHEELER & KOOHMARAIE 1992; MORGAN et al., 1993). No entanto, o aumento do *turnover* protéico, conseguido por aumento da taxa de degradação também pode ser característico de animais de desenvolvimento muscular exacerbado (KOOHMARAIE, 2002). Assim suspeita-se também de forte relação entre as calpaínas ( $\mu$  e m-calpaína) e o crescimento animal, sendo necessários mais estudos nesta área (SHACKELFORD et al., 1994).

Por ser a área de qualidade de carne bastante recente, e estar em franco desenvolvimento, existem poucos trabalhos na literatura relacionando os polimorfismos gênicos da Calpaína II (m-calpaína) e da Calpastatina com as características de produção de bovinos de corte (ZHANG et al., 1996; CHUNG et al., 2001). Ainda, a dificuldade em se medir a maciez de uma carne, mesmo de maneira experimental é muito grande, sendo privilégio de poucos centros de pesquisa no Brasil. Como as pesquisas sobre a ação do complexo enzimático na maciez da carne bovina ainda não estão totalmente elucidadas, há necessidade de estudos da biotecnologia aplicada, que avaliando polimorfismos gênicos nas características de produção, possibilitariam novas ferramentas para seleção em bovinos de corte, contribuindo em muito para o melhoramento genético tradicional.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo do polimorfismo na seqüência do DNA dos genes da Calpaína (CAPN2/*HhaI*) e da Calpastatina (CALP/*XmnI*) e sua associação com os índices mais importantes de crescimento, qualidade da carcaça e carne de 300 bovinos de corte, de diversos grupos genéticos, submetidos ao Sistema de Produção do Novilho Superprecoce.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais.

O projeto foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) do Departamento de Genética do Instituto de Biociências, ambos da UNESP/Botucatu-SP.

Para a análise experimental foram colhidas amostras de sangue de 300 animais dos seguintes grupos genéticos: 126 animais Angus x Nelore, 10 Angus puro, 18 Brangus (3/8 Nelore x 5/8 Angus), 24 Simental x Nelore, 12 Simental puro, 11 Simbrasil (3/8 Nelore e 5/8 Simental), 17 Santa Gertrudes x Nelore, 18 Pardo-suíço x Nelore, 12 Canchim, 16 Brahman x Nelore e 36 Nelore puro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os bezerros foram desmamados aos 210 dias de idade em sistema *creep-feeding*. No início do experimento, todos os animais foram identificados individualmente, tratados contra endo e ectoparasitas e distribuídos aos currais de confinamento, com cinco animais cada, de acordo com o grupo genético e tamanho, sendo alimentados com dietas formuladas segundo as normas do NRC (1996), para ganhos de pesos médios diários acima de 1,2 kg. Os dados de três anos de confinamento experimental foram utilizados, e embora houvesse diferenças entre o tempo de confinamento por grupo genético e por ano avaliado, em média, todos os animais amostrados foram abatidos após 120 dias.

Os animais foram pesados no início do confinamento (**PI**) e próximo ao abate (**PF**). O ganho de peso médio diário (**GPMD**) foi calculado pela média de ganho de peso entre todas as pesagens. As medidas de área de olho de lombo, ou seja, área do músculo *Longissimus dorsi* (**AOL**), cobertura de gordura subcutânea sobre a AOL (**EGS**) e cobertura de gordura subcutânea sobre a garupa (**EGAR**) foram avaliadas por ultra-sonografia, conforme o método de HERRING et al. (1992), utilizando um aparelho de ultra-sonografia veterinária PIE MEDICAL - Scanner 200, com uma sonda linear de 17,2 cm e 3,5 MHz (*Sector Curved Array Scanner*, modelo 51B04UM02), na ocasião da última pesagem. As imagens foram analisadas em *softwares* específicos para o aparelho (PIE MEDICAL, Inc.).

O critério de abate utilizado foi peso final mínimo de 450 kg e EGS mínima de 3

milímetros (mm), monitorado por ultra-sonografia para todos os grupos genéticos. No momento do abate foram medidos o peso da carcaça quente (**PCQ**). Após o abate, as carcaças foram identificadas, pesadas e resfriadas por 24 horas. Foram determinados os pesos dos cortes Contra-filé (**Contra-filé**) e Lagarto (**Lagarto**), Músculo (**Músculo**), Patinho (**Patinho**), Coxão mole (**CxMole**), Coxão duro (**CxDuro**), Filé mignon (**Fmignon**) e Fraldinha (**Fraldinha**), durante a desossa, como indicativos dos cortes cárneos comerciais da carcaça. O peso do Corte Contra-filé compreendeu a porção entre a 6<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> costela.

Foram coletadas, após o resfriamento, amostras da seção da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para a obtenção da medida de área de olho-de-lombo (**AOL**) e gordura de cobertura (**EGS**) na carcaça, força de cisalhamento (**FC**), como medida objetiva da maciez da carne, e perdas por cozimento. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, onde as peças permaneceram armazenadas sob resfriamento de - 5° C, sendo a AOL obtida através da utilização da régua de quadrantes de pontos (LUCHIARI FILHO, A.; 2000), e a EGS através de mensuração com paquímetro. Foram realizadas análises laboratoriais para a determinação da maciez e das perdas por cozimento no Laboratório de Carnes da UNESP/Botucatu-SP, segundo metodologia proposta por SHACKELFORD et al. (1991).

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para analisar os polimorfismos genéticos, sendo o DNA extraído do sangue através do *kit* de extração *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (AMERSHAM PHARMACIA). A presença de marcadores moleculares no DNA genômico foi analisada no gene da Calpaína (CAPN2), no sítio de restrição da enzima *HhaI*, segundo metodologia de ZHANG et al. (1996), e no gene da Calpastatina (CALP), no sítio de restrição da enzima *XmnI*, segundo metodologia de CHUNG et al. (2001). Os *primers* necessários para a amplificação das regiões de interesse, bem como as enzimas de restrição necessárias para a digestão dos fragmentos amplificados de cada região foram determinados com base na literatura.

### **Extração do DNA e genotipagem.**

Amostras de 5 ml de sangue total foram colhidas por flebocentese da jugular esquerda, na região do pescoço, utilizando-se tubos a vácuo, contendo 7,5 mg de EDTA. A extração do DNA genômico utilizando-se o *Genomic Prep<sup>TM</sup> Blood DNA Isolation kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) foi feita a partir de uma alíquota de 300 µL de sangue total. A quantidade e a integridade das moléculas de DNA foram avaliadas em gel de agarose a 0,8%.

A genotipagem dos animais foi feita pela técnica de PCR-RFLP e eletroforese em gel de agarose (2%), nos genes da m-Calpaína (**CAPN2**) e da Calpastatina (**CALP**). Os polimorfismos estudados, os cromossomos de localização dos genes, os *primers* e as temperaturas de anelamento necessárias à amplificação das regiões de interesse, estão apresentados na Tabela 17.

Para a identificação dos alelos A e B do gene da Calpaína (**CAPN2**), um segmento de 1800 pares de bases desse gene foi amplificado pela técnica de PCR, e em seguida digerido com a enzima de restrição *HhaI*. O alelo A foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 620 e 900 pares de bases. O alelo B não apresenta digestão do fragmento amplificado, e é caracterizado como um fragmento de 1520 pares de bases. Os heterozigotos AB foram caracterizados pela presença de três bandas, correspondente à combinação dos dois padrões descritos anteriormente.

Para a identificação dos alelos A e B do gene da Calpastatina (**CALP**), um segmento de 2000 pares de bases desse gene foi amplificado pela técnica de PCR, e em seguida digerido com a enzima de restrição *XmnI*. O alelo A foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, com 600 e 1000 pares de bases. O alelo B indica a não digestão do fragmento amplificado, e é caracterizado como um fragmento de 2000 pares de bases. Os heterozigotos AB foram caracterizados pela presença de três bandas, correspondente à combinação dos dois padrões descritos anteriormente.

Cada PCR foi feita em um volume final de 25 µL e a mistura para amplificação foi constituída de: 50 ng de DNA genômico; 0,20 µM de cada *primer*; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase. As amplificações consistiram de 5 passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla à 94°C por 4 minutos; (2) desnaturação à 94°C por 1 minuto; (3) anelamento dos *primers* entre 54 e 66°C, dependendo da constituição dos mesmos, por 45 segundos;

(4) extensão à 72°C por 1 minuto e (5) extensão final à 72°C por 4 minutos. Os passos 2, 3 e 4, constituem um ciclo, que foi repetido por 35 vezes. Os fragmentos amplificados foram digeridos em meio de reação contendo 10µL de produto de PCR e 3U de enzima de restrição. As misturas para digestão foram incubadas em termociclador à 37°C por 4 horas. Após a digestão dos produtos amplificados, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose à 2%, em um sistema de eletroforese horizontal. Um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos amplificados e digeridos. Esses fragmentos de DNA foram visualizados no gel de agarose por meio de coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. A documentação dos géis, para posterior análise dos dados, foi feita utilizando-se um sistema digital de fotodocumentação. Os genótipos dos indivíduos foram determinados, para cada polimorfismo, por meio da análise do tamanho dos fragmentos em pb.

#### **Análise Estatística.**

A partir dos genótipos identificados nos géis foram calculadas, de acordo com WEIR (1990), as frequências genotípicas e alélicas para cada um dos polimorfismos.

Nos estudos de associação, as características de interesse foram analisadas utilizando-se o procedimento GLM (*General Linear Model*) do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1987) e as médias dos quadrados mínimos dos genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey. O modelo linear para ajuste das variáveis quantitativas incluiu além do efeito do genótipo, o efeito de grupo contemporâneo que considerou a interação entre grupos genéticos (1,...,4), ano de confinamento (1,...,3) e fazendas de origem (1,...,6), como segue:  $Y_{ijk} = \mu + G_i + GC_j + e_{ijk}$ , onde  $Y_{ijk}$  = característica de produção,  $\mu$  = média geral,  $G_i$  = efeito fixo do  $i$  étimo genótipo,  $GC_j$  = efeito fixo do  $j$  étimo grupo contemporâneo, e  $e_{ijk}$  = erro aleatório.

Foram excluídos das análises grupos genéticos que apresentaram genótipo único e genótipos cujas frequências foram muito baixas (menor que 0,10) na amostra total de animais estudados, como foi o caso do genótipo AA do polimorfismo CAPN2/*HhaI* do gene da Calpaína na população estudada. Também foram retirados das análises dados de animais cujos genótipos apresentavam frequência muito baixa dentro do grupo genético.



O efeito de touro não foi incluído no modelo linear uma vez que o número de animais genotipados filhos dos mesmos touros era muito pequeno (em média 8,5). Em razão desse grande número de pais, a possibilidade de confundimento entre efeito de genótipo e de touro nas características de produção fica diminuída.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados das frequências genóticas e alélicas para ambos polimorfismos gênicos, da Calpaína e da Calpastatina, estão apresentados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente. O polimorfismo CAPN2/*HhaI* foi descrito por ZHANG et al., (1996) na subunidade regulatória do gene Calpaína II (incluindo o 4° até o final 5° do 8° exon), enquanto que o polimorfismo CALP/*XmnI*, descrito no gene da Calpastatina localizado no cromossomo 7, está na posição de 117,8 cM<sup>3</sup> do íntron 6 (CHUNG et al., 2001).

Conforme pode ser observado na Tabela 18, constata-se que os animais da raça Angus obtiveram os maiores valores de frequência do alelo A para o gene da Calpaína. Este resultado está de acordo com o estudo de ZHANG et al., (1996), no qual foi observado que a frequência do alelo A é sempre superior em raças precoces como Angus, Hereford e Wagyu, sugerindo ser resultado do tipo de seleção os quais estes animais foram submetidos. A frequência do alelo B para a raça Angus deste estudo (0,31) foi superior ao valor encontrado para a mesma raça (0,05) em trabalho de ZHANG et al. (1996).

O restante dos grupos genéticos envolvidos nesta pesquisa apresentou superioridade para a frequência do alelo B (Tabela 18). Foi especulada a existência de tendência das raças zebuínas e continentais demonstrarem sempre valores de frequência muito superiores para o alelo B (0,90 a 0,94) (ZHANG et al., 1996). Como a maioria dos grupos genéticos estudados tinha algum cruzamento ou grau de sangue zebuíno (Nelore) na sua própria formação (Tabela 18), esta constatação explicaria os resultados obtidos.

No trabalho de ZHANG et al. (1996), as frequências genóticas médias de 13 raças de bovinos foram de 0,35; 0,40; 0,25 para os genótipos AA, AB e BB, respectivamente. Neste estudo, avaliando 11 grupos genéticos, a frequência genotípica AA foi muito inferior (0,06), e a do BB muito superior (0,45), ao encontrado por ZHANG et al. (1996), provavelmente devido ao cruzamento ou algum grau de sangue zebuíno que a maioria dos grupos genéticos continham na sua formação (Tabela 18).

Provavelmente por algum problema que ocorreu no manuseio das amostras de DNA dos grupos genéticos Canchim, ½ Santa Gertrudes Nelore e ½ Brahman Nelore, este polimorfismo (CAPN2) não pode ser visualizado. Desta forma, ao final do trabalho,

conseguiu-se a genotipagem de 206 animais para o polimorfismo CAPN2/*HhaI* (Tabela 18).

Conforme pode ser observado na Tabela 19, os animais da raça Angus e Brangus apresentaram superioridade para a frequência do alelo A (0,85 e 0,86, respectivamente), tendência esta que corrobora o trabalho de CHUNG et al. (2001), cujas frequências dos alelos A e B foram de 0,75 e 0,25, respectivamente, para o polimorfismo CALP/*XmnI* em Angus. No entanto, ao se observar os animais ½ Angus Nelore, percebe-se um aumento considerável na frequência do alelo B (0,45). Este aumento pode ser creditado ao cruzamento com raças zebuínas, já que os animais Nelore e ½ Brahman Nelore apresentaram frequências do alelo B superiores a frequência do alelo A (0,56 e 0,63, respectivamente), embora em alguns cruzamentos a frequência do alelo B seja ainda maior que nos zebuínos puros. A presença do alelo A do polimorfismo do gene da Calpastatina é constantemente relacionada à produção de carnes macias, e a maior frequência do alelo B indica a produção de carne com maciez comprometida (CHUNG et al., 2001).

As diferenças em frequências obtidas para os animais da raça Simental e Angus podem ser resultado dos diferentes tipos de seleção sofridos pelas raças, já que a raça Angus é a representante mais precoce de todos os grupos genéticos envolvidos nesta pesquisa, e no caso da raça Simental, por ser de origem continental, esta necessita de um tempo maior para atingir a maturidade e conseqüentemente, iniciar o processo de deposição de gordura (OWENS et al., 1993), possuindo uma carcaça com menor grau de acabamento na ocasião do abate.

Desta forma, especula-se que a relação significativa entre o alelo A e a maciez da carne bovina também pode ser atribuída parcialmente à EGS da carcaça. Sabe-se que se a carcaça não possuir um mínimo de 5 mm de gordura de cobertura para sua proteção durante o contato com o resfriamento intenso das câmaras frigoríficas, ocorre o escurecimento, desidratação e endurecimento da carne (“cold toughening”), que causa severos prejuízos à indústria frigorífica (LUCHIARI FILHO, 2000). Como, geralmente, espera-se que as raças precoces iniciem o processo de deposição de EGS antes do que raças tardias (OWENS et al., 1993), estas possuem mais facilmente suficiente EGS na carcaça no momento do abate, evitando comprometimentos nos seus valores de maciez, ocasionado por esta variável. Desta forma, a precocidade de acabamento em conjunto,

com o tipo de seleção genética que possibilita as raças precoces possuir menor quantidade da enzima calpastatina no metabolismo *post mortem* (SHACKELFORD et al., 1991), acaba por classificar as raças britânicas, como as principais raças produtoras da carne macia, corroborando com a associação do alelo A e a maciez. Para o polimorfismo *CALP/XmnI*, conseguiu-se, ao final do trabalho, a genotipagem de 294 animais (Tabela 19). As comparações entre as médias dos quadrados mínimos das variáveis quantitativas de crescimento, carcaça e carne para os genótipos dos polimorfismos *CAPN2/HhaI* e *CALP/XmnI* são apresentados nas Tabelas 20, 21 e 22 respectivamente.

Já se sabe que grande parte da responsabilidade da variação na maciez deve-se às diferenças encontradas no complexo enzimático “calpaína-calpastatina”, que atua na carne após o abate do animal. A calpastatina é responsável pela inativação das enzimas calpaínas (amaciadoras da carne), sendo assim em sua plena atividade, potencial inibidora da maciez da carne. O polimorfismo *CAPN2/HhaI* classifica os animais em duas variantes genéticas (A e B). Apesar da importância do gene da Calpaína na qualidade da carne, a presença do alelo A ou B do polimorfismo *CAPN2/HhaI* nunca foi relacionada anteriormente com as características de crescimento, carcaça e maciez da carne (ZHANG et al., 1996).

No entanto, ao se avaliar características de crescimento, o polimorfismo *CAPN2/HhaI* influenciou em importantes variáveis tais como PI, PF, AOL e EGS por ultrassom (Tabela 20). Desta forma pode ser constatado que animais de genótipos AB possuíam superioridade em relação aos indivíduos BB, quanto a todas estas características, sugerindo existir uma superioridade do desenvolvimento muscular em animais portadores do alelo A (Tabela 20). Acredita-se que o alelo A é mais freqüente em raças mais precoces, como Angus, Hereford e Wagyu (ZHANG et al., 1996). No entanto, devido ao baixo número de indivíduos AA na população estudada, este genótipo teve que ser retirado das análises estatísticas, que impossibilitou avaliar o efeito do genótipo AA nas características de crescimento, carcaça e carne destes animais. Nos estudos de polimorfismo da Calpastatina, são encontrados três genótipos; AA, AB e BB (CHUNG ET AL., 2001). Ao se relacionar os genótipos obtidos para o polimorfismo *CALP/XmnI* e as características de crescimento, não ficou constatada nenhuma diferença significativa (Tabela 20).

A superioridade do genótipo AB sobre o BB no polimorfismo CAPN2/*Hha*I também foi observada quando passou a se avaliar as características de carcaça (Tabela 21). Assim, animais AB possuíam maiores valores de RC e PCQ que os animais BB ( $P < 0,01$ ). O polimorfismo do gene da Calpaína influenciou também na largura da carcaça (Tabela 21), cujos animais AB possuíam carcaça mais largas que os indivíduos BB ( $P < 0,05$ ). No entanto, ao se avaliar as características de qualidade de carne (Tabela 22), percebe-se que os animais BB demonstraram os maiores valores de peso do Contra-filé e força de cisalhamento (FC) que os animais AB ( $P < 0,01$ ). O maior valor de FC encontrado na Tabela 22 indica a força necessária para rompimento das fibras musculares de amostra de *Longissimus dorsi* de 12,7 mm de diâmetro. Esta é metodologia aceita para obtenção de um valor objetivo de maciez (SHACKELFORD et al., 1991). Assim, quanto maior o valor de FC encontrado (Tabela 22), menos macia é a carne. Neste caso, os animais portadores do genótipo BB demonstraram carne menos macia que os indivíduos AB ( $P < 0,01$ ). Este resultado pode ser explicado pela maior frequência do genótipo BB em população *Bos indicus*, pois postula-se que animais com mais de 25% de sangue zebuíno possuem prejuízos na maciez da carne, quando comparado aos animais *Bos taurus*, graças as diferentes maneiras de atuação do complexo enzimático “calpaína-calpastatina” no *post mortem* (KOOHMARAIE et al., 2003). No entanto, apesar do genótipo AB produzir carne mais macia que o genótipo BB ( $P < 0,01$ ), ambos são responsáveis pela produção de carnes consideradas desejáveis ao consumo humano, já que valores de FC abaixo de 5 kg são considerados adequados ao consumo, sendo os valores abaixo de 3,9 kg, considerados muito macios (FELÍCIO, 2001). No entanto, em relação aos pesos dos cortes cárneos do Músculo, Patinho e Coxão Duro, verificou-se, a superioridade dos animais portadores do genótipo AB, quando comparados aos indivíduos BB ( $P < 0,01$ ).

A ausência de significância dos efeitos deste polimorfismo em características de carne observada no trabalho de CHUNG et al., (2001), foi também demonstrada ao avaliar as características mais importantes da qualidade da carne no presente trabalho, não existindo nenhum efeito dos alelos A ou B na força de cisalhamento (FC) e nos cortes cárneos comerciais da carcaça (Tabela 22). Acreditava-se que os animais de raças precoces possuem maior frequência do alelo A, sendo este alelo significativamente correlacionado à produção de carnes macias (CHUNG et al., 2001). Mesmo havendo

um número considerável de animais descendentes da raça Angus, não ocorreram, nesta pesquisa, diferenças significativas entre os genótipos AA e AB e a maciez da carne, conforme esperado (Tabela 22). Talvez a inexistência de um número maior de indivíduos portadores do genótipo em homozigose para o alelo A, explique parte deste resultado, já que somente os animais da raça Angus puro possuíam alta frequência genotípica AA (Tabela 19), sendo que estes representavam apenas 10 animais da população. Como o objetivo deste trabalho foi detectar efeitos dos genótipos comuns em todos os grupos genéticos estudados, talvez as próprias diferenças das interações do complexo enzimático “calpaína-calpastatina” entre taurinos e zebuínos possa explicar parte destas incongruências. Em geral, a falta de coerência entre as informações postuladas e obtidas demonstra a necessidade de maiores estudos avaliando o real efeito do polimorfismo da Calpastatina e as características mais importantes de bovinos de corte.

A ausência de efeito do gene da Calpastatina em todas as características avaliadas nesta pesquisa e o efeito significativo do polimorfismo *CAPN2/HhaI* e as características de PI, PF, AOL ultra-som, RC, PCQ, Largura, FC, peso dos cortes do Contra-filé, Músculo e Coxão duro, incorrem em novo modelo de crescimento muscular. Desta forma, dado a importância constatada do gene da m-Calpaína no desenvolvimento e nas principais características de carcaça e qualidade de carne, supõe-se que animais submetidos a sistemas intensivos de produção, possuem alto *turnover* protéico. Não se sabe a exata maneira de atuação do gene da m-Calpaína nesta nova proposta de crescimento muscular, pois sua ação pode compreender o tamponamento da ação inibidora da Calpastatina, permitindo maior atuação da  $\mu$ -Calpaína no *turnover* protéico, aumentando-o, ou agindo simplesmente, juntamente com a  $\mu$ -Calpaína, no aumento do *turnover* protéico, mesmo considerando que grande parte dos grupos utilizados tem sangue zebu, com grande quantidade de Calpastatina, cujo polimorfismo no gene da Calpastatina não afetou nenhuma das características avaliadas.

## CONCLUSÕES

O polimorfismo do gene da m-Calpaína (*CAPN2/HhaI*) demonstrou relevantes associações com peso inicial, peso final, área de olho-de-lombo por ultra-som, rendimento de carcaça, peso da carcaça quente, força de cisalhamento, largura da carcaça e peso dos cortes do Contra-filé, Músculo e Coxão, comuns a todos os grupamentos genéticos envolvidos.

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que não existem efeitos do polimorfismo do gene da Calpastatina (*CALP/XmnI*) sobre as características de produção e qualidade de carne estudadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores deste trabalho agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa de estudos a autora Liliane Sugisawa

**Tabela 17** – Polimorfismos estudados, seqüência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados na amplificação das regiões gênicas de interesse, temperatura de anelamento dos *primers* (TA) e localização cromossômica dos genes (Cr).

<b>Polimorfismo</b>	<b>Seqüência dos <i>primers</i> 5'→3'</b>	<b>TA °C</b>	<b>Cr</b>
CAPN2/ <i>HhaI</i>	5'- CCCCTCGCACACATTACTCCAAC – 3' 5'- ATACGGCCTGCCACTTTTTGATG – 3'	57°	10
CALP/ <i>XmnI</i>	5'- AGCAGCCACCATCAGAGAAA – 3' 5'- TCAGCTGGTTCGGCAGAT– 3'	57°	7

**Tabela 18** - Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *HhaI* em um fragmento do gene Calpaína (CAPN2/*HhaI*).

<b>Grupo Genético</b>	<b>N</b>	<b>Freqüência Genotípica</b>			<b>Freqüência Alélica</b>	
		<b>AA</b>	<b>AB</b>	<b>BB</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Angus	8	0,37	0,63	0,00	0,69	0,31
Brangus	1	0,00	1,00	0,00	0,50	0,50
½ Angus Nelore	116	0,06	0,54	0,40	0,33	0,67
Simental	9	0,11	0,44	0,44	0,33	0,67
Simbrasil	11	0,00	0,27	0,73	0,14	0,86
½ Simental Nelore	23	0,00	0,65	0,35	0,33	0,67
Canchim	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
½ Pardo Suíço Nelore	2	0,00	0,50	0,50	0,25	0,75
½ Santa Gertrudes Nelore	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
½ Brahman Nelore	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nelore	36	0,03	0,25	0,72	0,15	0,85
<b>Média</b>	206	0,06	0,49	0,45	0,30	0,70



**Tabela 19** - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo gerado pela enzima de restrição *XmnI* em um fragmento do gene Calpastatina (*CALP/XmnI*).

Grupo Genético	N	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
		AA	AB	BB	A	B
Angus	10	0,70	0,30	0,00	0,85	0,15
Brangus	18	0,72	0,28	0,00	0,86	0,14
½ Angus Nelore	120	0,28	0,53	0,19	0,55	0,45
Simental	11	0,36	0,36	0,27	0,55	0,45
Simbrasil	11	0,09	0,55	0,36	0,36	0,64
½ Simental Nelore	24	0,04	0,42	0,54	0,25	0,75
Canchim	12	0,50	0,42	0,08	0,71	0,29
½ Pardo Suíço Nelore	17	0,41	0,41	0,18	0,62	0,38
½ Santa Gertrudes Nelore	16	0,31	0,50	0,19	0,56	0,44
½ Brahman Nelore	16	0,06	0,63	0,31	0,38	0,63
Nelore	39	0,08	0,72	0,21	0,44	0,56
<b>Média</b>	294	0,28	0,51	0,21	0,53	0,47

**Tabela 20.** Médias dos quadrados mínimos das características de crescimento para os genótipos dos polimorfismos *CAPN2/HhaI* e *CALP/XmnI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de Crescimento					
		PI (kg)	PF (kg)	GPMD (kg/d)	AOL ultra-som (cm <sup>2</sup> )	EGS ultra-som (mm)	EGAR ultra-som (mm)
<i>CAPN2/HhaI</i> *	AB	322,18 <sup>A</sup> (54)	488,36 <sup>A</sup> (54)	1,32 <sup>A</sup> (54)	74,55 <sup>A</sup> (54)	5,01 <sup>A</sup> (54)	6,01 <sup>A</sup> (51)
	BB	309,38 <sup>B</sup> (90)	471,60 <sup>B</sup> (90)	1,28 <sup>A</sup> (90)	72,21 <sup>B</sup> (89)	4,52 <sup>B</sup> (89)	6,09 <sup>A</sup> (76)
<i>CALP/XmnI</i>	AA	300,62 <sup>A</sup> (79)	474,24 <sup>A</sup> (78)	1,25 <sup>A</sup> (78)	72,08 <sup>A</sup> (76)	4,59 <sup>A</sup> (76)	5,84 <sup>A</sup> (61)
	AB	299,02 <sup>A</sup> (147)	473,93 <sup>A</sup> (147)	1,28 <sup>A</sup> (147)	71,60 <sup>A</sup> (146)	4,70 <sup>A</sup> (146)	6,27 <sup>A</sup> (129)
	BB	298,43 <sup>A</sup> (62)	476,12 <sup>A</sup> (62)	1,31 <sup>A</sup> (62)	73,07 <sup>A</sup> (62)	5,08 <sup>A</sup> (62)	6,42 <sup>A</sup> (57)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo AA do polimorfismo *CAPN2/HhaI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

**Tabela 21.** Médias dos quadrados mínimos das características de carcaça para os genótipos dos polimorfismos *CAPN2/HhaI* e *CALP/XmnI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Características de carcaça					
		RC (%)	PCQ (kg)	LARG (cm)	COMP (cm)	AOL (cm <sup>2</sup> )	EGS (mm)
<i>CAPN2/HhaI</i> *	AB	55,82 <sup>A</sup> (76)	272,49 <sup>A</sup> (54)	35,58 <sup>A</sup> (54)	135,34 <sup>A</sup> (54)	78,28 <sup>A</sup> (32)	4,37 <sup>A</sup> (32)
	BB	54,91 <sup>B</sup> (76)	258,81 <sup>B</sup> (90)	34,30 <sup>B</sup> (90)	133,57 <sup>A</sup> (90)	75,98 <sup>A</sup> (64)	4,44 <sup>A</sup> (64)
<i>CALP/XmnI</i>	AA	55,32 <sup>A</sup> (75)	261,73 <sup>A</sup> (75)	35,46 <sup>A</sup> (58)	133,31 <sup>A</sup> (58)	77,15 <sup>A</sup> (58)	4,52 <sup>A</sup> (58)
	AB	55,11 <sup>A</sup> (139)	262,66 <sup>A</sup> (139)	35,50 <sup>A</sup> (119)	133,54 <sup>A</sup> (119)	76,17 <sup>A</sup> (120)	4,34 <sup>A</sup> (119)
	BB	55,14 <sup>A</sup> (52)	263,47 <sup>A</sup> (52)	34,72 <sup>A</sup> (35)	133,37 <sup>A</sup> (35)	76,35 <sup>A</sup> (35)	4,63 <sup>A</sup> (35)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo AA do polimorfismo *CAPN2/HhaI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

**Tabela 22.** Médias dos quadrados mínimos das características da qualidade de carne para os genótipos dos polimorfismos *CAPN2/HhaI* e *CALP/XmnI* e número de animais comparados de cada genótipo (n).

Polimorfismo	Genótipos	Qualidade de carne						
		FC (kg)	Contra- filé (kg)	Lagarto (kg)	Músculo (kg)	Patinho (kg)	Cx Mole (kg)	Cx Duro (kg)
<i>CAPN2/HhaI</i> *	AB	3,76 <sup>B</sup> (30)	3,28 <sup>B</sup> (17)	2,43 <sup>A</sup> (27)	4,15 <sup>A</sup> (26)	5,10 <sup>A</sup> (26)	8,75 <sup>A</sup> (27)	4,97 <sup>A</sup> (27)
	BB	4,18 <sup>A</sup> (49)	3,53 <sup>A</sup> (30)	2,38 <sup>A</sup> (48)	3,87 <sup>B</sup> (49)	4,83 <sup>A</sup> (48)	8,56 <sup>A</sup> (49)	4,71 <sup>B</sup> (48)
<i>CALP/XmnI</i>	AA	3,75 <sup>A</sup> (51)	3,57 <sup>A</sup> (36)	2,38 <sup>A</sup> (48)	3,96 <sup>A</sup> (48)	4,95 <sup>A</sup> (48)	8,54 <sup>A</sup> (48)	4,72 <sup>A</sup> (48)
	AB	3,68 <sup>A</sup> (94)	3,79 <sup>A</sup> (60)	2,38 <sup>A</sup> (87)	3,98 <sup>A</sup> (86)	4,87 <sup>A</sup> (86)	8,55 <sup>A</sup> (87)	4,74 <sup>A</sup> (87)
	BB	3,74 <sup>A</sup> (45)	3,73 <sup>A</sup> (24)	2,34 <sup>A</sup> (36)	3,90 <sup>A</sup> (36)	4,79 <sup>A</sup> (36)	8,46 <sup>A</sup> (36)	4,76 <sup>A</sup> (36)

<sup>A,B,C</sup> Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (P<0,01)

\* O genótipo AA do polimorfismo *CAPN2/HhaI* foi retirado das análises estatísticas devido a baixa frequência na população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARENSE, W.; BUNCH, R.; THOMAS, M. et al. The TG5 DNA Marker Test for marbling capacity in Australian feeflot Cattle. CSIRO Molecular Genetics Centre Level 3 - Austrália, 2004.
- BRACKEBUSCH, S. A., McKEITH, F. K., CARR, T. R. et al. Relationship between longissimus composition and the composition of other major muscles of the beef carcass. **Journal of Animal Science**, v. 1, p. 69-631, 1991.
- BURINI, D. C. M. Estudo da proteólise miofibrilar e das características de qualidade de carne de bovinos *Bos indicus* submetidos ao modelo biológico superprecoce. Dissertação FMVZ/UNESP-Botucatu/SP. 60 p. Fevereiro/2004.
- CIOBANU, D.C.; BASTIAANSEN, J.W.M.; LONERGAN, S.M. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v.82, p. 2829-2839, 2004.
- CROALL, D. E. & DeMARTINO, G. N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: Structure, function, and regulation. **Physiology Rev.**, v.71, p813, 1991
- CROUSE, J. D., CUNDIFF, L. V., KOCH, R. M. et al. Comparison of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, v.67, p. 2661, 1989.
- CUNDIFF, L. V., KOCH, R. M., GREGORY, K. E. et al. Characteristics of diverse breeds in Cycle IV of the cattle germoplasm evaluation program. **Beef Research Progress Reports**, n. 4, USDA, ARS, Clay Center, NE. 1993.
- CURI, P.R. & MORAES, R.V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. **Ciência e cultura**, v.33, p.712-722, 1981.
- CHUNG, H. Y., DAVIS, M. E.; HINES, H. C. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. **Animal Genetics**, v. 32, p.40-53, 2001.
- DEVITT, C. J. B.; WILTON, J. W.; MANDELL, I. B. et al. Genetic evaluation of tenderness of the *Longissimus* in the multi-breed populations of beef cattle and the implications of selection. **Proceedings: 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied in Livestock Production**, p.19-23, 2002.

- DRANSFIELD, E. Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. **Meat Science**, v. 12, p.36-105. 1994.
- FELÍCIO, P.E. Qualidade da carne Nelore e o mercado mundial. [File:///D:/palestras/pedro\\_felicio.html](File:///D:/palestras/pedro_felicio.html), 01/01/2001.
- GEESINK, G. H., KOOLMEES, P. A., VAN LAACK, H. L. J. M. et al. Determinants of tenderization in beef Longissimus dorsi e Triceps brachii muscles. **Meat Science**, v. 23, p. 41-7, 1995.
- GENENOTE4 - GeneStar Tenderness - Genetic Solutions Ltd - Austrália <http://www.geneticsolutions.com.au>, 01/01/2004.
- GENENOTE7 - GENESTAR TENDERNESS 2 - Genetic Solutions Ltd - Austrália <http://www.geneticsolutions.com.au>, 01/01/2004.
- HADLICH, J. C. Metodologias de análise de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idades. Dissertação FMVZ/UNESP-Botucatu/SP. 94 f. Fevereiro/2004.
- HERRING, W. O.; MILLER, D. C.; BERTRAND, J. K. et al. Evaluation of machine, technician, and interpreter effects on ultrasonic measures of backfat and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 2216-2226, 1992.
- HUFF-LONERGAN, E., PARRISH, JR. F. C., ROBSON, R. M. Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 28, p. 73-1064, 1995.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Site: [www.ibge.org.br](http://www.ibge.org.br), 2002.
- KIEFFER, N. M.; CARTWRIGTH, T. C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. **Journal of Heredity**, v. 59, p.35-37, 1968.
- KOCH, R. M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D. Characterization of biological typed of cattle (Cycle III). III. Carcass composition, quality and palatability. **Journal of Animal Science**. p. 54-55, 1982.
- KOOHMARAIE, M. et al. Managing meat tenderness. **Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40º**, (CD room), 2003.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, p. 36-93, 1994.

- KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. **Proc. Recip. Meat Conf.**, p. 45-63, 1992.
- KOOHMARAIE, M. The role of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. **Biochemistry**, p. 74-239. 1992.
- KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Proc. Recip. Meat Conf.** , p. 41-89. 1988.
- KOOHMARAIE, M., DOUMIT, M. E., WHEELER, T. L. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2935. 1996.
- KOOHMARAIE, M., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: Regulation and prediction. **Proc. NCA Cattleman's College**. Reno. NV. 1994.
- KOOHMARAIE, M., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S.D. et al. Eliminating inconsistent beef tenderness with calcium-activated tenderization. **Proc. Nebraska Cattleman's Assoc. Workshop**. Kearney. NE. 1993.
- LUCHIARI FILHO, A. **A pecuária da carne bovina**. São Paulo: LinBife, 2000. 134 p.
- MORGAN, J. B., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M. et al. D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the Longissimus muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1471, 1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL.. Nutrient requirements of beef cattle. 7. ed. Washington: Academy Press, 1996. 242p.
- OWENS, F.N.; DUBESKI, P.; HANSON, C.F. Factor that alter the growth and development of ruminants. **Journal of Animal Science**, v.71, p. 3138- 3150, 1993.
- PAGE, B.T.; CASAS, E.; HEATON, M.P. et al. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 3077-3085, 2002.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT<sup>TM</sup> guide for personal computers. 6.ed. Cary, 1987. 1028p.
- SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford x Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.

- SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V. et al. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 857-863, 1994.
- SILVEIRA, A.C.; ARRIGONI, M.D.B.; CHARDULO, L.A.L. et al. Sistema de produção de novilhos superprecoce. **In: Simpósio Goiano Sobre Produção De Bovinos De Corte, 1.**, Goiânia. Anais. Goiânia: CBNA, 1999. p.105-122., 1999.
- SUGUISAWA, L. Ultra-sonografia para predição das características e composição da carcaça de bovinos. Dissertação. ESALQ/USP. 70 p. Março/2002.
- SUGUISAWA, L.; SOUTELLO, R.V.G.; SILVA, C.L.S.P. et al. Utilização de marcadores moleculares para qualidade de carne em bovinos de corte. **Ciências Agrárias e da Saúde**, v.2, n.2, p.43-46, 2002b.
- SUGUISAWA, L.; CURI, R.A., SILVEIRA, A.C. et al. Polimorfismo do gene da Calpastatina e da Leptina como indicadores do potencial produtivo de bovinos de corte. **Anais da 41ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 2004 (CD room).
- TAYLOR, J. F., COUTINHO, L. L., HERRING, K. L. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194-201, 1998.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates: Massachusetts, 1990. 377p.
- WHEELER, T. L., CUNDIFF, L. V., KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* x *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v.72, p. 3145. 1994.
- WULF, D.M.; TATUM, J.D.; GREEN, R.D. et al. Genetic influences on beef longissimus palatability in Charolais and Limousin sired steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2394-2405, 1996.
- ZHANG, H.M.; DENISE, S.K.; AX, R.L. Rapid communication: a novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1441, 1996.