

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE QTL PARA MACIEZ DA CARNE EM
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Camila Urbano Braz
Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE QTL PARA MACIEZ DA CARNE EM
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Camila Urbano Braz

Orientador: Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Genética e Melhoramento Animal**

2016

Braz, Camila Urbano
B827d Detecção de QTL para maciez da carne em bovinos da raça
Nelore / Camila Urbano Braz. -- Jaboticabal, 2016
xix, 81 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Henrique Nunes de Oliveira

Banca examinadora: Fernando Sebastián Baldi Rey, Maria
Eugênia Zerlotti Mercadante, Nedenia Bonvino Stafuzza, Ricardo
Vieira Ventura

Bibliografia

1. Análise de associação. 2. Bovino de corte. 3. Gene candidato.
4. Haplótipo. 5. Marcadores moleculares. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



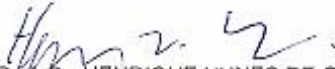
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

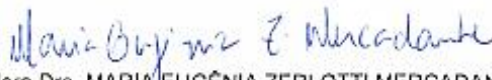
TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO DE QTL PARA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

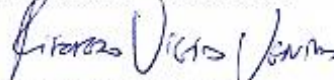
AUTORA: CAMILA URBANO BRAZ

ORIENTADOR: HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE
Instituto de Zootecnia / IZ - Sertãozinho/SP


Prof. Dr. RICARDO VIEIRA VENTURA
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Prof. Dr. FERNANDO SEBASTIAN BALDI REY
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-doutoranda NEDENIA BONVINCO DA AFUZZA
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 29 de julho de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Camila Urbano Braz, nascida em Araçatuba - SP em 25 de Maio de 1988, filha de Carlos Aparecido Braz e Marcia Maria Urbano de Souza. Iniciou o curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FEIS/UNESP), Ilha Solteira - SP, em Agosto de 2006, tornando-se Zootecnista em Fevereiro de 2011. Em Março de 2011, ingressou no curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal - SP, sob orientação do professor Dr. Humberto Tonhatti, tornando-se Mestre em Zootecnia em Julho de 2012. Em Agosto de 2012, iniciou o curso de Doutorado no programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/ UNESP), Jaboticabal - SP, sob orientação do professor Dr. Henrique Nunes de Oliveira. De Março de 2015 à Fevereiro de 2016, realizou estágio de Doutorado no exterior na University of Missouri, sob orientação do professor Dr. Jeremy Francis Taylor.

*“Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode e que o medo
impeça de tentar”.*

*Aos meus queridos pais Carlos e Márcia.
Ao Tiago, pelo companheirismo, carinho e dedicação.
A todos aqueles que me ajudaram a chegar até aqui.*

Dedico e Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar a minha caminhada.

À minha família, principalmente aos meus pais, Carlos e Marcia, ao meu irmão Rogério e minha cunhada Roberta, à minha sobrinha Ana Laura e aos meus tios e primos, por todo apoio, incentivo, suporte e carinho que me proporcionaram ao longo dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, pela orientação, atenção, paciência, confiança e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional a mim oferecidas.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Fernando Sebastián Baldi Rey, Dr^a. Nedenia Bonvino Stafuzza, Dr^a. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Dr. Ricardo Vieira Ventura, pelas importantes contribuições.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo n^o 2013/00035-9) e da bolsa de estágio de pesquisa no exterior (Processo n^o 2014/23013-3).

Ao Prof. Dr. Jerry Taylor pela orientação, atenção e valiosas discussões e sugestões durante o estágio na University of Missouri.

À todos os Pós-graduandos que fizeram e fazem parte do grupo de Melhoramento Animal da FCAV/Unesp, pelo aprendizado e trabalho.

Aos Pós-graduandos que ajudaram diretamente no meu projeto de Doutorado, Tiago Bresolin, Rafael Espigolan, Diogo Anastácio e Daniel Gordo.

À Prof^a. Dr^a. Lucia Galvão de Albuquerque, por permitir a utilização dos dados referente ao projeto de pesquisa a qual é responsável.

A todos os amigos que encontrei na cidade de Columbia, Missouri. Em especial à Fran, João, Ricardo, Guilherme, Mariana, Diane e Vivi.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	7
1.1 Introdução	7
1.2 Revisão de Literatura	9
1.2.1 Aspectos da bovinocultura de corte	9
1.2.2 Maciez da carne.....	10
1.2.3 O melhoramento genético e os marcadores moleculares	14
1.2.4 Genes candidatos	15
1.2.5 Haplótipos	16
1.3 Objetivos	18
1.4 Referências.....	19
CAPÍTULO 2 – Validação de genes candidatos para identificar QTL e mutações causais para maciez da carne em bovinos da raça Nelore	31
2.1 Introdução	33
2.2 Material e Métodos	35
2.2.1 Animais	35
2.2.2 Dados fenotípicos e genotípicos	35
2.2.3 Análises dos genes candidatos.....	36
2.2.4 Genotipagem e sequenciamento	38
2.2.5 Análises de associação.....	40
2.3 Resultados e Discussão.....	42
2.3.1 Análises dos genes candidatos.....	42
2.3.2 Análise de associação	45
2.4 Conclusões	57
2.5 Referências.....	58
CAPÍTULO 3 – Identificação de QTL para maciez da carne utilizando haplótipos construídos a partir de janelas sobrepostas na raça Nelore	69
2.6 Introdução	71
2.7 Material e Métodos	72
3.2.1 Animais	72

3.2.2	Dados fenotípicos e genotípicos	73
3.2.3	Construção dos haplótipos.....	74
3.2.4	Análises de associação genômica ampla	74
3.2.5	Variância genética aditiva	76
3.3	Resultados e Discussão.....	77
3.4	Conclusões	89
3.5	Referências.....	89

DETECÇÃO DE QTL PARA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO – O mercado consumidor tem sido cada vez mais exigente quanto à qualidade da carne e, portanto, a pecuária precisa melhorar sua eficiência e fornecer produtos diferenciados, padronizados e com qualidade. Entre as características de qualidade de carne, a maciez é a que mais influencia na satisfação dos consumidores. Considerando a importância dada à maciez da carne, pesquisas têm sido desenvolvidas para melhor compreender os mecanismos relacionados à expressão fenotípica desta característica. Os estudos de genes candidatos têm possibilitado a identificação de polimorfismos que modificam as estruturas das proteínas ou ainda, que estejam em desequilíbrio de ligação com alterações funcionais no DNA. Com a automatização dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) muitas regiões ao longo do genoma foram identificadas como responsáveis pela variação fenotípica da maciez da carne. No entanto, os marcadores SNPs podem ter baixa capacidade de identificar locos que atuam nas características quantitativas (QTL) por serem, na grande maioria, bi-alélicos e, mesmo que aconteçam mutações, as mudanças nas frequências alélicas dos SNPs podem permanecer quase inalteradas. Por outro lado, com a utilização de haplótipos, mutações tendem a causar mudanças nas frequências dos haplótipos, aumentando as chances de identificação dos QTL. Sendo assim, este estudo teve como objetivos detectar QTL e mutações causais em genes candidatos e identificar QTL por meio de uma análise de associação genômica ampla, para a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore, utilizando haplótipos como unidades fundamentais dos testes de associação. Foram utilizadas informações fenotípicas, genotípicas e de pedigree de animais provenientes de fazendas que integram os programas de melhoramento genético DeltaGen e PAINT. Cinquenta e dois genes candidatos foram escolhidos para serem analisados utilizando haplótipos construídos com base no desequilíbrio de ligação, utilizando 1.616 animais. Do total de haplótipos, dois foram significativos, sendo que os éxons próximos e dentro destes foram sequenciados visando buscar a mutação causal. O sequenciamento foi realizado com 298 animais e os SNPs identificados foram imputados para os 1.318 animais remanescentes. Foram realizadas análises de associação utilizando haplótipos construídos com base na metodologia de janelas sobrepostas, sendo que seus efeitos foram estimados pelo método *Genomic Best Linear Unbiased Predictor* (GBLUP). Os valores genéticos dos animais foram estimados para cada haplótipo e SNP e, após, as variâncias genéticas aditivas foram calculadas. Utilizando haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas, verificou-se que o aumento do número de SNPs no haplótipo permitiu capturar maior proporção da variância genética aditiva da característica maciez da carne. Seis possíveis QTL foram identificados explicando as maiores proporções de variância genética aditiva para maciez da carne, dos quais um está no gene *CAPN1* e cinco no gene *ASAP1*. Não houve evidências de que a mutação causal para a maciez da carne tenha sido identificada nos dois genes. Uma análise de associação genômica ampla foi realizada utilizando haplótipos construídos com base na metodologia de janelas sobrepostas de tamanhos variados. Foram utilizados nesta análise 1.405 animais genotipados com o painel Illumina Bovine HD e 1.756 animais genotipados com

painel de menor densidade (70 K Neogen) e, posteriormente, imputados para o painel HD, em um total de 3.161 animais analisados. Os efeitos dos haplótipos e SNPs foram estimados pelo método GBLUP e as variâncias genética aditivas de cada haplótipo e SNP foram calculadas. Os genes *NOS1AP*, *SUCLG1*, *PHLDB2* e *LOC107132946* foram associados com a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore, por meio de análises de associação genômica ampla utilizando SNPs individuais e haplótipos. A análise utilizando SNPs identificou QTL diferentes das análises com haplótipos e, em alguns casos, SNPs apresentaram variâncias genéticas aditivas maiores do que as apresentadas pelos haplótipos. A análise que utilizou haplótipos construídos com cinco SNPs identificou mais QTL do que as análises de haplótipos construídos com sete e nove SNPs. Sugere-se que análises utilizando haplótipos, baseados em janelas sobrepostas, sejam realizadas para complementar análises de SNPs individuais em estudos de associação genômica ampla.

Palavras-chave: análise de associação, bovino de corte, gene candidato, haplótipo, marcadores moleculares

DETECTION OF QTL FOR MEAT TENDERNESS IN NELLORE CATTLE

ABSTRACT – The consumer market has been increasingly demanding about the meat quality and therefore livestock needs to improve its efficiency and provide differentiated products, standardized and with quality. Considering the importance given to the meat tenderness, research has been undertaken to better understand the mechanisms related to the phenotypic expression of this trait. The candidate gene studies have allowed the identification of polymorphisms that change the structures of the proteins or that are in linkage disequilibrium with functional alterations in the DNA. With the advent of single nucleotide polymorphisms (SNPs) throughout many regions of the genome have been identified as responsible for phenotypic variation in meat tenderness. However, SNPs markers may have low ability to identify mutations, because SNPs are commonly bi-allelic and even when mutations have occurred, allelic frequencies can remain unaltered. On the other hand, using haplotype, mutations tend to cause major changes in haplotype frequencies, increasing the chances of identification of QTL. Thus, this study aimed to detect QTL and causal mutations by the approach of candidate genes and identify possible QTL through a genome-wide association analysis, for the trait meat tenderness in Nelore cattle using haplotypes as fundamental units of association tests. Information of the phenotypic, genotypic and pedigree were used from farms that belong to the breeding programs DeltaGen and PAINT. Fifty-two candidate genes were chosen for analysis using haplotypes constructed based on linkage disequilibrium using 1,616 animals. Two haplotypes were significant, and the exons near and within these haplotypes were sequenced to search for the causal mutation. The sequencing was performed using 298 animals and the identified SNPs were imputed for 1,318 remaining animals. Association analysis using haplotypes constructed based on the method of overlapping sliding windows were carried out and the SNPs and haplotypes effects were estimated using Genomic Best Linear Unbiased Predictor (GBLUP) method. The breeding values were estimated for each haplotype and SNPs and the additive genetic variances were calculated. Using haplotypes constructed based on overlapping sliding windows, we found that increasing the number of SNPs in the haplotype allowed to capture a greater proportion of additive genetic variance of meat tenderness. Six putative QTL were identified with the greatest additive genetic variances for meat tenderness, which one was in *CAPN1* gene and five in *ASAP1* gene. There was no evidence that the causal mutation for meat tenderness trait has been identified in these genes. A genome-wide association analysis was performed using haplotypes constructed based on the methodology of overlapping sliding windows of varying sizes. In this analysis, 1,405 animals genotyped with the Illumina Bovine HD panel and 1,756 genotyped animals with lower density panel (Neogen 70 K) were used and then, the genotypes of the 1,756 were imputed to the HD panel, in a total of 3,161 animals analyzed. The haplotypes and SNPs effects were estimated by the method GBLUP and the additive genetic variances were calculated for each haplotype and SNP. The *NOS1AP*, *SUCLG1*, *PHLDB2* and *LOC107132946* genes were associated with the meat tenderness trait in Nelore cattle through genome-wide association analysis using individual SNPs and haplotypes. The analysis using SNPs identified different QTL of the haplotype analyzes, and in some cases, the SNPs showed additive genetic

variance greater than those presented by the haplotypes. The analysis used haplotypes constructed with five SNPs identified more QTL than analysis of haplotypes constructed with seven and nine SNPs. Analyzes using haplotypes based on overlapping sliding windows, should be conducted as additional analyzes for individual SNPs in genome-wide association studies.

Keywords: association analysis, beef cattle, candidate gene, haplotype, molecular markers

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

A bovinocultura de corte brasileira assume importante posição no cenário mundial pelo tamanho do rebanho e eficiência dos sistemas de produção. Entre as raças criadas no Brasil, a de maior destaque é a Nelore, por apresentar maior adaptação em ambientes tropicais e resistência a parasitas. Porém, animais da raça Nelore possuem algumas limitações em termos de características de composição de carcaça, especialmente as relacionadas à qualidade de carne produzida (CURI et al., 2010). O mercado consumidor tem sido cada vez mais exigente quanto à qualidade da carne e, portanto, a pecuária precisa melhorar sua eficiência e fornecer produtos diferenciados, padronizados e com qualidade (HADLICH et al., 2013). Dessa forma, características relacionadas à qualidade da carne passam a ter importância nos programas de melhoramento genético animal.

Entre as características de qualidade de carne a maciez é a que se destaca, pois influencia diretamente na satisfação dos consumidores e, portanto, é decisiva para aquisição da carne bovina (VERBEKE et al., 2010; REICKS et al., 2011; ELLIES-OURY et al., 2013). No entanto, a maciez da carne é uma característica de difícil mensuração podendo ser obtida somente após o abate dos animais. Dessa forma, para a avaliação genética da maciez da carne é necessário o uso de teste de progênie, visto que os candidatos à seleção não podem ser avaliados diretamente (MILLER, 2010).

Considerando que a maciez da carne é uma característica multifatorial, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para melhor compreender os mecanismos relacionados à expressão do fenótipo (FAN et al., 2009). Estudos de genes candidatos têm identificado variantes genéticas associadas com a característica maciez da carne em várias raças de bovinos de corte (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2006; CURI et al., 2009; ASLAN et al., 2010; ALLAIS et al., 2011; TIZIOTO et al., 2012; CALVO et al., 2014; LEE et al., 2014; TAIT JR. et al., 2014). Segundo Tabor et al. (2002) o estudo de genes candidatos permite identificar polimorfismos que causam alterações na composição da proteína ou que estejam em desequilíbrio de

ligação com modificações no DNA que resultam em proteínas funcionais ou não funcionais. Apesar da quantidade de estudos utilizando genes candidatos, há divergências quanto aos resultados apresentados na literatura. O que pode ocorrer devido a estes estudos utilizarem animais de diferentes raças, criados em ambientes distintos, populações de tamanhos variados, ou pela utilização de diferentes métodos de estimação dos efeitos dos marcadores.

Com o sequenciamento do genoma bovino, painéis contendo um número significativo de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram disponibilizados no mercado, possibilitando a identificação desses marcadores próximos às mutações causais (MATUKUMALLI et al., 2011). Paralelamente, métodos estatísticos de análises foram desenvolvidos, tornando possível a busca de regiões ao longo do genoma que afetam características de importância econômica (DEKKERS, 2004; ANDERSON, 2009). Essas ferramentas podem auxiliar na predição mais acurada do mérito genético dos animais candidatos à seleção, bem como antecipar a seleção dos animais, sem a necessidade de mensurar os fenótipos dos mesmos ou de parentes, levando à diminuição do intervalo de gerações (MEUWISSEN et al., 2001; HOCQUETTE et al., 2010; PINTO et al., 2010; ALLAIS et al., 2011).

Com esses avanços, tornou-se possível a realização de estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genome-Wide Association Study*), buscando identificar locos que atuam na expressão de características quantitativas (QTL) em todo genoma em uma única análise. Além disso, os estudos de GWAS podem elucidar genes e mecanismos biológicos que influenciam na variação fenotípica das características (TIZIOTO et al., 2015). No entanto, muitos estudos de GWAS utilizando SNPs não detectam associações entre genes candidatos e fenótipos relacionados (BARENDSE, 2011). Ainda, segundo o autor, tem se descoberto uma ampla quantidade de regiões genômicas, algumas não contendo genes anotados, que tem apresentado pequenos efeitos sobre as características.

A utilização de haplótipos em análises de associação, como unidades fundamentais, vem se tornando uma ferramenta importante para aumentar a eficiência de detecção de QTL (CURTIS et al., 2001; CUYABANO; SU; LUND, 2014). Haplótipos possuem maior capacidade de identificação de mutações causais quando comparados aos SNPs individuais, pois podem capturar maiores

quantidades de informações da variabilidade genética, bem como possíveis interações epistáticas entre SNPs de um mesmo loco (CLARK, 2004; BARDEL et al., 2005; CUYABANO; SU; LUND, 2014). Portanto, o uso de haplótipos nas análises de associação pode ser mais eficiente na identificação de regiões responsáveis pela expressão do fenótipo.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Aspectos da bovinocultura de corte

A bovinocultura de corte possui grande importância econômica no Brasil, devido a este ser um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina *in natura* (IBGE, 2015). Além disso, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, dispondo de aproximadamente 198 milhões de animais, com abate de 43 milhões de cabeças no ano de 2014 (ANUALPEC, 2015). Somente a pecuária foi responsável por aproximadamente 30% do PIB (Produto Interno Bruto) do agronegócio, valor que representou 6,9% do PIB total do Brasil no ano de 2015 (ABIEC, 2016). Apesar deste destaque da pecuária de corte nacional no cenário econômico, a mesma se caracteriza por apresentar baixa produtividade e grande variação na qualidade da carne produzida, o que compromete a competitividade deste setor no mercado.

O crescimento das exportações e do consumo de carne bovina no Brasil vem acompanhado por maior exigência do mercado consumidor e, assim, existe a necessidade não só do aumento da produtividade do rebanho nacional, mas também da qualidade dos produtos ofertados (COSTA et al., 2007). Portanto, critérios de qualidade, como a padronização de cortes, cor, maciez, palatabilidade e suculência devem ser alcançados para atender a demanda do mercado consumidor, pois são características determinantes na decisão de compra (MISSIO et al., 2010).

O rebanho brasileiro é formado basicamente por animais zebuínos (*Bos indicus*) e seus cruzamentos com taurinos (*Bos taurus*). Aproximadamente 70% do rebanho nacional é composto pela raça Nelore, pois apresenta boa adaptabilidade às condições climáticas das regiões tropicais e resistência aos endo e ectoparasitas

(HADLICH et al., 2013). Porém, esses animais possuem algumas limitações em termos de características de composição de carcaça, e especialmente na qualidade da carne produzida (CURI et al., 2010). Apesar disso, os programas de melhoramento genético de raças zebuínas utilizam como critério de seleção, principalmente, características de crescimento e, só recentemente, mais atenção tem sido dada àquelas relacionadas à qualidade da carcaça.

1.2.2 Maciez da carne

Entre as características que determinam a qualidade da carne bovina, a maciez é a mais importante, pois influencia diretamente na percepção dos consumidores em relação à qualidade, sabor e satisfação, apresentando papel fundamental na decisão de compra do produto (VERBEKE et al., 2010; REICKS et al., 2011; ELLIES-OURY et al., 2013). Em muitos países, os consumidores estão dispostos a pagar mais por carne macia (FUEZ et al., 2004), sendo essa uma tendência crescente por parte dos consumidores brasileiros. Porém, a capacidade de predizer a maciez é um dos principais desafios da indústria da carne, pois a maciez é uma característica altamente variável uma vez que é afetada por diversos fatores *ante-mortem* e *post-mortem*.

Entre os fatores *ante-mortem* podem ser destacados: genética, raça, alimentação, idade, sexo, tempo de confinamento, manejo pré-abate, nível de estresse, tipo de fibra muscular e teor de colágeno e gordura (GEAY et al., 2001; BELEW et al., 2003; KOOHMARAIE et al., 2003). Segundo Koohmaraie (2003) aproximadamente 46% da variação na maciez da carne é causada pela genética, sendo o restante determinado pelo efeito de ambiente, quando bovinos de diferentes raças são comparados. No entanto, de acordo com os autores, dentro de raça a genética explica 30% da variação na maciez e, portanto, é um dos fatores *ante-mortem* mais importante entre os descritos anteriormente. Assim, a identificação de variações no DNA, que afetam os mecanismos envolvidos nos processos fisiológicos da maciez da carne, podem contribuir para a predição da maciez da carne precocemente (ANDERSON et al., 2012).

Magalhães et al. (2016) encontraram herdabilidade para maciez da carne (WBSF) de $0,12 \pm 0,07$, em animais pertencentes ao presente estudo. Resultado similar foi apresentado por Castro et al. (2014), os quais encontraram herdabilidade de $0,11 \pm 0,02$ em animais da raça Nelore. Porém, com a adição dos dados genômicos, foi encontrada uma herdabilidade de $0,29 \pm 0,05$ para característica WBSF, no presente estudo, sugerindo que a seleção baseada em marcadores genéticos pode ser efetiva para o melhoramento da maciez da carne.

Os tipos de fibras musculares também podem influenciar na maciez da carne. As fibras musculares podem ser divididas em três grupos, com características bioquímicas e biofísicas distintas, sendo que a principal diferença entre elas está no metabolismo glicolítico e oxidativo (CHOE et al., 2008). De acordo com Peter et al. (1972) as fibras do tipo I apresentam contração lenta, metabolismo oxidativo e coloração vermelha. Segundo os autores as fibras do tipo IIA possuem características de contração rápida, metabolismo oxidativo-glicolítico e coloração intermediária e as do tipo IIB são de contração rápida, metabolismo glicolítico e coloração branca. A fonte de energia utilizada pelas fibras de metabolismo oxidativo são os ácidos graxos, enquanto que as de metabolismo glicolítico utilizam o glicogênio (WARRIS, 2000; PETTE; STARON, 2001; KIM et al., 2008). As fibras do tipo I possuem níveis mais altos de gordura intramuscular que as fibras do tipo IIB (CALKINS et al., 1981; NAM et al., 2009). O músculo *Longissimus* apresenta maior quantidade de fibras do tipo IIB (MORALES, 2007; DE OLIVEIRA, 2013), sendo que estudos tem demonstrado que as fibras do tipo IIB estão relacionadas com menor maciez da carne (OCKERMAN et al., 1984; MALTIN et al., 1998; KIRCHOFER et al., 2002; CHANG et al., 2003; MORALES, 2007).

Mesmo sendo um fator *ante-mortem*, a gordura subcutânea atua como isolante térmico durante o resfriamento da carcaça no *post-mortem*, fazendo com que esse processo seja mais lento, podendo influenciar na maciez da carne (MAY et al., 1992; LESSER, 1993). O resfriamento rápido da carcaça provoca o encurtamento das fibras do músculo e a desativação de sítios de reconhecimento de enzimas, reduzindo seu acesso aos substratos. Assim, mesmo se houver disponibilidade de enzimas proteolíticas, sua ação será comprometida e a proteólise ideal não ocorrerá, o que resultaria em carne dura (KOOHMARAIE, 1996; FELÍCIO,

1997). Ainda, a gordura subcutânea influencia na perda de peso da carcaça e na coloração da carne por meio da desidratação durante o resfriamento, o que compromete sua qualidade (PRADO et al., 2009a; 2009b). De acordo com Jones e Tatum (1994) 5,1% das variações nos valores de maciez são devido à espessura de gordura subcutânea presente nos animais.

O conteúdo de gordura intramuscular (marmoreio) também é um fator *ante-mortem* que influencia na textura, suculência, palatabilidade e maciez da carne (MULLER, 1987; NISHIMURA et al., 1999). Segundo os autores a gordura intramuscular contribui de 3 a 10% na variação dos atributos citados anteriormente. A gordura intramuscular afeta a maciez por meio da separação do tecido conjuntivo intramuscular, fazendo com que as ligações entre as miofibrilas sejam desfeitas mais facilmente (NISHIMURA et al., 1999; WARRIS, 2000; HOCQUETTE et al., 2010). May et al. (1992) e Di Marco (1998) demonstraram que carnes com maior grau de gordura intramuscular necessitam de menos força para o rompimento de suas fibras. Jones e Tatum (1994) observaram que 9% das variações nos valores de maciez são devido à gordura intramuscular. No entanto, em alguns estudos as características gordura intramuscular e maciez da carne não apresentaram correlações (BURROW et al., 2001; RILEY et al., 2005). Além disso, a quantidade de gordura intramuscular em zebuínos é baixa devido à característica inata e ancestral que lhes permite melhor termorregulação em seu habitat natural tropical (GONDIM, 2013).

Entre os fatores *post-mortem* pode-se destacar o resfriamento da carcaça, velocidade de queda de pH, maturação, tecnologias de amaciamento e proteólise (FELÍCIO, 1997; KOOHMARAIE et al., 2003; ZAMORA et al., 2005). Após o abate do animal, inicia-se uma série de transformações químicas e físicas na musculatura estriada, as quais resultam na rigidez da carcaça pelo encurtamento do sarcômero, chamado de *rigor mortis*. Este é um processo importante, pois pode resultar em variações nas propriedades da carne, como a capacidade de retenção de água, cor e firmeza da carne fresca, maciez, sabor, suculência, capacidade de emulsificação das matérias primas e cor e rendimento dos produtos processados (JUDGE et al., 1989).

Após o *rigor mortis*, inicia-se o processo de transformação do músculo em carne, denominado maturação. Durante esse processo, ocorre a ação de enzimas

endógenas proteolíticas que aumentam a maciez, especialmente, em cortes do músculo *Longissimus dorsi* (TAYLOR et al., 1995; KOOHMARAIE, 1996). No *post-mortem* a maior causa da variabilidade na maciez da carne bovina pode ser atribuída às variações que ocorrem no processo enzimático (KOOHMARAIE, 1996). Três sistemas proteolíticos estão envolvidos no amaciamento da carne: proteases cálcio dependentes (calpainas), proteases lisossomais (catepsinas) e proteossomas (CHERETA et al., 2007). O sistema proteolítico cálcio dependente tem sido considerado como um dos principais fatores responsáveis pela variação da maciez (GEESINK et al., 2006; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Além disso, o processo de maturação também pode ser influenciado por variáveis tais como idade, raça, velocidade de glicólise, quantidade e solubilidade do colágeno, comprimento do sarcômero das miofibrilas e força iônica (CROALL; DEMARTINO, 1991; KOOHMARAIE, 1994; KOOHMARAIE, 1996).

A mensuração da maciez pode ser realizada por análise sensorial ou por medição objetiva como a força de cisalhamento (WBSF). A força de cisalhamento reflete uma combinação da resistência das miofibrilas e do tecido conjuntivo (LINES et al., 2009). Pesquisas têm relatado que a força de cisalhamento da carne aumenta à medida que se eleva a percentagem de *Bos indicus* nos animais, em cruzamentos com *Bos taurus* (PRINGLE et al., 1997; GONZALEZ et al., 2003). Mazzucco et al. (2010) demonstraram que animais da raça Nelore apresentaram maiores valores para força de cisalhamento quando comparados a outros grupos genéticos. Luchiari Filho (1994) também relatou que a carne de novilhos da raça Nelore apresentou maior força de cisalhamento em relação a grupos de animais cruzados e de bubalinos.

Contudo, a importância de mais pesquisas voltadas ao melhoramento genético para a característica maciez da carne, está cada vez mais evidente, principalmente para animais da raça Nelore. Esforços estão sendo feitos para que se alcance um produto de melhor qualidade, porém com muitos desafios devido aos vários fatores genéticos e ambientais que podem afetar a maciez da carne. Dessa forma, há necessidade de mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na variabilidade da característica (ZHOU et al., 2009).

1.2.3 O melhoramento genético e os marcadores moleculares

O melhoramento genético animal tem sido considerado uma ferramenta importante para aumentar a produtividade do setor de bovinocultura de corte. Em meados dos anos 80, a maioria dos programas de melhoramento genético de animais de corte, passou a avaliar os animais com base na metodologia dos modelos mistos para a estimação dos valores genéticos baseados na Diferença Esperada na Progenie (DEP), utilizando registros fenotípicos e de pedigree (ENDERSON, 1984). Estes programas têm selecionado animais com base em características relacionadas com o crescimento, desenvolvimento, composição corporal, reprodução e resistência a doenças (ZHOU et al., 2009).

Apesar dos progressos obtidos, a eficiência das técnicas tradicionais de seleção é bastante limitada em relação às características de difícil mensuração e de expressão tardia ou *post-mortem*, principalmente para a característica maciez da carne (VAN EENENNAAM, 2006; BONILLA et al., 2010). A técnica de ultrassonografia em tempo real é bastante utilizada em animais vivos para medir características como área de olho de lombo, gordura subcutânea e gordura intramuscular. Porém, para a característica maciez da carne essa técnica ainda não pode ser utilizada (LU et al., 2013). Dessa forma, a seleção baseada em registros fenotípicos pode ser realizada somente por meio de teste de progênie, o que leva ao aumento do custo de produção e do intervalo de gerações (MILLER, 2010).

A utilização de marcadores moleculares para auxiliar na seleção dos animais pode ser a estratégia mais adequada para o melhoramento da maciez da carne, pois é uma forma de avaliar o mérito genético dos animais com predições mais acuradas (CURI et al., 2010; HOCQUETTE et al., 2010; ALLAIS et al., 2011). Além disso, informações genotípicas podem ser obtidas precocemente, sem a necessidade do abate do animal, o que refletirá na diminuição do intervalo entre gerações, economia na realização de testes de progênie e aceleração do progresso genético anual (BECKMANN; SOLLER, 1987; MACHADO; MARTINEZ, 2001; PINTO et al., 2010). Características de carcaça e de qualidade da carne estão entre as mais beneficiadas pelo uso de informações dos marcadores genéticos para seleção dos animais (CASAS et al., 2003; MACHADO et al., 2010).

O marcador mais abundante no genoma bovino é o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de nucleotídeo único), o qual pode ser utilizado para identificar regiões do genoma ou genes que influenciam nas características de interesse econômico (BRUMFIELD et al., 2003; EMARA; KIM, 2003; DO et al., 2008). A identificação de SNPs associados a genes que afetam as características de qualidade da carne pode ser um fator que possibilitará a inclusão dessas características nos programas de melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil, como critério de seleção (REZENDE et al., 2008).

Painéis de alta densidade de SNPs para bovinos foram desenvolvidos (MATUKUMALLI et al., 2011), os quais contêm uma vasta quantidade de SNPs distribuídos por todo genoma, o que aumenta a probabilidade de estarem localizados próximos às mutações causais. Além disso, métodos de análise em larga escala foram elaborados para que a grande quantidade de dados gerados pelos painéis pudessem ser analisados. Com estes avanços, se tornou possível a busca em todo genoma por locos que influenciam as características quantitativas (QTL - *Quantitative Trait Loci*), onde as mutações causais estão localizadas (DEKKERS, 2004; ANDERSON, 2009).

Devido à proximidade dos marcadores às mutações causais, a taxa de recombinação é consideravelmente pequena e assim os alelos de um marcador e os do QTL são transmitidos juntos, dado o desequilíbrio de ligação existente entre eles (FAY; WU, 2000). O desequilíbrio de ligação é observado quando combinações de alelos de diferentes locos em um cromossomo ocorrem com maior frequência do que aquelas esperadas em uma situação ao acaso (GODDARD et al., 2009). Portanto, para que seja possível identificar variações no genoma que afetam os fenótipos, os marcadores genéticos devem estar fortemente ligados às mutações causais, ou seja, em alto desequilíbrio de ligação com as mesmas (KHATKAR et al., 2006).

1.2.4 Genes candidatos

O estudo de genes candidatos é um método de associação entre genes e características de interesse econômico. Genes candidatos são aqueles que possuem funções biológicas conhecidas e que estejam direta ou indiretamente

envolvidos no desenvolvimento ou nos processos fisiológicos de determinada característica (ZHU; ZHAO, 2007). A abordagem de gene candidato pode proporcionar um melhor entendimento da arquitetura genética de características quantitativas, pois é um método eficaz para a busca de variações nos genes específicos que supostamente influenciam na variação do fenótipo dos indivíduos (ZHU; ZHAO, 2007; LIU et al., 2008).

Segundo Tabor et al. (2002) o estudo de genes candidatos permite identificar variantes genéticas que causam alterações na função protéica ou que estejam em desequilíbrio de ligação com alterações funcionais. A abordagem de genes candidatos tem demonstrado alto poder de identificação de genes e mutações causais (TABOR et al., 2002; AMOS et al., 2010). Além disso, estudos de genes candidatos apresentam custo relativamente baixo e são rápidos de serem executados (WILKENINGET et al., 2009; PATNALA; CLEMENTS; BATRA, 2013). Ainda, de acordo com os autores, o sucesso desta abordagem depende da escolha correta dos genes a serem estudados, portanto, o conhecimento prévio sobre a função biológica dos genes é necessário.

A característica maciez da carne é multifatorial e, portanto, a busca por genes candidatos e a sua associação com maciez tem sido largamente aplicada para a descoberta de genes que influenciam na variação fenotípica apresentada pelos animais (FAN et al., 2009). Existem muitos trabalhos na literatura com genes candidatos que identificaram variantes associadas à característica maciez da carne em várias espécies de bovinos de corte (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2005; WHITE et al., 2005; CASAS et al., 2006; CURI et al., 2009; ASLAN et al., 2010; ALLAIS et al., 2011; TIZIOTO et al., 2012; CALVO et al., 2014). Entretanto, há divergências quanto aos resultados de associação e tamanho do efeito das mesmas variantes entre estes estudos, inclusive em variantes que compõem alguns testes genéticos disponíveis no mercado (VAN EENENNAAM et al., 2007). Contudo, antes de expandir o uso de marcadores para aplicações comerciais, é crucial a validação de seus efeitos em diferentes raças e ambientes (BARENDSE, 2005).

1.2.5 Haplótipos

Grande parte das variantes genéticas não está presente de forma independente nos genomas, mas sim ligadas umas as outras (BARNES, 2010). A combinação de alelos de vários SNPs localizados proximamente ao longo de um único cromossomo e que tendem a ser herdados juntos é denominada haplótipo (BANSAL et al., 2008). Segundo Boopathi (2013) haplótipos são variações genéticas transmitidas em blocos não recombinantes, sendo que sua existência revela um estado de desequilíbrio de ligação entre variantes alélicas de regiões cromossômicas fortemente ligadas. O desequilíbrio de ligação refere-se à associação não aleatória de alelos em dois locos resultando em maior frequência de certos haplótipos no loco do que o esperado ao acaso (BOHMANOVA; SARGOLZAEI; SCHENKEL, 2010).

A utilização de haplótipos em análises de associação como unidades fundamentais têm demonstrado importantes vantagens. De acordo com Barendse (2011) utilizar haplótipo pode melhorar substancialmente a capacidade de detectar o total da variação fenotípica explicada por determinada região do genoma, em comparação com SNPs individuais. Isto acontece, pois haplótipos podem capturar uma maior quantidade de informações e, conseqüentemente, possuem maior capacidade de identificar QTL (CUYABANO; SU; LUND, 2014). Além disso, haplótipos podem capturar possíveis interações epistáticas entre SNPs de um mesmo loco (CLARK, 2004; BARDEL et al., 2005). Testes de associação utilizando blocos de haplótipos reduzem o número de testes na análise e, portanto, a taxa de erro do tipo I (ZHAO et al., 2007). Este erro ocorre quando a hipótese nula é rejeitada sendo ela verdadeira (BANERJEE et al., 2009; LORENZ et al., 2010), ou seja, afirma-se que existe efeito do marcador sobre a característica quando isso não ocorre (falso-positivo).

Entretanto, o uso de haplótipos em análises de GWAS, é pouco explorado, pois não existe um consenso na literatura da quantidade de SNPs que devem formar um haplótipo, bem como qual a melhor metodologia para a construção e análise dos haplótipos (MARTIN et al., 2000). Até o momento, a maioria das análises de associação utilizando haplótipos têm sido realizadas em regiões do genoma com alto desequilíbrio de ligação, onde a maior parte da variação genética pode ser capturada por um número limitado de haplótipos (GABRIEL et al., 2002).

Para realizar tal análise, blocos de SNPs em desequilíbrio de ligação precisam ser definidos e, posteriormente, os testes de associação são realizados para cada bloco. No entanto, é quase inevitável que a construção de haplótipos, com base nesta metodologia, resulte em SNPs "órfãos" que estão fora de todos os blocos. Assim, a informação completa sobre a variabilidade genética dentro da região não será analisada (LI; SUNG; LIU, 2007). Portanto, o uso de blocos de SNPs em desequilíbrio de ligação para a construção dos haplótipos pode não ser a estratégia mais eficiente nas análises de associação (LIN; CHAKRAVARTI; CUTLER, 2004).

Outro método para a construção dos haplótipos vem sendo muito utilizado para a detecção de QTL associados com doenças em humanos (BARNES et al., 2006; GIZATULLIN et al., 2006; LAWS et al., 2007). Nessa metodologia, haplótipos são construídos com base em janelas sobrepostas, onde vários SNPs vizinhos são incluídos na análise como haplótipos, capazes de cobrir todos os locos de interesse (MATHIAS et al., 2006). Testes utilizando tamanhos variados de janelas, sobre uma região genômica, possibilitam a descoberta de marcadores ou regiões que são significativamente associados com as características de estudo (GUO et al., 2009). Além disso, segundo os autores, a abordagem de janelas sobrepostas não requer conhecimento prévio da estrutura de desequilíbrio de ligação. Entretanto, a utilização de haplótipos construídos pelo método de janelas sobrepostas requer alta demanda computacional (CHENG et al., 2005; LI; SUNG; LIU, 2007).

1.3 Objetivos

Objetivo Geral

Detectar QTL e mutações causais em genes candidatos e identificar possíveis QTL por meio de uma análise de associação genômica ampla utilizando SNP e haplótipos como unidades fundamentais dos testes de associação, para a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

Objetivos Específicos

- Identificar genes candidatos associados à característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore, utilizando haplótipos construídos com base no desequilíbrio de ligação;
- Buscar mutações causais em regiões de genes candidatos associados com a característica maciez da carne;
- Detectar QTL para a característica maciez da carne por meio de estudos de associação genômica ampla, utilizando haplótipos construídos a partir de janelas sobrepostas de tamanhos variados.
- Comparar resultados de estudos de associação genômica ampla utilizando haplótipos e SNPs individuais.

1.4 Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 5 motivos para valorizar a pecuária bovina do Brasil. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1378#.V099gL62crc>>. Acesso em: 01 jun 2016.

ALLAIS, S.; JOURNAUX, L.; LEVEZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; RAYNAUD, P.; HOCQUETTE, J. F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; RENAND, G. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1–11, 2011.

AMOS, W.; DRISCOLL, E.; HOFFMAN, J. I. Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to infectious disease? **Proceedings of the Royal Society B**, v. 278, p. 1183-1188, 2011.

ANDERSSON, L. Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. **Genetics**, v. 136, p. 341-349, 2009.

ANDERSON, M. J.; LONERGAN, S. M.; FEDLER, C. A.; PRUSA, K. J.; BINNING, J. M.; HUFF-LONERGAN, E. Profile of biochemical traits influencing tenderness of muscles from the beef round. **Meat Science**, v. 91, p. 247–254, 2012.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. 21 ed. Instituto FNP, São Paulo, p. 81-82, 2015.

ASLAN, O.; SWEENEY, T.; MULLEN, A. M.; HAMILL, R. M. Regulatory polymorphisms in the bovine Ankyrin 1 gene promoter are associated with tenderness and intramuscular fat content. **BMC Genetics**, v. 1, 2010.

BANERJEE, A.; CHITNIS, U. B.; JADHAV, S. L.; BHAWALKAR, J. S., CHAUDHURY, S. Hypothesis testing, type I and type II errors. **Industrial Psychiatry Journal**, v. 18, p. 127–131, 2009.

BANSAL, V.; HALPERN, A. L.; AXELROD, N.; BAFNA, V. An MCMC algorithm for haplotype assembly from whole-genome sequence data. **Genome Research**, v. 18, p. 1336–1346, 2008.

BARDEL, C.; DANJEAN, V.; HUGOT, J. P.; DARLU, P.; GENIN, E. On the use of haplotype phylogeny to detect disease susceptibility loci. **BMC Genetics**, v. 6, 2005.

BARENDSE W. J. The transition from quantitative trait loci to diagnostic test in cattle and other livestock. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, p. 831–836, 2005.

BARENDSE, W. Haplotype Analysis Improved Evidence for Candidate Genes for Intramuscular Fat Percentage from a Genome Wide Association Study of Cattle. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

BARNES, K. C.; GRANT, A. V.; BALTADZHIEVA, D.; ZHANG, S.; BERG, T.; SHAO, L.; ZAMBELLI-WEINER, A.; ANDERSON, W.; NELSEN, A.; PILLAI, S.; YARNALL, D. P.; DIENGER, K.; INGERSOLL, R. G.; SCOTT, A. F.; FALLIN, M. D.; MATHIAS, R. A.; BEATY, T. H.; GARCIA, J. G. N.; WILLS-KARP, M. Variants in the gene encoding C3 are associated with asthma and related phenotypes among African Caribbean families. **Genes and Immunity**, v. 7, p. 27–35, 2006.

BARNES, M. R. Genetic Variation Analysis for Biomedical Researchers: A Primer. In: Barnes, M. R. and Breen, G. (eds.). **Genetic Variation: Methods and Protocols**. New York: Springer Science Business Media, 2010. p. 1-20.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Molecular markers in animal genetics improvement. **Biotechnology**, v. 5, p. 573-576, 1987.

BELEW, J. B.; BROOKS, J. C.; MCKENNA, D. R.; SAVELL, J. W. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, v. 64, p. 507-512, 2003.

BICKEL, R. D.; KOPP, A.; NUZHDIN, S. V. Composite effects of polymorphisms near multiple regulatory elements create a major-effect QTL. **Plos Genetics**, v. 7, 2011.

BOHMANOVA, J.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S. R. Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. **BMC Genomics**, v. 11, 2010.

BONILLA, C. A.; RUBIO, M. S.; SIFUENTES, A. M.; PARRA-BRACAMONTE, G. M.; ARELLANO, V. W.; MENDEZ, M. R. D.; BERRUECOS, J. M.; ORTIZ, R. Association of CAPN1 316, CAPN 1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. **Genetic and Molecular Research**, v. 9, p. 2395–2405, 2010.

BOOPATHI, N. M. Genetic mapping and marker assisted selection. Basics, Practice and Benefits. In: _____. (Ed.). **Mapping population development**. Coimbatore: Springer, 2013. p. 23-37.

BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 18, p.1-8, 2003.

BURROW, H. M., MOORE, S. S.; JOHNSTON, D. J.; BARENDSE, W.; BINDON, B. M. Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.41, p.893-919, 2001.

CALKINS, C. R.; DUSTON, T. R.; SMITH, G. C.; CARPENTER, Z. L.; DAVIS, G. W. Relationship of fiber type composition to marbling and tenderness of bovine muscle. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 708-715, 1981.

CALVO, J. H.; IGUÁCEL, L. P.; KIRINUS, J. K.; SERRANO, M.; RIPOLL, G.; CASASÚS, I.; JOY, M.; PÉREZ-VELASCO, L.; SARTO, P.; ALBERTÍ, P.; BLANCO, M. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, v. 96, p. 775–782, 2014.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S.D.; KEELE, J.W.; KOOHARAIE, M.; SMITH, T.P.L.; STONE, R.T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2976–2983, 2003.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE, C. C. JR. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13–19, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE JR., C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 520–525, 2006.

CASTRO, L. M.; MAGNABOSCO, C. U.; SAINZ, R. D.; FARIA, C. U.; LOPES, F. B. Quantitative genetic analysis for meat tenderness trait in Polled Nellore cattle. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 393-402, 2014.

CHANG, K. C.; DA COSTA, N.; BLACKLEY, R.; SOUTHWOOD, O.; EVANS, G.; PLASTOW, G.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I. Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat Science**, v. 64, p. 93-103, 2003.

CHENG, R.; MA, J. Z.; ELSTON, R. C.; LI, M. D. Fine mapping functional sites or regions from case-control data using haplotypes of multiple linked SNPs. **Annals of Human Genetics**, v. 69, p. 102–112, 2005.

CHÉRETA, R.; DELBARRE-LADRAT, C.; DE LAMBALLERIE-ANTON, M.; VERREZ-BAGNIS, V. Calpain and cathepsin activities in postmortem fish and meat muscles. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1474-1479, 2007.

CHOE, J. H.; CHOI, Y. M.; LEE, S. H.; SHIN, H. G.; RYU, Y. C.; HONG, K. C.; KIM, B. C. The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. **Meat Science**, v. 80, p. 355-362, 2008.

CLARK, A. G. The role of haplotypes in candidate gene studies. **Genetic Epidemiology**, v. 27, p. 321–333, 2004.

COSTA, D.; ABREU, J. B. R.; MOURÃO, R. C.; SILVA, J. C. G.; RODRIGUES, V. C.; SOUSA, J. C. D.; MARQUES, R. A. F. S. Características de carcaça de novilhos inteiros Nelore e F1 Nelore x Holandês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, p. 687-696, 2007.

CROALL, D. E.; DEMARTINO, G. N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 813–47, 1991.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos Taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, p. 456–462, 2009.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L., GIUSTI, J., SILVEIRA, A. C., MARTINS, C. L., OLIVEIRA, H. N. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*–*Bos indicus* cross beef cattle. **Meat Science**, v. 86, p. 915–920, 2010.

CURTIS, D.; NORTH, B. V.; SHAM, P. C. Use of an artificial neural network to detect association between a disease and multiple marker genotypes. **Annals of Human Genetics**, v. 65, p. 95–107 2001.

CUYABANO, B. C.; SU, G.; LUND, M. S. Genomic prediction of genetic merit using LD-based haplotypes in the Nordic Holstein population. **BMC Genomics**, v. 15, 2014.

DE OLIVEIRA, I. M. **Glicerina bruta na dieta de bovinos nelore e f1 Red Angus x Nelore: desempenho, características de carcaça e avaliação qualitativa de nove músculos, maturados ou não**. 2013. 125 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

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

DI MARCO, O.N. **Crecimiento de vacunos para carne**. Mar del Plata: Balcarce, 1998.

DO, K. T.; HA, Y.; MOTE, B. E.; ROTHSCCHILD, M. F.; CHOI, B. H.; LEE, S. S.; KIM, T. H.; CHO, B. W.; KIM, K. S. Investigation of single nucleotide polymorphisms in porcine chromosome 2 quantitative trait loci for meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 21, p. 155–160, 2008.

ELLIES-OURY, M. P.; DURAND, Y.; DELAMARCHE, F.; JOUANNO, M.; LAMBERT, J.; MICOL, D.; DUMONT, R. Relationships between the assessment of “grain of meat” and meat tenderness of Charolais cattle. **Meat Science**, v. 93, p. 397–404, 2013.

EMARA, M. G.; KIM, H. Genetic markers and their application in poultry breeding. **Poultry Science**, v. 6, p. 952–957, 2003.

FAN, Y. Y.; ZAN, L. S.; FU, C. Z.; TIAN, W. Q.; WANG, H. B.; LIU, Y. Y.; XIN, Y. P. Three novel SNPs in the coding region of PPARc gene and their associations with meat quality traits in cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 131–137, 2009.

FAY, J. C.; WU, C. Hitchhiking under positive Darwinian selection. **Genetics**, v. 155, p. 1405-1413, 2000.

FELÍCIO, P. E. Fatores ante e post-mortem que influenciam na qualidade da carne bovina In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 79-97.

FEUZ, D. M.; UMBERGER, W. J.; CALKINS, C. R.; SITZ, B. U.S. consumers' willingness to pay for flavor and tenderness in steaks as determined with an experimental auction. **Journal of Agricultural and Resource Economics**, v. 29, p. 501-516, 2004.

FIEMS, L. O.; CAMPENEERE, S. D.; DE SMET, S.; VAN DE VOORDE, G.; VANACKER, J. M.; BOUCQUÉ, C. V. Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. **Meat Science**, v. 56, p. 41–47, 2000.

GABRIEL, S. B.; SCHAFFNER, S. F.; NGUYEN, H.; MOORE, J. M.; ROY, J.; BLUMENSTIEL, B.; HIGGINS, J.; DEFELICE, M.; LOCHNER, A.; FAGGART, M.; LIU-CORDERO, S. N.; ROTIMI, C.; ADEYEMO, A.; COOPER, R.; WARD, R.; LANDER, E. S.; DALY, M. J.; ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, p. 2225-2229, 2002.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 1-26, 2001.

GEESINK, G. H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A. H.; KOOHMARAIE, M. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2834–2840, 2006.

GIZATULLIN, R.; ZABOLI, G.; JONSSON, E. G.; ASBERG, M.; LEOPARDI, R. Haplotype analysis reveals tryptophan hydroxylase (TPH) 1 gene variants associated with major depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 295–300, 2006.

GODDARD, M. E.; WRAY, N. R.; VERBYLA, K.; VISSCHER, P. M. Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data. **Statistical Science**, v. 24, p. 517-529, 2009.

GONDIM, F. Bioquímica muscular, maciez da carne e melhoramento das raças zebuínas. **Revista de Política Agrícola**, v. 22, p. 95-108, 2013.

GONZALEZ, C. B.; PAZOS, A. A.; SALITO, V. A.; GARCIA, P. T.; LASTA, J. A. Cattle feeding on pasture. Tenderness differences between Bos indicus, Bos taurus and Bos indicus x Bos Taurus. **Revista Argentina de Producción Animal**, v. 23, p. 111–118, 2003.

GUO, Y.; LI, J.; BONHAM, A. J.; WANG, Y.; DENG, H. Gains in power for exhaustive analyses of haplotypes using variable-sized sliding window strategy: a comparison of association-mapping strategies. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, p. 785–792, 2009.

HADLICH, J. C.; CURI, R. A.; DA SILVA, M. G. B.; FACTORI, M. A.; SILVEIRA, A. C.; CHARDULO, L. A. L. Maciez da carne bovina e sua relação com o crescimento e os tipos de fibra musculares. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 11, p. 421-430, 2013.

HENDERSON, C. R. **Applications of Linear Models in Animal Breeding**. University of Guelph, Guelph, Ontario, 1984.

HOCQUETTE, J. F.; GONDRET, F.; BAEZA, E.; MEDALE, F.; JURIE, C.; PETHICK, D. W. Intramuscular fat content in meat producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, v. 4, p. 303-319, 2010.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W. G.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, p. 184–195, 2010.

JONES, B. K.; TATUM, J. D. Predictors of beef tenderness among carcasses produced under commercial conditions. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1492-1501, 1994.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; HEDRICK, H. B.; MERKEL, R. A. **Principles of Meat Science**. 2nd ed. Dubuque, IA: Kendall/Hunt Publishing Co., 1989.

KHATKAR, M. S.; COLLINS, A.; CAVANAGH, J. A. L.; HAWKEN, R. J.; HOBBS, M.; ZENGER, K. R.; BARRIS, W.; McCLINTOCK, A. E.; THOMSON, P. C.; NICHOLAS, F. W.; RAADSMA, H. W. A first-generation metric linkage disequilibrium map of bovine chromosome 6. **Genetics**, v. 174, p. 79-85, 2006.

KIRCHOFER, K. S.; CALKINS, C. B.; GWARTNEY, B. L. Fiber type composition of muscles of the beef chuck and round. *Journal of Animal Science*, v. 80, 2872-2878, 2002.

KOOHMARAIE M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, p. 93–104, 1994.

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

KOOHMARAIE, M.; VEISETH, E.; KENT, M. P.; SHACKELFORD, S. D. Understanding and managing variation in meat tenderness. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. 1 CD-ROM.

LAWS, S. M.; FRIEDRICH, P.; DIEHL-SCHMID, J.; MÜLLER, J.; EISELE, T.; BÄUML, J.; FÖRSTL, H.; KURZ, A.; RIEMENSCHNEIDER, M. Fine mapping of the MAPT locus using quantitative trait analysis identifies possible causal variants in Alzheimer's disease. **Molecular Psychiatry**, v. 12, p. 510–517, 2007.

LEE, S. H.; KIM, S. C.; CHAI, H. H.; CHO, S. H.; KIM, H. C.; LIM, D.; CHOI, B. H.; DANG, C. G.; SHARMA, A.; GONDRO, C.; YANG, B. S.; HONG, S. K. Mutations in calpastatin and μ -calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): Molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/ μ -calpain complex. **Meat Science**, v. 96, p. 1501–1508, 2014.

LESSER, W. Marketing Livestock and Meat. **Food Products Press**, v. 2, p. 209–214, 1993.

LI Y.; SUNG, W. K.; LIU, J. J. Association Mapping via Regularized Regression Analysis of Single-Nucleotide–Polymorphism Haplotypes in Variable-Sized Sliding Windows. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, p. 705-715, 2007.

LIN, S.; CHAKRAVARTI, A.; CUTLER, D. V. Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 36, p. 1181–1188, 2004.

LINES, D. S.; PITCHFORD, W. S.; KRUK, Z. A.; BOTTEMA, C. D. K. Limousin myostatin F94L variant affects semitendinosus tenderness. **Meat Science**, v. 81, p. 126–131, 2009.

LIU, M.; PENG, J.; XU, D. Q.; ZHENG, R.; LI, F.; LI, J. L.; ZUO, B.; LEI, M. G.; XIONG, Y. Z.; DENG, C. Y.; JIANG, S. W. Association of MYF5 and MYOD1 Gene Polymorphisms and Meat Quality Traits in Large White X Meishan F2 Pig Populations. **Biochemical Genetics**, v. 46, p. 720–732, 2008.

LORENZ, A. J.; HAMBLIN, M. T.; JANNINK, J. L. Performance of single nucleotide polymorphisms versus haplotypes for genome-wide association analysis in barley. **Plos One**, v. 5, 2010.

LU, D.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; VANDER VOORT, G.; WANG, Z.; MANDELL, I.; MOORE, S.; PLASTOW, G.; MILLER, S. P. Genome-wide association analyses for carcass quality in crossbred beef cattle. **BMC Genetics**, v. 14, 2013.

LUCHIARI FILHO, A. A importância das raças zebuínas no desenvolvimento da pecuária de corte brasileira. In: I Congresso Brasileiro das Raças Zebuínas/ABCZ, 1994, Uberaba. **Anais...** Uberaba, 1994.

MACHADO, M. A.; MARTINEZ, M. L. Acelerando o melhoramento com o mapeamento do genoma bovino. **Informe Agropecuário**, v. 22, p. 98-104, 2001.

MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G. C. D.; FREITAS, C.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; SILVA, M. V. G. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome-wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, 2010.

MAGALHÃES, A. F. B.; CAMARGO, G. M. F.; FERNANDES, G. A.; GORDO, D. G. M.; TONUSSI, R. L.; COSTA, R. B.; ESPIGOLAN, R.; SILVA, R. M. DE O.; **BRESOLIN, T.**; DE ANDRADE, W. B. F.; TAKADA, L.; FEITOSA, F. L. B.; BALDI, F.; CARVALHEIRO, R.; CHARDULO, L. A. L.; ALBUQUERQUE, L. G. Genome-Wide Association Study of Meat Quality Traits in Nellore Cattle. **Plos One**, v. 11, 2016.

MALTIN, C. A.; SINCLAIR, K. D.; WARRISS, P. D.; GRANT, C. M.; PORTER, A. D.; DELDAY, M. I.; WARKUP, C. C. The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from suckled calves. **Animal Science**, v. 66, p. 341-348, 1998.

MARTIN, E. R.; MONKS, S. A.; WARREN, L. L.; KAPLAN, N. L. A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 146-154, 2000.

MATHIAS, R. A.; GAO, P.; GOLDSTEIN, J. L.; WILSON, A. F.; PUGH, E. W.; FURBERT-HARRIS, P.; DUNSTON, G. M.; MALVEAUX, F. J.; TOGIAS, A.; BARNES, K. C.; BEATY, T. H.; HUANG, S.-K. A graphical assessment of p-values from sliding window haplotype tests of association to identify asthma susceptibility loci on chromosome 11q. **BMC Genetics**, v. 7, 2006.

MATUKUMALLI, L. K.; SCHROEDER, S.; DENISE, S. K.; SONSTEGARD, T.; LAWLEY, C. T.; GEORGES, M.; COPPIETERS, W.; GIETZEN, K.; MEDRANO, J. F.; RINCON, G.; LINCE, D.; EGGEN, A.; GLASER, L.; CAM, G.; VAN TASSEL, C. 2011. Analyzing LD blocks and CNV segments in cattle: Novel genomic features identified using the BovineHD BeadChip. Pub. No. 370-2011-002, Illumina Inc., San Diego, CA.

MAY, S. G.; DOLEZAL, H. G.; GILL, D. R.; RAY, F. K.; BUCHANAN, D. S. Effects of days fed, carcass grade traits, and subcutaneous fat removal on postmortem muscle characteristics and beef palatability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 444-453, 1992.

MAZZUCCO, J. P.; MELUCCI, L. M.; VILLARREAL, E. L.; MEZZADRA, C. A.; SORIA, L.; CORVA, P.; MOTTER, M. M.; SCHOR, A.; MIQUEL, M. C. Effect of ageing and μ -calpain markers on meat quality from Brangus steers finished on pasture. **Meat Science**, v. 86, p. 878-882, 2010.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. **Genetics**, v. 157, p. 1819-1829, 2001.

MILLER, S. Genetic improvement of beef cattle through opportunities in genomics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 247-255, 2010.

MISSIO, R. S.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; RESTLE, J.; ARBOITTE, M. Z.; SEGABINAZZI, L. R. Características da carcaça e da carne de tourinhos terminados em confinamento, recebendo diferentes níveis de concentrado na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1610-1617, 2010.

MORALES, D. C. **Caracterização dos tipos de fibras musculares e das isoformas da myhc e suas relações com a qualidade da carne de bovinos nelore superprecoces**. 2007. 81 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

MULLER, L. **Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaça de novilhos**. 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1987. 31p.

NAM, Y. J.; CHOI, Y. M.; LEE, S. H.; CHOE, J. H.; JEONG, D. W.; KIM, Y. Y.; KIM, B. C. Sensory evaluations of porcine longissimus dorsi muscle: Relationships with postmortem meat quality traits and muscle fiber characteristics. **Meat Science**, v. 83, p. 731-736, 2009.

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

OCKERMAN, H. W.; JAWOREK, D.; VANSTAVERN, B.; PARRETT, N.; PIERSON, C. J. Castration and sire effects on carcass traits, meat palatability and muscle fiber characteristics in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 981-990, 1984.

PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P., CULLEN, N. G., HYNDMAN, D. L., MORRIS, C. A., CRAWFORD, A. M., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., KEELE, J. W., & SMITH, T. P. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077–3085, 2002.

PATNALA, R.; CLEMENTS, J.; BATRA, J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. **BMC Genetics**, v. 14, 2013.

PETER, J. B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R.; GILLESPIE, C. A.; STEMPEL, K. E. Metabolic profiles of three types of fibers of skeletal muscles in guinea pig and rabbits. **Biochemistry**, v. 11, p. 2627-2633, 1972.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, p. 359-372, 2001.

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

PRADO, J. M.; PRADO, I. N.; VISENTAINER, J. V.; ROTTA, P. P.; PEROTTO, D.; MOLETTA, J. L.; PRADO, I. M.; DUCATTI, T. The effect of breed on chemical composition and fatty acid composition on Longissimus dorsi muscle of Brazilian beef cattle. **Journal of Animal Feed and Science**, v. 18, p. 231-240, 2009a.

PRADO, I. N.; OLIVEIRA, A. N.; ROTTA, P. P.; PEROTTO, D.; PRADO, R. M.; SILVA, R. R.; SOUZA, N. E.; MOLETTA, J. L. Chemical and fatty acid composition of Longissimus muscle of crossbred bulls finished in feedlot. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 22, p. 1054-1059, 2009b.

PRINGLE, T. D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S.; JOHNSON, D. D.; WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955–2961, 1997.

REICKS, A. L.; BROOKS, J. C.; GARMYN, A. J.; THOMPSON, L. D.; LYFORD, C. L.; MILLER, M. F. Demographics and beef preferences affect consumer motivation for purchasing fresh beef steaks and roasts. **Meat Science**, v. 87, p. 403-411, 2011.

REZENDE, F. M.; FERRAZ, J. B. S.; SILVA, R. C. G.; BALIEIRO, J. C.; ELER, J. P.; MEIRELLES, F. V.; BONIN, M. N.; CARVALHO, M. E.; CUCCO, D. C. Influência de polimorfismos genéticos sobre maciez de carne em bovinos da raça Nelore. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 7., 2008, São Carlos. **Anais...** São Carlos, 2008.

RILEY, D. G.; JOHNSON, D. D.; CHASE JR, C. C.; WEST, R. L.; COLEMAN, S. W.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C. Factors influencing tenderness in steaks from Brahman cattle. **Meat Science**, v. 70, p. 347-356, 2005.

TABOR, H. K.; RISCH, N. J.; MYERS, R. M. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 391-397, 2002.

TAIT JR., R. G.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KING, D. A.; CASAS, E.; THALLMAN, R. M.; SMITH, T. P. L.; BENNETT, G. L. μ -Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. **American Society of Animal Science**, v. 92, p. 456-466, 2014.

TAYLOR, R. G.; TASSY, C.; BRIAND, M.; ROBERT, N.; BRIAND, Y.; OUALI, A. Proteolytic activity of proteasomes on myofibrillar structures. **Molecular Biology Reports**, v. 21, p. 71-73, 1995.

TIZIOTO, P. C.; MEIRELLES, S. L.; VENERONI, G. B.; TULLIO, R. R.; ROSA, A. N.; ALENCAR, M. M.; MEDEIROS, S. R.; SIQUEIRA, F.; FEIJÓ, G. L.; SILVA, L. O.; TORRES JR, R. A.; REGITANO, L. C. A SNP in ASAP1 gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, v. 92, p. 855-857, 2012.

TIZIOTO, P. C.; TAYLOR, J. F.; DECKER, J. E.; GROMBONI, C. F.; MUDADU, M. A.; SCHNABEL, R. D.; COUTINHO, L. L.; MOURÃO, G. B.; OLIVEIRA, P. S. N.; SOUZA, M. M.; REECY, J. M.; NASSU, R. T.; BRESSANI, F. A.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T. S.; ALENCAR, M. M.; TULLIO, R. R.; NOGUEIRA, A. R. A.; REGITANO, L. C. A. Detection of quantitative trait loci for mineral content of Nelore longissimus dorsi muscle. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, p. 15-24, 2015.

VAN EENENNAAM, A. L. **DNA-based biotechnologies**. In: Beef Sire Selection Manual. The National Beef Cattle Evaluation Consortium, p. 66-73. Disponível em: http://www.ansci.cornell.edu/nbcec/sire_selection/manual.pdf. 2006.

VAN EENENNAAM, A. L.; LI, J.; THALLMAN, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, M. E.; GILL, C. A. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 891-900, 2007.

VERBEKE, W.; VANWEZEMAEL, L.; DEBARCELLOS, M. D.; KUGLER, J. O.; HOCQUETTE, J. F.; UELAND, O.; GRUNERT, K. G. European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee. Insights from a qualitative study in four EU countries. **Appetite**, v. 54, p. 289-296, 2010.

WARRIS, P. D. **Meat science: an introductory text**. Wallingford: CABI, 2000. p. 37-65.

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

WILKENING, S.; CHEN, B.; BERMEJO, J. L.; CANZIAN, F. Is there still a need for candidate gene approaches in the era of genome-wide association studies? **Genomics**, v. 93, p. 415–419, 2009.

ZAMORA, F.; AUBRY, L.; SAYD, T.; LEPETIT, J.; LEBERT, A.; SENTANDREU, M. A.; OUALI, A. Serine peptidase inhibitors, the best predictor of beef ageing amongst a large set of quantitative variables. **Meat Science**, v. 71, p. 730-742, 2005.

ZHAO, K. Y.; ARANZANA, M. J.; KIM, S.; LISTER, C.; SHINDO, C.; TANG, C.; TOOMAJIAN, C.; ZHENG, H.; DEAN, C.; MARJORAM, P.; NORDBORG, M. An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. **Plos Genetics**, v. 3, 2007.

ZHOU, G.; DUDGEON, C.; LI, M.; CAO, Y.; ZHANG, L.; JIN, H. Molecular cloning of the HGD gene and association of SNPs with meat quality traits in Chinese red cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 603–611, 2009.

ZHU, M.; ZHAO, S. Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 420-427, 2007.

CAPÍTULO 2 – Validação de genes candidatos para identificar QTL e mutações causais para maciez da carne em bovinos da raça Nelore

RESUMO – Os painéis de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) podem ser utilizados para identificar regiões no genoma que estão associadas com a característica maciez da carne. Contudo, testes de associação utilizando haplótipos, normalmente, são mais poderosos na identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci* – locos que afetam nas características quantitativas) quando comparados com testes que usam SNPs individuais, pois haplótipos podem capturar uma maior proporção da variância genética aditiva. Sendo assim o objetivo desse estudo foi detectar QTL e buscar mutações causais em genes candidatos, previamente descritos na literatura, para a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore utilizando haplótipos. Haplótipos de 52 genes candidatos foram considerados no presente estudo. Dois haplótipos, localizados nos genes *ASAP1* e *CAPN1*, foram associados com a característica maciez da carne. Essas regiões foram sequenciadas em 298 animais e 21 SNPs, que não estão presentes no painel BovineHD, foram identificados, sendo que quatro SNPs, localizados no gene *CAPN1*, foram descritos pela primeira vez no presente estudo. Posteriormente, estes SNPs foram analisados, juntamente com os demais marcadores encontrados no painel HD, por meio de haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas de tamanhos variados. Os efeitos dos haplótipos e dos SNPs foram estimados pelo método GBLUP (*Genomic Best Linear Unbiased Predictor*) e as variâncias genéticas aditivas de cada haplótipo e SNP foram calculadas considerando o valor genético dos animais. Utilizando haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas, verificou-se que o aumento do número de SNPs no haplótipo permitiu capturar maior proporção da variância genética aditiva da característica maciez da carne. Seis possíveis QTL foram identificados explicando as maiores proporções de variância genética aditiva para maciez da carne, dos quais um está no gene *CAPN1* e cinco no gene *ASAP1*. Não houve evidências de que a mutação causal para a maciez da carne tenha sido identificada nos dois genes, porém estes QTL podem ter efeito na regulação, no processo de tradução destes genes ou ainda podem estar em desequilíbrio de ligação com as mutações causais.

Palavras-chave: análise de associação, *ASAP1*, *CAPN1*, haplótipos, SNP

CAPÍTULO 2 – Candidate gene analysis to identify QTL and causal mutations for meat tenderness in Nelore cattle

ABSTRACT – The panels of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) can be used to identify genomic regions that are associated with meat tenderness. However, using haplotype association tests are usually more powerful in identifying QTL (Quantitative Trait Loci) when compared to individual SNPs analysis, because haplotypes can therefore capture a greater proportion of additive genetic variance. Thus the aim of this study was to detect QTL and search for causal mutations in candidate genes for meat tenderness in Nelore cattle using haplotypes. Haplotypes of 52 candidate genes were considered in this study. Two haplotypes, located in *ASAP1* and *CAPN1* genes were associated with meat tenderness. These regions were sequenced in 298 animals and 21 SNPs, that are not present in BovineHD panel were identified. Subsequently, these SNPs were analyzed, along with other markers from HD panel, through haplotypes constructed based on overlapping sliding windows of varying sizes. The haplotype and SNPs effects were estimated by GBLUP method (Genomic Best Linear Unbiased Predictor) and the additive genetic variance of each haplotype and SNP were calculated considering the breeding value of the animals. Using haplotypes constructed based on overlapping sliding windows, we found that increasing the number of SNPs in the haplotype allowed to capture a greater proportion of additive genetic variance of meat tenderness. Six putative QTL were identified with the greatest additive genetic variances for meat tenderness, which one was in *CAPN1* gene and five in *ASAP1* gene. The causal mutation was not identified, but these QTL may be affecting on regulation, the translation process of these genes or they may be in linkage disequilibrium with the causal mutations.

Keywords: *ASAP1*, association analysis, *CAPN1*, haplotype, SNP

2.1 Introdução

O Brasil desempenha importante papel na produção e exportação mundial de carne bovina há mais de uma década (ABIEC, 2016). O rebanho brasileiro é composto, principalmente, por animais *Bos indicus*, sendo que a Nelore é a mais relevante entre as raças de bovinos de corte. A raça Nelore é conhecida pela sua adaptabilidade em climas tropicais e resistência a parasitas, porém produz carne de menor qualidade quando comparada às raças taurinas (O'CONNOR et al., 1997; BIANCHINI et al., 2007). A maciez tem sido considerada a característica que mais influencia na satisfação do consumidor, impactando na rentabilidade do setor pecuário (HUFFMAN et al., 1996; BOLEMAN et al., 1997; GOODSON et al., 2002).

A maciez da carne é uma característica complexa, pois depende do efeito acumulativo de muitos genes e é altamente influenciada por fatores não genéticos (HOCQUETTE et al., 2012). A maciez é considerada uma característica de difícil mensuração, podendo ser medida somente após o abate dos animais. Essa limitação dificulta sua avaliação nos programas de melhoramento genético animal sendo necessário lançar mão do uso de testes de progênie para avaliação de forma direta. No entanto, os testes de progênie são onerosos em tempo e capital investido, além de impactarem diretamente no intervalo de gerações. Como consequência, o progresso genético para a maciez da carne é menor que as demais características consideradas nos programas de melhoramento (GUTIÉRREZ-GIL et al., 2008; DUNNER et al., 2013).

O ganho genético para a característica maciez da carne pode aumentar com a utilização de marcadores moleculares, pois permite a pré-seleção de animais jovens, resultando na diminuição do intervalo de gerações quando comparado com a seleção baseada nos testes de progênie (BECKMANN; SOLLER, 1987; MACHADO; MARTINEZ, 2001). Além disso, os marcadores fornecem informações sobre locos associados à maciez da carne em todo o genoma, independente se os efeitos sobre a maciez são capturados por diferentes níveis de expressão de um gene ou por variantes que codificam proteínas (VASCONCELLOS et al., 2003). Portanto, a busca por marcadores associados à maciez da carne tem se tornado uma importante

ferramenta na identificação de QTL, genes candidatos e mutações causais (PAGE et al., 2004; VAN DEN BERG et al., 2013).

Na literatura, alguns QTL têm sido relatados para maciez da carne em bovinos de corte (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2006; CURI et al., 2009; TIZIOTO et al., 2012). Entretanto, estes não vêm sendo amplamente utilizados em programas de melhoramento genético animal, dado o reduzido número de marcadores associados com a maciez de forma acurada (BOLORMA et al., 2014). Assim, encontrar as mutações causais para a característica maciez da carne continua sendo um desafio para os pesquisadores (VAN DEN BERG et al., 2013). Com o sequenciamento do genoma bovino e a disponibilidade de painéis de alta densidade de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), a identificação de regiões associadas com fenótipos de interesse tem se tornado possível (GODDARD et al., 2009; MATUKUMALLI et al., 2011).

Os painéis de SNPs também são utilizados em estudos de associação para identificar regiões alvo e genes candidatos de forma acurada (MATUKUMALLI et al., 2011). Isso é possível, pois os marcadores SNP podem estar em desequilíbrio de ligação com os QTL que afetam a característica de interesse (VAN DEN BERG et al., 2013). No entanto, utilizando SNPs nas análises de associação, somente uma pequena fração da variação genética das características quantitativas tem sido explicada (WU et al., 2014). Segundo Yang et al. (2010) os efeitos dos SNPs são pequenos e, portanto, não são significativamente associados com a característica de interesse. Além disso, de acordo com os autores, o incompleto desequilíbrio de ligação entre SNPs e variantes causais pode ser responsável pela menor proporção da variância genética aditiva explicada.

O método de associação utilizando haplótipos pode ser mais eficiente na identificação de variações causais, pois haplótipos podem capturar mais informações e aumentar a quantidade da variância fenotípica explicada pela região (AKEY et al., 2001; BARENDSE, 2011; WU et al., 2014). De acordo com Barendse (2011) haplótipos podem explicar em torno de 80% mais da variância fenotípica da característica quando comparados com SNPs. Além disso, haplótipos podem capturar possíveis interações epistáticas entre SNPs de um mesmo loco (CLARK, 2004; BARDEL et al., 2005). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi detectar QTL

para a característica maciez da carne em genes candidatos, com posterior sequenciamento das regiões identificadas e buscar a mutação causal em bovinos da raça Nelore, utilizando análises baseadas em haplótipos.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Animais

Animais de diferentes programas de melhoramento animal (DeltaGen e Paint) pertencentes à mesma população base foram utilizados nesse estudo. As análises foram realizadas com 1.616 animais da raça Nelore, machos inteiros, nascidos entre os anos de 2008 e 2011 e criados a pasto. Esses animais foram terminados em confinamento por aproximadamente 90 dias e abatidos em abatedouros comerciais com média de 729 ± 81 dias de idade. Os 1.616 animais utilizados no presente estudo são filhos de 259 touros e 1.591 mães, sendo que 654 animais são filhos de reprodutores múltiplos considerados como distintos nas análises.

Os animais estavam distribuídos em 165 grupos de contemporâneos (GC) definidos pela combinação de fazenda, ano de nascimento, grupo de manejo ao sobreano e mês e ano de abate. Foi imposta uma restrição para permanecerem no mínimo dois animais em cada GC. Para a realização dessa pesquisa, não foi necessário aprovação do Comitê de Ética, pois a mesma não envolveu manipulação dos animais, apenas o uso de registros dos bancos de dados e de amostras de carcaças em abatedouros comerciais.

2.2.2 Dados fenotípicos e genotípicos

Para a obtenção do fenótipo maciez da carne, os animais foram abatidos em abatedouros comerciais e as carcaças foram identificadas e resfriadas por 24 a 48 horas *post-mortem*. Após este período, as amostras foram colhidas do músculo *Longissimus thoracis* com 2,54 cm de espessura entre a 12^a e 13^a costelas da meia carcaça esquerda de cada animal. As amostras foram embaladas a vácuo e mantidas em câmara fria por 150 horas em temperatura de 1°C. Após o período de

resfriamento, com o estabelecimento pleno do *rigor mortis*, as amostras foram congeladas a -20°C.

Para a realização do ensaio de força de cisalhamento Warner-Bratzler (WBSF), uma medida mecânica da maciez, as amostras foram descongeladas em câmara fria a 1°C em torno de 24 horas. Ao atingirem a temperatura interna de 5°C, foram assadas em forno até atingirem a temperatura interna de 71°C, utilizando termopar posicionado no centro geométrico da amostra, segundo procedimento padronizado e proposto por Wheeler et al. (1995). A força de cisalhamento (WBSF) foi obtida utilizando o equipamento SALTER Warner-Bratzler shear force mecânico. Para uma melhor precisão, foram obtidas oito amostras em cilindros de 1,27 cm retirados da região central de cada amostra em sentido longitudinal às fibras musculares e a média das mensurações de WBSF foi utilizada nas análises.

O DNA foi extraído a partir do músculo *Longissimus thoracis* utilizando o DNeasy Bloody & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A genotipagem foi realizada utilizando o chip Illumina BovineHD Infinium Assay® com o Illumina HiScan System®. O BovineHD BeadChip contém 777.962 marcadores SNP ao longo do genoma com uma média de 3,43 kilobases (kb) de distância entre os marcadores. O software Illumina Genome Studio foi utilizado para analisar as imagens HiScan. Os custos referentes à coleta de informações fenotípicas e genotípicas dos animais foram financiados pelo projeto temático “Ferramentas genômicas no melhoramento genético de características de importância econômica direta em bovinos da raça Nelore”, Processo FAPESP 2009/16118-5. O controle de qualidade utilizado para as amostras foi baseado em *call rate* maior do que 90%, sendo que 1.616 amostras passaram por este controle. Marcadores SNP com *call rate* abaixo de 95%, frequência alélica menor que 5%, nível de significância do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg menor que 10^{-5} e aqueles que estão localizados em cromossomos não autossômicos foram excluídos. Um total de 451.040 SNPs permaneceram para as análises estatísticas.

2.2.3 Análises dos genes candidatos

Cinquenta e dois genes, previamente associados com características de qualidade da carne em estudos encontrados na literatura, foram escolhidos para serem analisados (KEELE et al., 1999; CASAS et al., 2000; CASAS et al., 2003; CASAS et al., 2006; ALEXANDER et al., 2007; DAVIS et al., 2007; ZHOU et al., 2009; REARDON et al., 2010; SEVANE et al., 2013; TIZIOTO et al., 2013; BRAZ et al., 2015). Os genes utilizados na análise de associação foram: *HGD*, *FABP3*, *GDF-8*, *PRKAG3*, *CHN1*, *DES*, *TTN*, *RORC*, *PI4KB*, *PRKAB2*, *LEPR*, *LEP*, *CACNA2D1*, *IGF-1*, *PPARA*, *MYF-5*, *MYF-6*, *CACNA1C*, *PPARGC1A*, *CAST*, *EPOR*, *AK3*, *CAPN3*, *MC3R*, *TNNC2*, *PTGIS*, *IDH3B*, *MTPAP*, *ASAP1*, *DGAT1*, *TG*, *FABP4*, *FABP5*, *CA3*, *MYOD1*, *CALCA*, *UCP3*, *SDHD*, *CAPN2*, *TGFB2*, *MYOG*, *TGFB1*, *RYR1*, *CCAAT*, *GH1*, *GHR*, *GHRL*, *PPARG*, *SCD*, *ANK1*, *CAPN1* e *IGF2*. As posições genômicas para cada gene foram identificadas na sequência de referência *Bos taurus* UMD 3.1, às quais foram acrescentados 1.500 pares de bases (pb) no início e no fim da posição de cada gene, possibilitando a análise das regiões adjacentes dos genes. A quantidade de SNPs em cada gene é apresentada na Tabela 1. Nos genes *CCAAT*, *MYF-5* e *MYF-6* não há SNPs no painel BoniveHD e os SNPs localizados nos genes *CALCA*, *MC3R* e *TNNC2* foram eliminados do banco de dados pelo controle de qualidade dos marcadores. Dessa forma, esses seis genes não foram considerados nas análises de associação dos marcadores com a característica maciez da carne.

O software fastPHASE (SCHEET; STEPHENS, 2006) foi utilizado para a reconstrução dos haplótipos e a estimação dos genótipos perdidos. A definição dos blocos de haplótipos, descrita por Gabriel et al. (2002), e as análises de desequilíbrio de ligação foram realizadas utilizando o software HaploView (BARRETT et al., 2005). Análises estatísticas incorporando as informações dos haplótipos foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.3 (SAS Institute, Cary NC), implementando o método de estimação REML, para cada núcleo de haplótipo utilizando o modelo touro, incluindo o GC como efeito fixo, o somatório do coeficiente de regressão de cada alelo multiplicado pelo número de cópias do respectivo alelo do haplótipo e o erro aleatório. Os SNPs que não estão presentes em blocos de haplótipos em desequilíbrio de ligação (“SNPs órfãos”) foram analisados individualmente utilizando o mesmo modelo.

A correção de Bonferroni foi aplicada a 10% para ajustar para múltiplos testes, sendo que nesta abordagem, a probabilidade limite para o teste é equivalente a 0,10 dividido pelo número de testes realizados ($P = 0,10/363 = 0,0003$, para 363 testes realizados para os 46 genes).

Tabela 1. Número de SNPs do painel BovineHD localizados nos genes candidatos antes (ACQ) e depois (DCQ) da análise do controle de qualidade dos marcadores.

Genes	ACQ	DCQ	Genes	ACQ	DCQ
<i>AK3</i>	9	6	<i>IGF-2</i>	4	1
<i>ANK1</i>	67	39	<i>LEP</i>	15	8
<i>ASAP1</i>	187	156	<i>LEPR</i>	12	4
<i>CA3</i>	7	4	<i>MC3R</i>	1	0
<i>CACNA1C</i>	148	52	<i>MTPAP</i>	14	8
<i>CACNA2D1</i>	159	70	<i>MYF-5</i>	0	0
<i>CALCA</i>	2	0	<i>MYF-6</i>	0	0
<i>CAPN1</i>	12	11	<i>MYOD1</i>	3	2
<i>CAPN2</i>	26	20	<i>MYOG</i>	2	1
<i>CAPN3</i>	16	8	<i>PI4KB</i>	8	2
<i>CAST</i>	91	77	<i>PPARA</i>	34	15
<i>CCAAT</i>	0	0	<i>PPARG</i>	34	23
<i>CHN1</i>	65	48	<i>PPARGC1A</i>	224	146
<i>DES</i>	2	2	<i>PRKAB2</i>	10	5
<i>DGAT1</i>	3	1	<i>PRKAG3</i>	11	6
<i>EPOR</i>	2	2	<i>PTGIS</i>	13	12
<i>FABP3</i>	18	13	<i>RORC</i>	9	5
<i>FABP4</i>	2	2	<i>RYR1</i>	56	22
<i>FABP5</i>	4	1	<i>SCD</i>	8	4
<i>GDF-8</i>	2	2	<i>SDHD</i>	4	3
<i>GH1</i>	4	3	<i>TG</i>	3	2
<i>GHR</i>	49	34	<i>TGFB1</i>	5	2
<i>GHRL</i>	2	2	<i>TGFB2</i>	44	24
<i>HGD</i>	21	14	<i>TNNC2</i>	2	0
<i>IDH3B</i>	3	2	<i>TTN</i>	98	35
<i>IGF-1</i>	24	3	<i>UCP3</i>	6	3
Total				1.545	905

2.2.4 Genotipagem e sequenciamento

As regiões dos éxons localizadas próximas ou dentro das regiões dos haplótipos associados com WBSF, após a correção de Bonferroni, foram escolhidas para sequenciamento e busca da mutação causal. Inicialmente, *primers* foram desenhados para amplificar estas regiões (baseados nas sequências Gene ID:

281661 e 327705 do NCBI), como apresentado na Tabela 2. Os pares de *primers* foram desenhados utilizando o software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), e a qualidade dos mesmos foi verificada com o OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

O mix de reação para a realização da PCR foi composto por 1,0 µL de DNA (60 ng/µL), 1,5 µL de cada *primer* (15 pM), 7,5 µL de GoTaq Colorless Master Mix Promega e 3,5 µL de água livre de nucleases, em um volume final de 15 µL. O termociclador Master Cycler Gradient 5331 Eppendorf foi usado para realizar a amplificação seguindo as condições: desnaturação a 95°C por 5 minuto, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dependendo da temperatura de cada *primer* (Tabela 2) por 1 minuto e a extensão a 72°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Após o término das amplificações, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi misturado com 2 µL de tampão de corrida (com Gelred) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM, pH 8,3) a 100 V, por aproximadamente 40 minutos. A visualização foi feita sobre luz ultra violeta, o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio- Rad) e analisado com o software Image Analysis (Kodak), com a finalidade de analisar a eficiência da PCR e o tamanho do fragmento amplificado. As amostras foram mantidas a 4°C. Os produtos de PCR foram submetidos à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega.

Vinte e cinco animais menos aparentados foram individualmente sequenciados para identificar variantes nas regiões produzidas pelos pares de *primers* (*forward* e *reverse*). O sequenciamento foi realizado pela reação de terminação de cadeia de dideoxinucleotídeos em um sequenciador ABI 3730 XL utilizando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) em serviço terceirizado pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp. Os polimorfismos dentro de cada região foram identificados com o programa CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligher/download.htm>). As regiões identificadas

contendo polimorfismos foram posteriormente sequenciadas em todos os animais pertencentes aos grupos de contemporâneos dos 25 animais inicialmente sequenciados. Com isso, 298 animais tiveram essas regiões do genoma sequenciadas.

2.2.5 Análises de associação

Os SNPs encontrados por meio do sequenciamento foram adicionados aos demais marcadores do painel BovineHD e seus genótipos foram imputados para os 1.318 animais não sequenciados, usando BEAGLE v3.3.2 (BROWNING; BROWNING, 2007) sem informação de pedigree. Sendo assim, nas análises estatísticas, foram considerados 1.616 animais. Os haplótipos foram construídos novamente, pelo método descrito anteriormente, com base no desequilíbrio de ligação dos marcadores (GABRIEL et al., 2002). Além disso, foram realizadas duas análises estatísticas para os genes com novos SNPs encontrados pelo sequenciamento, uma utilizou SNPs individuais e outra haplótipos de tamanhos variados construídos pelo método de janelas sobrepostas (MATHIAS et al., 2006). Nesta metodologia, os haplótipos são construídos da seguinte forma: dado um conjunto ordenado de marcadores (SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, ..., SNPn), haplótipos são construídos com base em janelas sobrepostas em sequência. Exemplo, haplótipo de 3 SNPs: o primeiro haplótipo será composto pelos marcadores SNP1-SNP2-SNP3, o segundo pelos SNP2-SNP3-SNP4, o terceiro pelos SNP3-SNP4-SNP5 e assim por diante, até o último SNP da região alvo. Para as análises do presente estudo, foram utilizados haplótipos com tamanhos de 5, 7 e 9 SNPs.

Os SNPs e haplótipos foram associados separadamente com WBSF utilizando o software GEMMA (ZHOU; STEPHENS, 2012) ajustando para um modelo misto linear univariado (similar ao GBLUP) como segue:

$$y = W\alpha + X\beta + u + e$$

em que: y é um vetor do fenótipo WBSF para 1.616 indivíduos; W é uma matriz de incidência dos efeitos fixos (GC); α é um vetor correspondente aos efeitos fixos incluindo o intercepto; X é uma matriz de SNPs ou de haplótipos identificados para cada animal; β é o efeito de cada SNP ou haplótipo; u é um vetor de efeitos genéticos aditivos residuais aleatórios; e é um vetor de resíduos. Assume-se que $u \sim MVN(0, GV_g)$, em que G é a matriz de parentesco genômica e V_g é o componente de variância genética aditiva poligênica. Para o resíduo assume-se que $e \sim MVN(0, IV_e)$ em que V_e é o componente de variância residual e I é a matriz identidade. Os componentes de variância para os efeitos genéticos aditivos e residuais de cada haplótipo foram estimados da seguinte forma: $y = \sum_{i=1}^k X_i \beta_i + \epsilon$, sendo que $\beta_i \sim N(0, \sigma_i^2/p_i)$, em que σ_i^2 é a variância do $i^{ésimo}$ haplótipo e p_i é a categoria do haplótipo i .

A matriz G foi construída utilizando genótipos padronizados dos 451.040 SNPs usando GEMMA, como segue:

$$G = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \frac{1}{v_{m_i}} (m_i - 1_n \bar{m}_i)(m_i - 1_n \bar{m}_i)^T$$

em que: M é a matriz de genótipos dos 451.040 SNPs, na qual m_i é a i^{th} coluna representando os genótipos em todos as n animais para o i^{th} SNP (0, 1 ou 2), $\bar{m}_i$ é a média da amostra do genótipo, v_{m_i} é a variância da amostra do i^{th} SNP e 1_n é um vetor de 1s para os n animais. Para que a matriz G não fosse superestimada, devido aos haplótipos serem construídos sobrepostamente, esta foi construída utilizando apenas os SNPs e a mesma matriz foi utilizada nas análises de SNPs e haplótipos.

Os valores genéticos dos animais foram calculados, para cada SNP e cada haplótipo, como o somatório das estimativas dos efeitos de cada alelo multiplicado pelo número de cópias do respectivo alelo do haplótipo para cada animal. Posteriormente, foi calculada a variância destes valores genéticos para cada SNP e haplótipo ($Var(vg_i)$). As percentagens da variância genética aditiva ($V_{a_i}(\%)$) explicada por cada SNP e haplótipo foram estimadas como:

$$V_{a_i}(\%) = \frac{Var(vg_i)}{\sigma_a^2} \times 100$$

em que: $Var(vg_i)$ é a variância dos valores genéticos estimados para cada i^{th} SNP ou haplótipo, σ_a^2 é a variância genética aditiva total devido aos SNPs ($\sum_{i=1}^{451040} 2p_iq_ia_i^2 = 600,79 \text{ kg}^2$), em que p e q são as frequências alélicas do i^{th} SNP e a é o efeito aditivo do i^{th} SNP.

2.3 Resultados e Discussão

A média para a característica maciez da carne (WBSF) dos 1.616 animais inteiros da raça Nelore foi $5,21 \pm 1,38 \text{ kg}$, com um valor mínimo de 1,56 kg e máximo de 11,20 kg. Para animais *Bos indicus*, carnes com valores de força de cisalhamento menores que 5kg podem ser consideradas potencialmente macias após o cozimento (SHACKELFORD et al., 1991; KOOHMARAIE et al., 2002). Assim, em média, os animais do presente estudo produziram carnes próximas do que se é considerado macia.

2.3.1 Análises dos genes candidatos

Dois haplótipos foram significativamente associados ($P \leq 0,10$) com a característica maciez da carne após a correção de Bonferroni, os quais estão localizados nos genes *ASAP1* e *CAPN1*. No gene *ASAP1*, um haplótipo formado por 20 SNPs, abrangendo 36.884 pb e localizado no íntron 3 foi associado com WBSF ($P = 0,072$). O gene *ASAP1* (ArfGAP com domínio SH3), também conhecido como *DDEF1*, está localizado no cromossomo 14 em bovinos, possuindo 369.240 pb e 31 éxons (Gene ID: 327705). O *ASAP1* codifica uma proteína de transdução de sinal que eleva o potencial da diferenciação de fibroblastos em adipócitos (KING et al., 1999). Adipócitos são células que compõem os tecidos adiposos subcutâneo, visceral, intramuscular (marmoreio) e intermuscular (HAUSMAN et al., 2014).

Os depósitos de tecido adiposo de gordura subcutânea e intramuscular são econômica e fisiologicamente importantes na produção de carne bovina, pois o

marmoreio melhora a maciez pela redução da densidade do tecido e diminuição da força dos tecidos conectivos (HAUSMAN et al., 2009). A gordura subcutânea isola a carcaça e leva a um lento resfriamento *post-mortem*, o que pode melhorar a maciez pela redução do encurtamento das fibras pelo frio (FIEMS et al., 2000). Em muitos estudos têm-se mostrado correlação positiva entre escores de marmoreio e gordura subcutânea com força de cisalhamento (MAY et al., 1992; DILGER et al., 2008; TAIT JR. et al., 2008; OLER et al., 2015). Isto pode explicar a associação encontrada no presente estudo entre o gene *ASAP1* e WBSF. Além disso, Tizioto et al. (2012) e Tizioto et al. (2013) encontraram associação de SNPs no *ASAP1* com maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

O segundo haplótipo significativo ($P = 0,066$) foi localizado no gene *CAPN1*, formado por 3 SNPs que abrangem 3.129 pb localizados da região do íntron 14 ao 19. O gene *CAPN1* está mapeado no cromossomo 29 em bovinos, possui 36.854 pb, 24 éxons (Gene ID: 281661), e codifica uma proteína ativada pelo cálcio micromolar (μ -calpaína), a qual degrada proteínas miofibrilares durante o período *post-mortem*, tornando a carne mais macia. A μ -calpaína é a enzima mais importante envolvida no processo de maciez da carne (KOOHMARAIE, 1996). O gene *CAST*, mapeado no cromossomo 7, codifica a calpastatina, a qual inibe a atividade da calpaína e assim promove o balanço entre estas duas enzimas, responsáveis pela regulação da proteólise *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1996; CALVO et al., 2014). O sistema proteolítico dependente do cálcio tem sido considerado como um dos mais importantes fatores responsáveis pelas variações na extensão do amaciamento da carne (CROALL; DEMARTINO, 1991; KOOHMARAIE, 1994).

Estudos têm demonstrado associações significativas entre os genes *CAPN1* e *CAST* com força de cisalhamento, sugerindo que mutações que ocorrem nestes genes podem ser responsáveis por variações na maciez (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; CASAS et al., 2005; WHITE et al., 2005; CASAS et al., 2006; CURT et al., 2009; TIZIOTO et al., 2013; CALVO et al., 2014). Por outro lado, no presente estudo, o gene *CAST* não apresentou associação significativa com a maciez, semelhante ao descrito por Café et al. (2010), Tizioto et al. (2013) e Lee et al. (2014). Adicionalmente, Giusti et al. (2013) não encontraram correlação entre a

maciez da carne e níveis de expressão do *CAST* em animais da raça Nelore. Fonseca (2016) relatou que o *CAST* não foi diferencialmente expresso em amostras divergentes para maciez da carne em animais da mesma população base do presente estudo. Além disso, o músculo *Longissimus*, o qual foi utilizado para a realização das análises de WBSF do presente estudo, possui quantidades predominantes de fibras do tipo IIB (branca) e de acordo com Koohmaraie et al. (1988); Koohmaraie (1996) e Ouali e Talmant (1990) existe: menor atividade da calpastatina neste tipo de fibra, quando comparado com músculos de fibras vermelhas.

Para o gene *ASAP1*, apenas o éxon 4, por ser o éxon mais próximo da região do haplótipo significativo, foi sequenciado usando apenas um par de *primers* (Tabela 2). Nove éxons localizados próximos ou dentro do haplótipo significativo no gene *CAPN1* foram sequenciados com a utilização de 5 pares de *primers* (Tabela 2). Este procedimento identificou 21 SNPs nestas regiões, sendo 17 SNPs no *CAPN1* cobrindo parte do íntron 12 até parte do íntron 21 e 4 SNPs no gene *ASAP1*, incluindo o éxon 4 e o íntron 4 parcialmente (Tabela 3). As sequências contendo os polimorfismos de cada gene foram submetidas ao banco de dados do NCBI sob os números de acesso KT023263.1 e KT023264.1. Os SNPs *g.22859G>C*, *g.24616G>A*, *g.24664C>T* e *g.24696C>T* não possuem anotação no *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP), portanto foram submetidos ao mesmo sob os números de acesso ss1998444992, ss1998444993, ss1998444994 e ss1998444995, respectivamente.

Entre os SNPs encontrados, o *g.22176C>T* está presente no éxon 14 (Tabela 3) e é uma substituição sinônima, ou seja, não há mudança de aminoácido na proteína do gene *CAPN1*. Entretanto, o *g.22180G>A* também está localizado no éxon 14 do gene *CAPN1* e produz uma substituição do aminoácido valina por isoleucina (Val530Ile). Dessa forma, esta substituição pode afetar a função da proteína e, possivelmente, ser a mutação causal para a maciez, sendo que este SNP tem sido associado com WBSF (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; LEE et al., 2014). Page et al. (2004) relataram que animais homozigotos GG apresentaram menores valores para força de cisalhamento do que animais heterozigotos ou homozigotos AA para este marcador.

Tabela 2. Pares de *primers* usados na amplificação das regiões dos genes *CAPN1* e *ASAP1*.

Gene	Região	Primer (5'-3')	Tam (pb)	Temp (°C)
CAPN1	I12*-14*	F:GTGACTGAACCGTGACCCAG R:CTAGAGACCAAGACACAGGACAC	550	60
CAPN1	E15-16*	F:CTGACCTGCTCTCCCCACCTTC R:GTGCCCCGCCCTCAAAGACCG	369	59
CAPN1	E17-17*	F:CTGGTCGGGTTGAGGTGTTGAG R:CTGCTCTTGGGACAGGTCAC	207	63
CAPN1	I17-19*	F:CTCACTCACCCAGCGTCTG R:GTTACCAGGAGAAAAAGGCAG	631	63
CAPN1	I19*-I21*	F:CACTCTGCCAGCCTTCCGTC R:GTGAGAAAAACCCACTGCCCTG	519	57
ASAP1	I3*-I4*	F:CACAACAAATGCGGTTATGAATGAG R:GCTTGGACTGACAGAAGAAGT	381	61

*Parcial; I = íntron; E = éxon; F = forward; R = reverse; Tam = tamanho do fragmento amplificado em pares de base; Temp = temperatura de anelamento em graus Celsius.

Para o gene *ASAP1*, não há trabalhos na literatura que analisaram a associação dos quatro SNPs encontrados pelo sequenciamento com maciez da carne em bovinos de corte. Tizioto et al. (2012) identificaram um SNP significativamente associado com maciez da carne, no íntron 13 do *ASAP1*, em uma análise de gene candidato em bovinos da raça Nelore. O SNP *g.230281C>T* está situado no éxon 4, mas esta substituição não causa alteração de aminoácido.

2.3.2 Análise de associação

Foram formados 25 blocos de haplótipos com os 156 SNPs presentes no gene *ASAP1*, sendo que os principais blocos estão apresentados na Figura 1. O bloco de haplótipo que foi significativamente associado ($P \leq 0,10$) com a característica WBSF está identificado pela caixa azul. Os quatro SNPs identificados pelo sequenciamento neste gene (*g.230281C>T*, *g.230306C>G*, *g.230313G>A* e *g.230344T>C*), juntamente com o *rs110918100* do painel BovineHD, formam um bloco de haplótipo (estão em alto desequilíbrio de ligação) e estão identificados pela caixa verde. Mesmo os dois blocos de haplótipos, o que foi significativo e o bloco contendo os novos SNPs, estarem localizados a 26 kb de distância, é possível que

exista desequilíbrio de ligação entre os mesmos (ESPIGOLAN et al., 2015). Entretanto, pode-se notar que isto não ocorreu, pois os quatro SNPs identificados pelo sequenciamento não estão presentes no bloco de haplótipo significativo do *ASAP1* para a característica WBSF.

Tabela 3. Descrição dos SNPs encontrados nos genes significativos para bovinos da raça Nelore.

SNP	RefSNP	PC	Gene	Região	PG	Variante
<i>g.21798A>G</i>	<i>rs481432081</i>	44085260	<i>CAPN1</i>	I 12	21798	A/G
<i>g.22176C>T</i>	<i>rs17871050</i>	44085638	<i>CAPN1</i>	E 14	22176	C/T
<i>g.22180G>A</i>	<i>rs17871051</i>	44085642	<i>CAPN1</i>	E 14	22180	G/A
<i>g.22859G>C</i>	<i>ss1998444992</i>	44086321	<i>CAPN1</i>	I 15	22859	G/C
<i>g.22980C>A</i>	<i>rs721496944</i>	44086442	<i>CAPN1</i>	I 16	22980	C/A
<i>g.23046T>C</i>	<i>rs464736006</i>	44086508	<i>CAPN1</i>	I 16	23046	T/C
<i>g.24543G>A</i>	<i>rs17872152</i>	44088005	<i>CAPN1</i>	I 18	24543	G/A
<i>g.24565A>G</i>	<i>rs17872153</i>	44088027	<i>CAPN1</i>	I 18	24565	A/G
<i>g.24574T>G</i>	<i>rs110896665</i>	44088036	<i>CAPN1</i>	I 18	24574	T/G
<i>g.24616G>A</i>	<i>ss1998444993</i>	44088078	<i>CAPN1</i>	I 18	24616	G/A
<i>g.24625T>C</i>	<i>rs447978510</i>	44088087	<i>CAPN1</i>	I 18	24625	T/C
<i>g.24664C>T</i>	<i>ss1998444994</i>	44088126	<i>CAPN1</i>	I 18	24664	C/T
<i>g.24696C>T</i>	<i>ss1998444995</i>	44088158	<i>CAPN1</i>	I 18	24696	C/T
<i>g.24870C>T</i>	<i>rs715244311</i>	44088332	<i>CAPN1</i>	I 19	24870	C/T
<i>g.25779A>G</i>	<i>rs110022482</i>	44089241	<i>CAPN1</i>	I 20	25779	A/G
<i>g.25801G>A</i>	<i>rs110480144</i>	44089263	<i>CAPN1</i>	I 20	25801	G/A
<i>g.26021C>T</i>	<i>rs719993085</i>	44089483	<i>CAPN1</i>	I 21	26021	C/T
<i>g.230281C>T</i>	<i>rs109552294</i>	11558261	<i>ASAP1</i>	E 4	230281	C/T
<i>g.230306C>G</i>	<i>rs109256712</i>	11558286	<i>ASAP1</i>	I 4	230306	C/G
<i>g.230313G>A</i>	<i>rs211332127</i>	11558293	<i>ASAP1</i>	I 4	230313	G/A
<i>g.230344T>C</i>	<i>rs714391435</i>	11558324	<i>ASAP1</i>	I 4	230344	T/C

RefSNP = número de identificação do SNP; PC = posição do SNP no cromossomo; PG = posição do SNP no gene; E = éxons; I = íntron.

Existem três blocos de haplótipos no gene *CAPN1*, sendo o primeiro bloco composto por dois SNPs do painel BovineHD (*rs17872099* e *rs17871986*). O segundo e o terceiro blocos de haplótipos foram formados com SNPs identificados pelo sequenciamento e SNPs do painel BovineHD (Figura 2). No segundo bloco de haplótipo, é possível notar três SNPs que estão destacados com caixas azuis (*rs135658374*, *rs17871058* e *rs17872050*). Estes SNPs formaram um bloco de

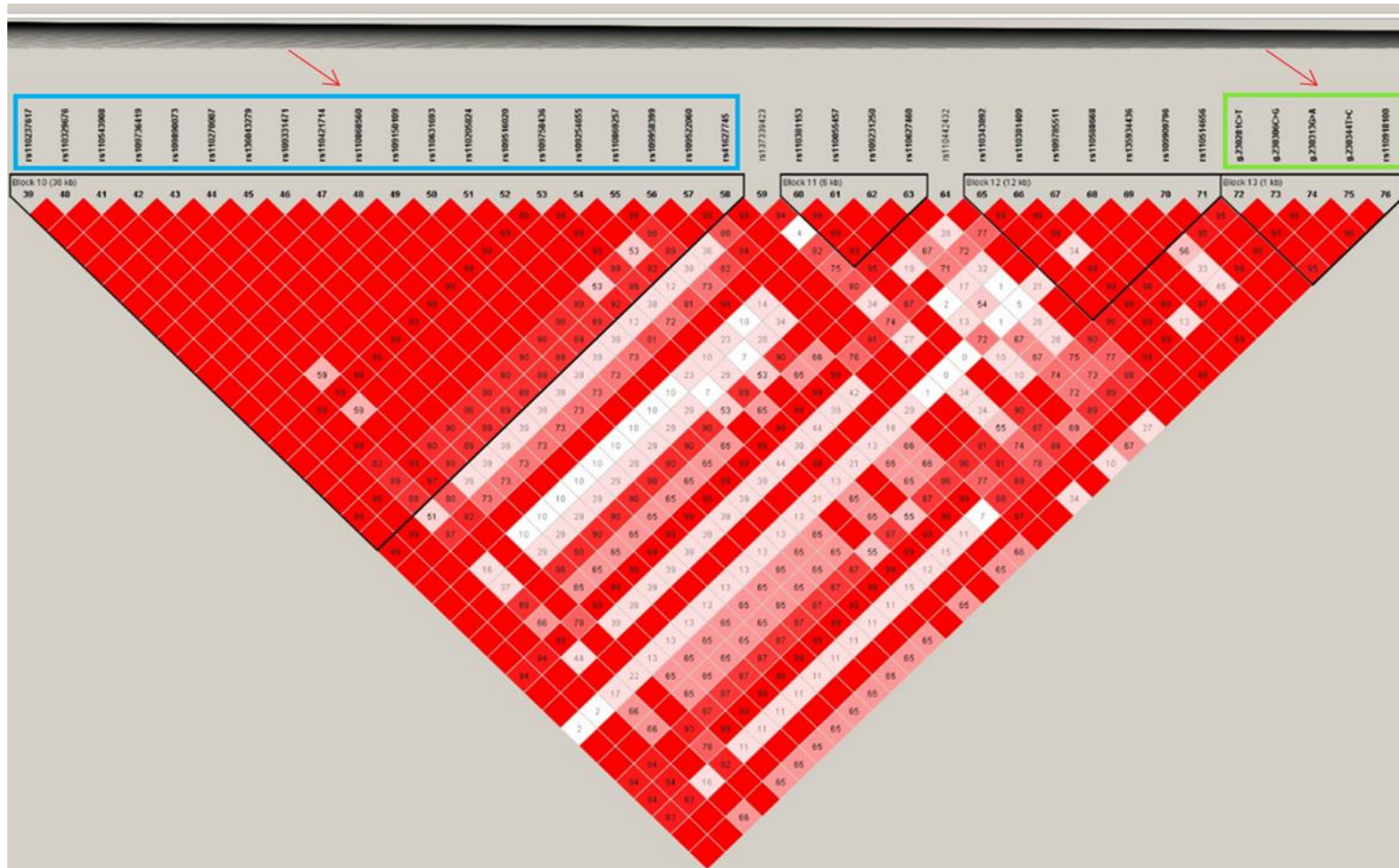


Figura 1. Saída do software Haploview com a estrutura de blocos de desequilíbrio de ligação do gene ASAP1. Os blocos de haplótipos foram determinados utilizando os critérios descritos por Gabriel et al. (2002). A posição física de cada SNP está representada na parte superior do diagrama. Valores de D' para o desequilíbrio de ligação são indicados na parte inferior do diagrama para cada par de SNP. Forte desequilíbrio de ligação ($D' \geq 0,98$, $\text{LOD} \geq 2$) está indicado pela cor vermelha, cores variando de vermelho a branco indicam graus diferentes de desequilíbrio de ligação de acordo com a cor, sendo que o branco indica desequilíbrio de ligação muito fraco ($D' < 0,98$, $\text{LOD} < 2$). Blocos de haplótipos são indicados pelas linhas pretas.



Figura 2. Saída do software Haploview com a definição da estrutura de blocos de desequilíbrio de ligação do gene CAPN1. Os blocos de haplótipos foram determinados utilizando os critérios descritos por Gabriel et al. (2002). A posição física de cada SNP está representada na parte superior do diagrama. Valores de D' para o desequilíbrio de ligação são indicados na parte inferior do diagrama para cada par de SNP. Forte desequilíbrio de ligação ($D' \geq 0,98$, $LOD \geq 2$) está indicado pela cor vermelha, cores variando de vermelho a branco indicam graus diferentes de desequilíbrio de ligação de acordo com a cor, sendo que o branco indica desequilíbrio de ligação muito fraco ($D' < 0,98$, $LOD < 2$). Blocos de haplótipos são indicados pelas linhas pretas.

haplótipo na primeira análise, o qual foi associado significativamente ($P \leq 0,10$) com WBSF. Com a inclusão dos novos SNPs, esse haplótipo passou a ter 17 SNPs, sendo os três SNPs do painel HD (*rs135658374*, *rs17871058* e *rs17872050*) e 14 SNPs identificados pelo sequenciamento (*g.21798A>G*, *g.22176C>T*, *g.22180G>A*, *g.22859G>C*, *g.22980C>A*, *g.23046T>C*, *g.24543G>A*, *g.24565A>G*, *g.24574T>G*, *g.24616G>A*, *g.24625T>C*, *g.24664C>T*, *g.24696C>T*, *g.24870C>T*). Dois SNPs identificados pelo sequenciamento (*g.25779A>G* e *g.25801G>A*) não formaram blocos de haplótipos, portanto não estão em alto desequilíbrio de ligação com os demais SNPs localizados no gene *CAPN1*. O SNP *g.26021C>G* está em desequilíbrio de ligação com outros três SNPs do painel BovineHD (*rs134827338*, *rs135736399* e *rs133641190*), formando um haplótipo.

Todos os haplótipos foram analisados novamente seguindo os mesmos critérios da primeira análise de associação, entretanto, não apresentaram associação significativa com WBSF após a correção de Bonferroni. A inclusão dos 14 SNPs no bloco de haplótipo do gene *CAPN1*, fez com que a evidência de associação da região com WBSF fosse “perdida”. Isso pode ser explicado pelo aumento do número de SNPs no núcleo de haplótipo e, conseqüentemente, o aumento na quantidade de alelos existentes, diminuindo o poder dos testes estatísticos para detectar associação significativa. O haplótipo composto pelos quatro SNPs do gene *ASAP1*, identificados no sequenciamento (*g.230281C>T*, *g.230306C>G*, *g.230313G>A* e *g.230344T>C*), juntamente com o *rs110918100* do painel BovineHD, também não apresentou associação com a característica WBSF.

A metodologia de haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas de tamanhos variados foi realizada a fim de estimar a variância genética aditiva das regiões dos genes *ASAP1* e *CAPN1*. Em relação ao gene *CAPN1*, o SNP *rs17871058* do painel BovineHD apresentou a maior quantidade de variância genética aditiva ($0,020 \text{ kg}^2$) para WBSF, como apresentado na Figura 3. Dos SNPs encontrados pelo sequenciamento, o SNP *g.22859G>C* foi o que apresentou a maior variância genética aditiva para WBSF ($0,017 \text{ kg}^2$). Ajustando todos os SNPs do gene *CAPN1* simultaneamente no modelo, 0,10% da variância genética aditiva total foi explicada. Dois haplótipos, com 9 SNPs cada, apresentaram a maior variância genética aditiva no

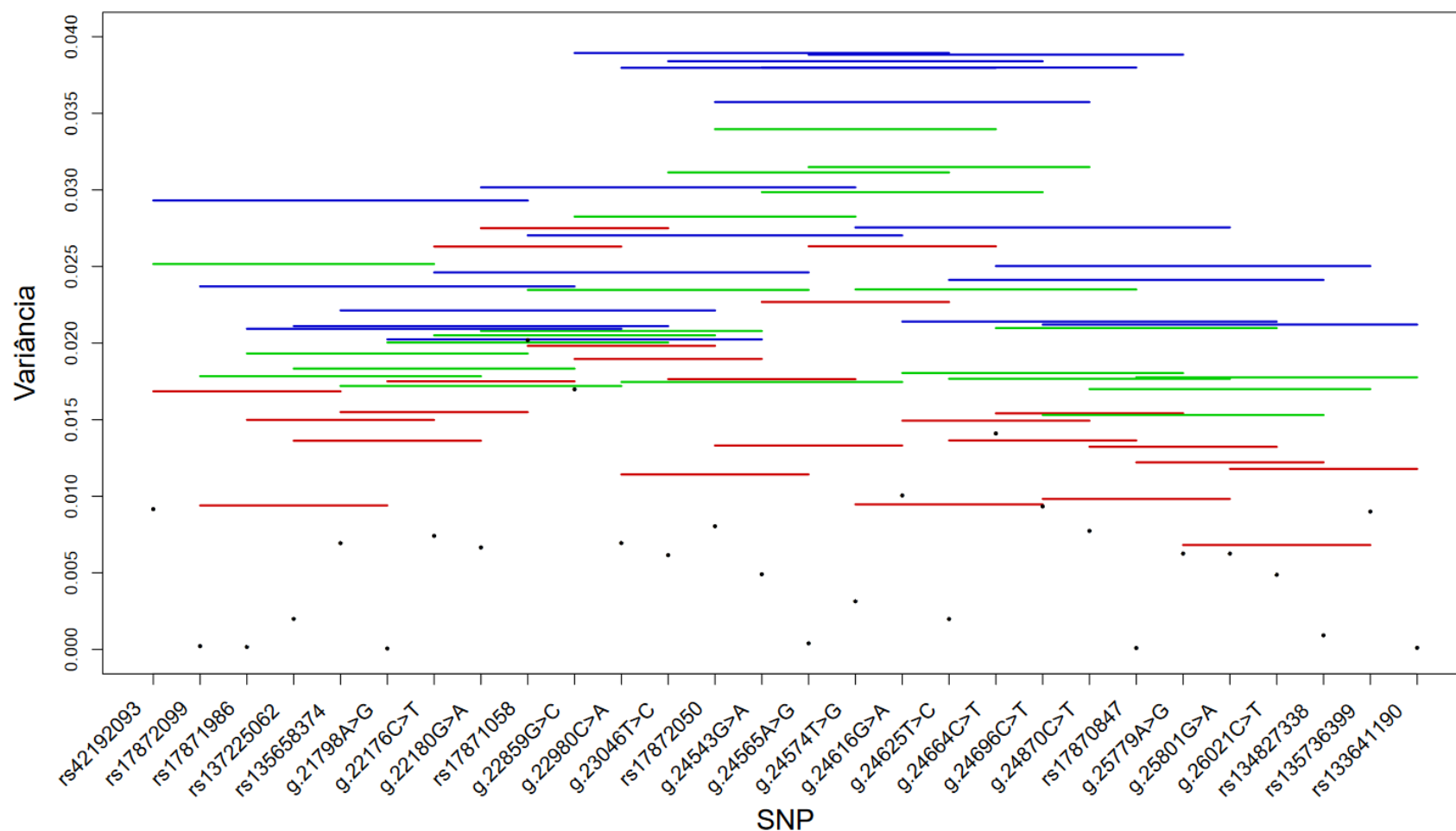


Figura 3. Variância genética aditiva dos efeitos dos marcadores SNP individuais (pontos) e haplótipos (linhas) baseados em janelas sobrepostas usando cinco (vermelho), sete (verde) e nove (azul) marcadores em todo o gene *CAPN1* em bovinos da raça Nelore.

gene *CAPN1* (0,039 kg²) para WBSF. O primeiro haplótipo tem início no SNP *g.22859G>C* até o *g.24625T>C* e o segundo no *g.24565A>G* ao *g.25779A>G*, com um total de 14 SNPs abrangendo uma região de 2.921 pb. Isto indica que esta região pode ser um QTL que está influenciando na variação da maciez da carne para a população estudada.

Todos os SNPs presentes neste QTL estão localizados entre o íntron 15 (*g.22859G>C*) até o íntron 20 (*g.25779A>G*). No entanto, não foram encontradas variações localizadas nos éxons deste QTL. Dessa forma, o QTL pode estar em desequilíbrio de ligação com a mutação causal para maciez da carne nesta população. O SNP *rs17872050* (BovineHD) está situado nesse QTL e alguns autores têm relatado sua associação com a maciez da carne em taurinos, mesmo este SNP estando em íntron (WHITE et al., 2005; CASAS et al., 2006; CURI et al., 2009). Além disso, o SNP *g.22980C>A* está localizado em uma região de *splicing* (posição 6 do íntron 16). Polimorfismos em regiões de *splicing* podem produzir diferentes transcritos de um mesmo gene, alterando ou até mesmo causando a perda de função da proteína e, dessa forma, exercendo função regulatória da expressão do gene (COULOMBE-HUNTINGTON et al., 2009; WOOLFE et al., 2010; DE SOUZA et al., 2011; LU et al., 2012). Assim, este SNP pode influenciar na produção de isoformas que podem ocorrer neste gene, podendo afetar o fenótipo dos animais (FABER et al., 2011; KURMANGALIYEV et al., 2013). Entretanto, até o momento, o gene *CAPN1* em bovinos não apresenta isoformas descritas.

Neste QTL existe uma região responsável pela síntese do microRNA 2407 (Gene ID: 100313430), o qual está localizado na região que se inicia na posição 44088087 e termina na 44088159 pb (73 nucleotídeos) do cromossomo 14, referente à região do íntron 18 do gene *CAPN1*. Os SNPs *g.24625T>C*, *g.24664C>T* e *g.24696C>T* estão localizados nessa região. MicroRNAs (miRNAs) atuam como silenciadores pós-transcricionais levando à diminuição ou aumento na expressão do gene de interesse (BARTEL, 2004; HE; HANNON, 2004; PILLAI et al., 2007; VASUDEVAN et al., 2007; PLACE et al., 2008; LIN et al., 2009; KIM et al., 2010). Este miRNA pode auxiliar na expressão do *CAPN1* pela regulação de genes que influenciam negativamente na expressão do mesmo, ou pela influência na expressão de genes que

cooperam com o *CAPN1* em processos biológicos específicos (LUTTER et al., 2010; BOSIA et al., 2012).

Não foram encontrados estudos na literatura sobre a relação do microRNA 2407 com o gene *CAPN1* ou com a maciez da carne. O miRNA 2407 produz um miRNA maduro chamado bta-mir-2407 de 22 nucleotídeos, o qual é expresso em tecido adiposo de bovinos e está envolvido na regulação do gene *FGF8* (ROMAO et al., 2013). O *FGF8* (fator de crescimento de fibroblasto 8 - Gene ID: 326284) está localizado no cromossomo 26 em bovinos e contém SNPs associados com características relacionadas com deposição de gordura subcutânea (MARQUES et al., 2009) e marmoreio (MOORE; MARQUES, 2008), além de estar envolvido no metabolismo de lipídeos (ROMAO et al., 2013). Segundo Marques et al. (2009) o *FGF8* pode influenciar na via do metabolismo lipídico afetando características de qualidade de carcaça em bovinos de corte. Dessa forma, o miRNA 2407 pode influenciar na maciez da carne.

O SNP *g.22180G>A* (Val530Ile), tem sido associado com a característica maciez da carne (PAGE et al., 2002; PAGE et al., 2004; ALLAIS et al., 2011; CALVO et al., 2014). Entretanto, no presente estudo, o mesmo apresentou apenas 0,007 kg² de variância genética aditiva e não está localizado no QTL identificado. Esta pequena variância apresentada pelo marcador pode ser devido à baixa frequência do alelo A nesta população (Tabela 4), não permitindo assim uma válida avaliação dos três genótipos.

O SNP *CAPN1_1* (*rs17872000*) está localizado no éxon 9 do gene *CAPN1* e produz uma substituição de aminoácido glicina por alanina (Gly316Ala). Esta substituição tem mostrado influência na maciez da carne de animais de diferentes raças (PAGE et al., 2004; QUAAS et al., 2006; MIGUEL et al., 2009; ALLAIS et al., 2001; BOLORMAA et al., 2011; LU et al., 2013). Este SNP está disponível no chip BovineHD, porém o mesmo não foi analisado neste estudo por apresentar baixa frequência (0,003) do menor alelo (C). Além disso, não foram encontrados animais com o genótipo CC nesta população. Alguns autores demonstraram que animais com o genótipo CC produzem carne mais macia (PAGE et al., 2004; QUAAS et al., 2006; MIGUEL et al., 2009; BONILLA et al., 2010; LU et al., 2013). A ausência de animais

com genótipo CC também foi reportada por Casas et al. (2005), White et al. (2005), Van Eenennaam et al. (2007) e Café et al. (2010) em diferentes populações de animais da raça Brahman (*Bos indicus*). Page et al. (2004), Kuehn et al. (2011), Allais et al. (2011) e Lu et al. (2013) relataram frequências alélicas para o alelo C acima de 0,05 para populações de raças taurinas. Ainda, em uma população de Brangus (Angus x *Bos indicus*), foram encontrados animais com o genótipo CC (MIQUEL et al., 2009). Isto demonstra que a baixa frequência para o alelo C do *CAPN1_1* é uma característica de populações de *Bos indicus*. Barendse et al. (2007) sugeriu que o *CAPN1_1* deve ser utilizado para animais de raças taurinas. Além disso, os autores afirmam que existem efeitos específicos deste marcador para algumas raças. Bovinos de raças taurinas e zebuínas não são apenas evolutivamente distintos pela domesticação em regiões temperadas e subtropicais (MACHUGH et al., 1997), mas também apresentam diferenças sistemáticas na maciez da carne (WHEELER et al., 2001; REVERTER et al., 2003).

O SNP que apresentou a maior variância genética aditiva ($0,027 \text{ kg}^2$), no gene *ASAP1*, foi o *rs110751858*, localizado na posição 11330635 pb no cromossomo 14, referente ao íntron 1 do *ASAP1* (Figure 4). Os SNPs encontrados pelo sequenciamento (*g.230281C>T*, *g.230306C>G*, *g.230313G>A* e *g.230344T>C*) apresentaram baixas ou nenhuma variância genética aditiva para a WBSF (0,0006, 0,0000, 0,0005, $0,0026 \text{ kg}^2$, respectivamente). A proporção de variância genética aditiva explicada pelos 156 SNPs presentes no gene *ASAP1* foi de 0,90%, ou seja, nove vezes mais que os SNPs presentes no *CAPN1* explicaram. Este resultado não era esperado, pois associações entre maciez e o gene *ASAP1* tem sido somente relatadas por Tizioto et al. (2012) e Tizioto et al. (2013). Assim, sugere-se que uma possível estratégia para melhorar a maciez em bovinos Nelore é aumentar a quantidade de células adipócitas no músculo, o que provavelmente impactaria no sabor e na palatabilidade da carne.

Cruz et al. (2012) relataram que escores para maciez foram associados com o número de células adipócitas e propôs que o aumento do número de adipócitos melhoraria a maciez. Como adipócitos expandem o tecido conectivo perimisial, os feixes musculares são forçados a se separarem e a estrutura do músculo se abre tornando a carne mais macia (WOOD, 1990). O músculo *Longissimus* possui como

característica quantidades predominantes de fibras do tipo IIB (MORALES, 2007). As fibras do tipo IIB possuem menor deposição de tecido adiposo e estão relacionadas com carne menos macia (OCKERMAN et al., 1984; CALKINS et al., 1981; MALTIN et al., 1998; KIRCHOFER et al., 2002; CHANG et al., 2003). Além disso, o mesmo SNP no *ASAP1* associado com maciez em bovinos da raça Nelore por Tizioto et al. (2012) também foi associado com gordura subcutânea por Veneroni et al. (2010) em animais da raça Canchim. Casas et al. (2009) encontraram associação significativa de um SNP no *ASAP1* com marmoreio em bovinos de corte.

Existem cinco possíveis QTL no gene *ASAP1* para maciez da carne nesta população, os quais podem ser visualizados na Figura 4 pelos haplótipos formados por 9 SNPs (azul). O primeiro QTL apresentou 0,034 kg² de variância genética aditiva está na região de 11.326.634 pb (*rs133304692*) a 11.347.848 pb (*rs109720216*) no cromossomo 14, a qual se inicia na posição 1346 pb *downstream* do *ASAP1*, abrange a região promotora até o íntron 1 do *ASAP1*. O segundo QTL apresentou 0,041 kg² de variância genética aditiva e tem início na posição 11436131 pb (*rs137205890*) até a posição 11.488.405 pb (*rs110467245*) do cromossomo 14, localizado no íntron 3 do *ASAP1*.

O terceiro QTL apresentou 0,035 kg² de variância genética aditiva e cobre da posição 11.533.941 (*rs137339423*) até a 11.550.527 bp (*rs109785511*) do cromossomo 14, no íntron 3 do gene *ASAP1*. A maior variância genética aditiva para WBSF (0,056 kg²) do gene *ASAP1* foi apresentada pela região que contém o quarto QTL localizado no íntron 5, cobrindo da posição 11.594.294 (*rs108976538*) até 11.609.451 pb (*rs109384259*). O último QTL encontrado neste gene apresentou 0,038 kg² de variância genética aditiva, cobre a região do íntron 16 (11.652.246 pb – *rs110680965*) até o íntron 25 (11.664.889 bp – *rs135662212*). O SNP no íntron 13 associado com a maciez da carne relatado por Tizioto et al. (2012) não está localizado nos QTL identificados no presente trabalho. Este é o primeiro estudo em que possíveis QTL foram detectados no gene *ASAP1* para maciez da carne.

Os quatro SNPs (*g.230281C>T*, *g.230306C>G*, *g.230313G>A* e *g.230344T>C*) encontrados neste estudo pelo sequenciamento no gene *ASAP1* estão localizados perto do terceiro QTL nas posições 11.558.261, 11.558.286, 11.558.293 e 11.558.324

pb, respectivamente. A porcentagem da variância genética aditiva apresentada pelos haplótipos com 9 SNPs, que incluem estes 4 SNPs, variou entre 0,003 kg² e 0,030 kg². Entretanto, estes resultados não são suficientes para evidenciar que estes SNPs podem estar contribuindo para a maciez da carne na raça Nelore. Para o *ASAP1* em bovinos, até o momento, foram descritas 3 isoformas, sendo que o éxon 4 está presente em todas as isoformas descritas.

Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs encontrados nos genes significativos para bovinos da raça Nelore.

Identificação do SNP	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
<i>g.21798A>G</i>	A = 0,70	G = 0,30	AA = 0,493	AG = 0,422	GG = 0,085
<i>g.22176C>T</i>	C = 0,81	T = 0,19	CC = 0,653	CT = 0,320	TT = 0,027
<i>g.22180G>A</i>	G = 0,96	A = 0,04	GG = 0,918	GA = 0,081	AA = 0,001
<i>g.22859G>C</i>	G = 0,93	C = 0,07	GG = 0,869	GC = 0,128	CC = 0,003
<i>g.22980C>A</i>	C = 0,81	A = 0,19	CC = 0,652	CA = 0,320	AA = 0,028
<i>g.23046T>C</i>	T = 0,81	C = 0,19	TT = 0,651	TC = 0,322	CC = 0,027
<i>g.24543G>A</i>	G = 0,96	A = 0,04	GG = 0,922	GA = 0,077	AA = 0,001
<i>g.24565A>G</i>	A = 0,29	G = 0,71	GG = 0,494	GA = 0,430	AA = 0,076
<i>g.24574T>G</i>	T = 0,43	G = 0,57	GG = 0,317	GT = 0,507	TT = 0,176
<i>g.24616G>A</i>	G = 0,89	A = 0,11	GG = 0,794	GA = 0,198	AA = 0,008
<i>g.24625T>C</i>	T = 0,86	C = 0,14	TT = 0,743	TC = 0,235	CC = 0,022
<i>g.24664C>T</i>	T = 0,07	C = 0,93	CC = 0,867	CT = 0,129	TT = 0,004
<i>g.24696C>T</i>	T = 0,11	C = 0,89	CC = 0,795	CT = 0,197	TT = 0,008
<i>g.24870C>T</i>	T = 0,19	C = 0,81	CC = 0,654	CT = 0,319	TT = 0,027
<i>g.25779A>G</i>	A = 0,96	G = 0,04	AA = 0,918	CG = 0,080	GG = 0,002
<i>g.25801G>A</i>	G = 0,96	A = 0,04	GG = 0,918	GA = 0,080	AA = 0,002
<i>g.26021C>T</i>	C = 0,86	T = 0,14	CC = 0,741	CT = 0,233	TT = 0,026
<i>g.230281C>T</i>	C = 0,46	T = 0,54	TT = 0,285	TC = 0,514	CC = 0,201
<i>g.230306C>G</i>	C = 0,51	G = 0,49	CC = 0,249	CG = 0,518	GG = 0,233
<i>g.230313G>A</i>	G = 0,64	A = 0,36	GG = 0,406	GA = 0,473	AA = 0,121
<i>g.230344T>C</i>	T = 0,98	C = 0,02	TT = 0,956	TC = 0,044	CC = 0,000

As análises de haplótipos identificaram regiões que podem influenciar na maciez da carne que poderiam não ser consideradas se apenas as análises de SNP individuais fossem realizadas (Figuras 3 e 4). Guo et al. (2009) analisando regiões genômicas, usando métodos de SNPs individuais, bloco de haplótipos e janelas sobrepostas, reportaram que a abordagem de janelas sobrepostas possibilita detectar maior associação para a característica de interesse. Além disso, o poder estatístico do

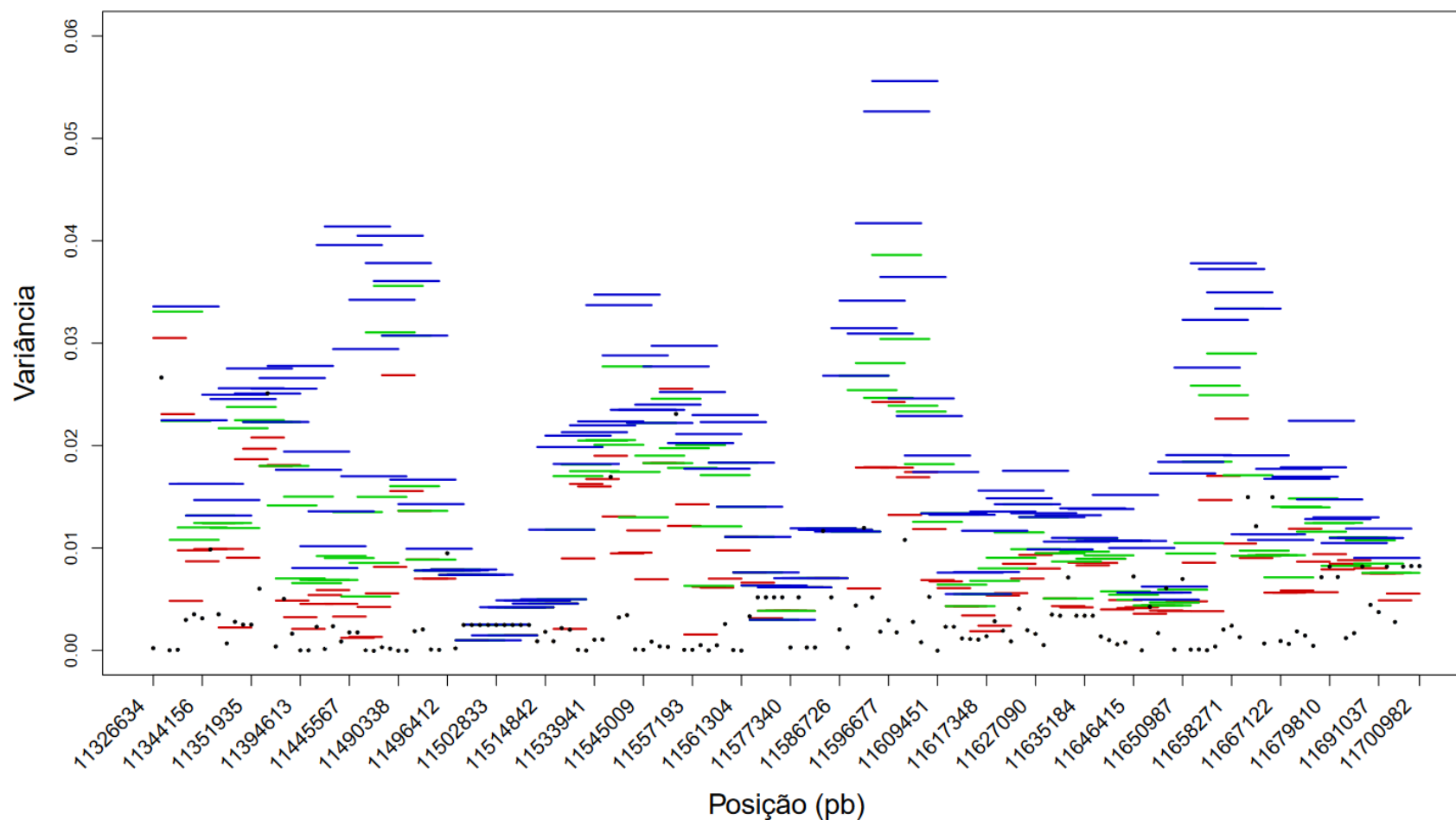


Figura 4. Variância genética aditiva dos efeitos dos marcadores SNP individuais (pontos) e haplótipos (linhas) baseados em janelas sobrepostas usando cinco (vermelho), sete (verde) e nove (azul) marcadores em todo o gene *ASAP1* em bovinos da raça Nelore.

procedimento de janelas sobrepostas foi maior do que o das análises de blocos de haplótipos e SNPs individuais. Os autores ainda reportaram que as análises de SNPs individuais e de blocos de haplótipos quase perderam o sinal de associação, como poderia ter acontecido no presente estudo usando somente as variâncias de cada SNP. Contudo, o uso da estratégia de janelas sobrepostas para as análises de associação com haplótipos aumenta o potencial de identificação de regiões genômicas associadas com a variação de características complexas.

Não houve evidências de que a mutação causal para a maciez da carne tenha sido identificada nos dois genes, porém estes QTL podem ter efeito na regulação e no processo de tradução destes genes ou ainda podem estar em desequilíbrio de ligação com as mutações causais.

2.4 Conclusões

Haplótipos construídos com base no desequilíbrio de ligação entre os marcadores permitiram identificar duas regiões significativas, sendo uma no gene *CAPN1* e outra no gene *ASAP1*. Utilizando a técnica de sequenciamento, foram identificados 21 SNPs, que não estão presentes no painel BovineHD, sendo que quatro SNPs, localizados no gene *CAPN1*, foram descritos pela primeira vez no presente estudo. Utilizando haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas, verificou-se que o aumento do número de SNPs no haplótipo permitiu capturar maior proporção da variância genética aditiva da característica maciez da carne. Seis possíveis QTL foram identificados explicando as maiores proporções de variância genética aditiva para maciez da carne, dos quais um está no gene *CAPN1* e cinco no gene *ASAP1*. Não houve evidências de que a mutação causal para a maciez da carne tenha sido identificada nos dois genes, porém estes QTL podem ter efeito na regulação e no processo de tradução destes genes ou ainda podem estar em desequilíbrio de ligação com as mutações causais.

2.5 Referências

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 5 motivos para valorizar a pecuária bovina do Brasil. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1378#.V099gL62crc>>. Acesso em: 01 jun 2016.
- AKEY, J.; JIN, L.; XIONG, M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? **European Journal of Human Genetics**, v. 9, p. 291–300, 2001.
- ALEXANDER, L. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W.; SNELLING, W. M.; RULE, D. C.; SCANGA, J. A. Quantitative trait loci with additive effects on palatability and fatty acid composition of meat in a Wagyu-Limousin F2 population. **Animal Genetics**, v. 38, p. 506–513, 2007.
- ALLAIS, S.; JOURNAUX, L.; LEVEZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; RAYNAUD, P.; HOCQUETTE, J. F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; RENAND, G. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1–11, 2011.
- BARDEL, C.; DANJEAN, V.; HUGOT, J. P.; DARLU, P.; GENIN, E. On the use of haplotype phylogeny to detect disease susceptibility loci. **BMC Genetics**, v. 6, 2005.
- BARENDSE, W.; REVERTER, A.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARRIS, W.; THOMAS, M. B. A validated whole genome association study of efficient food conversion. **Genetics**, v. 176, p. 1893–1905, 2007.
- BARENDSE, W. Haplotype analysis improved evidence for candidate genes for intramuscular fat percentage from a genome wide association study of cattle. **Plos One**, v. 6, e29601, 2011.
- BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, p. 263–265, 2005.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BECKMANN J. S.; SOLLER M. Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 573–576, 1987.
- BIANCHINI, W.; SILVEIRA, A. C.; JORGE, A. M.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; RODRIGUES, É.; HADLICH, J. C.; ANDRIGHETTO, C. Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos superprecoces. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2109–2117, 2007.

BOLEMAN, S. J.; BOLEMAN, S. L.; MILLER, R. K.; TAYLOR, J. F.; CROSS, H. R.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; MILLER, M. F.; WEST, R. L.; JOHNSON, D. D.; SAVELL, J. W. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1521–1524, 1997.

BOLORMAA, S.; PORTO NETO, L. R.; ZHANG, Y. D.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; GODDARD, M. E.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of meat and carcass traits in Australian cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, 2011.

BOLORMAA, S.; PRYCE, J. E.; KEMPER, K. E.; HAYES, B. J.; ZHANG, Y.; TIER, B.; BARENDSE, W.; REVERTER, A.; GODDARD, M. E. Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using genome-wide association studies. **Genetics Selection Evolution**, v. 45, p. 43, 2014.

BONILLA, C. A.; RUBIO, M. S.; SIFUENTES, A. M.; PARRA-BRACAMONTE, G. M.; ARELLANO, V. W.; MÉNDEZ, M. R.; BERRUECOS, J. M.; ORTIZ, R. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 2395–2405, 2010.

BOSIA, C.; OSELLA, M.; BAROUDI, M.; CORA, D.; CASELLE, M. Gene autoregulation via intronic microRNAs and its functions. **BMC Systems Biology**, v. 6, 2012.

BRAZ, C. U.; CAMARGO, G. M. F.; CARDOSO, D. F.; GIL, F. M. M.; FONSECA, P. D. S.; CYRILLO, J. N. S. G.; MERCADANTE, M. E. Z.; OLIVEIRA, H. N.; TONHATI, H. Polymorphisms in the GHRL gene and their associations with traits of economic interest in beef cattle. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, p. 18188-18197, 2015.

BROWNING, S. R.; BROWNING, B. L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 1084–1097, 2007.

CAFE, L. M.; MCINTYRE, B. L.; ROBINSON, D. L.; GEESINK, G. H.; BARENDSE, W.; GREENWOOD, P. L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 1. Growth, efficiency, temperament, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3047–3058, 2010.

CALKINS, C. R., T. R. DUTSON, G. C. SMITH, Z. L. CARPENTER, AND G. W. DAVIS. Relationship of fiber type composition to marbling and tenderness of bovine muscle. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 708-710, 1981.

CALVO, J. H.; IGUÁCEL, L. P.; KIRINUS, J. K.; SERRANO, M.; RIPOLL, G.; CASASÚS, I.; JOY, M.; PÉREZ-VELASCO, L.; SARTO, P.; ALBERTÍ, P.; BLANCO, M. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, v. 96, p. 775–782, 2014.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2976–2983, 2003.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE, C. C. JR. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13–19, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE JR. C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 520–525, 2006.

CASAS, E.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; BENNETT, G. L. Association of single nucleotide polymorphisms in candidate genes residing under quantitative trait loci in beef cattle. In: PLANT AND ANIMAL GENOME XVII CONFERENCE, 27., 2009, San Diego. **Abstracts...** San Diego: PAG, 2009.

CHANG, K. C.; DA COSTA, N.; BLACKLEYA, R.; SOUTHWOOD, O.; EVANS, G.; PLASTOW, G.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I. Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat Science**, v. 64, p. 93–103, 2003.

CLARK, A. G. The role of haplotypes in candidate gene studies. **Genetic Epidemiology**, v. 27, p. 321–333, 2004.

COULOMBE-HUNTINGTON, J.; LAM, K. C.; DIAS, C.; MAJEWSKI, J. Fine-scale variation and genetic determinants of alternative splicing across individuals. **Plos Genetics**, v. 5, 2009.

CROALL, D. E.; DEMARTINO, G. N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 813–847, 1991.

CRUZ, G. D.; STRATHE, A. B.; ROSSOW, H. A.; FADEL, J. G. Characterizing bovine adipocyte distribution and its relationship with carcass and meat characteristics using a finite mixture model. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2995–3002, 2012.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; DE OLIVEIRA, H. N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, p. 456–462, 2009.

DAVIS, G. P.; MOORE, S. S.; DRINKWATER, R. D.; SHORTHOSE, W. R.; LOXTON, I. D.; BARENDSE, W.; HETZEL, D. J. S. QTL for meat tenderness in the M. longissimus lumborum of cattle. **Animal Genetics**, v. 39, p. 40–45, 2008.

DE SOUZA, J. E.; RAMALHO, R. F.; GALANTE, P. A.; MEYER, D.; DE SOUZA, S. J. Alternative splicing and genetic diversity: silencers are more frequently modified by SNVs associated with alternative exon/intron borders. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 4942–4948, 2011.

DILGER, A. C.; RINCKER, P. J.; EGGERT, J. M.; MCKEITH, F. K.; KILLEFER, J. Pork tenderness and postmortem tenderization: Correlations with meat quality traits and the impact of sire line. **Journal of Muscle Foods**, v. 21, p. 529–544, 2010.

DUNNER, S.; SEVANE, N.; GARCÍA, D.; CORTÉS, O.; VALENTINI, A.; WILLIAMS, J. L.; MANGIN, B.; CAÑÓN, J.; LEVÉZIEL, H.; THE GEMQUAL CONSORTIUM. Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. **Livestock Science**, v. 154, p. 34–44, 2013.

ESPIGOLAN, R.; BALDI, F.; BOLIGON, A. A.; SOUZA, F. R. P.; FERNANDES JÚNIOR, G. A.; GORDO, D. G. M.; VENTURINI, G. C.; DE CAMARGO, G. M. F.; FEITOSA, F. L. B.; GARCIA, D. A.; TONHATI, H.; CHARDULO, L. A. L.; OLIVEIRA, H. N.; ALBUQUERQUE, L. G. Associations between single nucleotide polymorphisms and carcass traits in Nelore cattle using high-density panels. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, p. 11133-11144, 2015.

FABER, K.; GLATTING, K. H.; MUELLER, P. J.; RISCH, A.; HOTZ-WAGENBLATT, A. Genome-wide prediction of splice-modifying SNPs in human genes using a new analysis pipeline called AASsites. **BMC Bioinformatics**, v. 12, 2011.

FIEMS, L. O.; CAMPENEERE, S. D.; DE SMET, S.; VAN DE VOORDE, G.; VANACKER, J. M.; BOUCQUÉ, C. V. Relationship between fat depots in carcasses of beef bulls and effect on meat colour and tenderness. **Meat Science**, v. 56, p. 41–47, 2000.

FONSECA, L. F. S. **Expressão gênica diferencial em tecido muscular de bovinos nelore divergentes para qualidade de carne**. 2016. 107 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

GABRIEL, S. B.; SCHAFFNER, S. F.; NGUYEN, H.; MOORE, J. M.; ROY, J.; BLUMENSTIEL, B.; HIGGINS, J.; DEFELICE, M.; LOCHNER, A.; FAGGART, M.; LIUCORDERO, S. N.; ROTIMI, C.; ADEYEMO, A.; COOPER, R.; WARD, R.; LANDER, E. S.; DALY, M. J.; ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, p. 2225-2229, 2002.

GIUSTI, J.; CASTAN, E.; DAL PAI, M.; ARRIGONI, M. D. B.; BALDIN, S. R.; OLIVEIRA, H. N. Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. **Meat Science**, v. 94, p. 247–252, 2013.

GODDARD, M. E.; WRAY, N. R.; VERBYLA, K.; VISSCHER, P. M. Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data. **Statistical Science**, v. 24, p. 517–529, 2009.

GOODSON, K. J.; MORGAN, W. W.; REAGAN, J. O.; GWARTNEY, B. L.; COURINGTON, S. M.; WISE, J. W.; SAVELL, J. W. Beef customer satisfaction: Factors affecting consumer evaluations of clod steaks. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 401–408, 2002.

GUO, Y.; LI, J.; BONHAM, A. J.; WANG, Y.; DENG, H. Gains in power for exhaustive analyses of haplotypes using variable-sized sliding window strategy: a comparison of association-mapping strategies. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, p. 785–792, 2009.

GUTIÉRREZ-GIL, B.; WIENER, P.; NUTE, G. R.; BURTON, D.; GILL, J. L.; WOOD, J. D.; WILLIAMS, J. L. Detection of quantitative trait loci for meat quality traits in cattle. **Animal Genetics**, v. 39, p. 51–61, 2008.

HAUSMAN, G. J.; BASU, U.; WEI, S.; HAUSMAN, D. B.; DODSON, M. V. Preadipocyte and adipose tissue differentiation in meat animals: Influence of species and anatomical location. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 323–351, 2014.

HAUSMAN, G. J.; DODSON, M. V.; AJUWON, K.; AZAIN, M.; BARNES, K. M.; GUAN, L. L.; JIANG, Z.; POULOS, S. P.; SAINZ, R. D.; SMITH, S.; SPURLOCK, M.; NOVAKOFSKI, J.; FERNYHOUGH, M. E.; BERGEN, W. G. Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1218–1246, 2009.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 522–531, 2004.

HOCQUETTE, J. F.; BOTREAU, R.; PICARD, B.; JACQUET, A.; PETHICK, D. W.; SCOLLAN, N. D. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, v. 92, p. 197–209, 2012.

HUFFMAN, K. L.; MILLER, M. F.; HOOVER, L. C.; WU, C. K.; BRITTIN, H. C.; RAMSEY, C. B. Effect of beef tenderness on consumer satisfaction with steaks consumed in the home and restaurant. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 91–97, 1996.

KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M.; STONE, R. T. A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1364–1371, 1999.

KING, F. J.; HU, E.; HARRIS, D. F.; SARRAF, P.; SPIEGELMAN, B. M.; ROBERTS, T. M. DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 2330–2337, 1999.

KIRCHOFER, K. S.; CALKINS, C. R.; GWARTNEY, B. L. Fiber-type composition of muscles of the beef chuck and round. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 2872–2878, 2002.

KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S. C.; SCHOLLMAYER, J. E.; DUTSON, T. R.; BABIKER, A. S. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. **Journal of Food Science**, v.53, p.407, 1988.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, p. 93–104, 1994.

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

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D. **Beef tenderness: regulation and prediction**. Meat Animal Research Center, USDA-ARS, Clay Center, 2002. 11p.

KUEHN, L. A.; KEELE, J. W.; BENNETT, G. L.; MCDANELD, T. G.; SMITH, T. P. L.; SNELLING, W. M.; SONSTEGARD, T. S.; THALLMAN, R. M. Predicting breed composition using breed frequencies of 50,000 markers from the US meat animal research center 2,000 bull project. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1742–1750, 2011.

KURMANGALIYEV, Y. Z.; SUTORMIN, R. A.; NAUMENKO, S. A.; BAZYKIN, G. A.; GELFAND, M. S. Functional implications of splicing polymorphisms in the human genome. **Human Molecular Genetics**, v. 22, p. 3449-3459, 2013.

LEE, S. H.; KIM, S. C.; CHAI, H. H.; CHO, S. H.; KIM, H. C.; LIM, D.; CHOI, B. H.; DANG, C. G.; SHARMA, A.; GONDRO, C.; YANG, B. S.; HONG, S. K. Mutations in calpastatin and μ -calpain are associated with meat tenderness, flavor and juiciness in Hanwoo (Korean cattle): Molecular modeling of the effects of substitutions in the calpastatin/ μ -calpain complex. **Meat Science**, v. 96, p. 1501–1508, 2014.

LU, Z. X.; JIANG, P.; XING, Y. Genetic variation of pre-mRNA alternative splicing in human populations. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, v. 3, p. 581–592, 2012.

LU, D.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; VANDER VOORT, G.; WANG, Z.; MANDELL, I.; MOORE, S.; PLASTOW, G.; MILLER, S. P. Genome-wide association analyses for carcass quality in crossbred beef cattle. **BMC Genetics**, v. 14, 2013.

LUTTER, D.; MARR, C.; KRUMSIEK, J.; LANG, E.; THEIS, F. Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. **BMC Genomics**, v. 11, 2010.

MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G.; DE FREITAS, C.; PRATA, M. C.; FURLONG, J.; DA SILVA, M. V.; GUIMARÃES, S. E.; REGITANO, L. C.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, 2010.

MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071–1086, 1997.

MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAY, M. Determinants of meat quality: tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 337-347, 2003.

MARQUES, E.; NKRUMAH, J. D.; SHERMAN, E. L.; MOORE, S. S. Polymorphisms in positional candidate genes on BTA14 and BTA26 affect carcass quality in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 2475–2484, 2009.

MATHIAS, R. A.; GAO, P.; GOLDSTEIN, J. L.; WILSON, A. F.; PUGH, E. W.; FURBERT-HARRIS, P.; DUNSTON, G. M.; MALVEAUX, F. J.; TOGIAS, A.; BARNES, K. C.; BEATY, T. H.; HUANG, S.-K. A graphical assessment of p-values from sliding window haplotype tests of association to identify asthma susceptibility loci on chromosome 11q. **BMC Genetics**, v. 7, 2006.

MATUKUMALLI, L. K.; SCHROEDER, S.; DENISE, S. K.; SONSTEGARD, T.; LAWLEY, C. T.; GEORGES, M.; COPPIETERS, W.; GIETZEN, K.; MEDRANO, J. F.; RINCON, G.; LINCE, D.; EGGEN, A.; GLASER, L.; CAM, G.; VAN TASSEL, C. 2011. Analyzing LD blocks and CNV segments in cattle: Novel genomic features identified using the BovineHD BeadChip. Pub. No. 370-2011-002, Illumina Inc., San Diego, CA.

MAY, S. G.; DOLEZAL, H. G.; GILL, D. R.; RAY, F. K.; BUCHANAN, D. S. Effect of days fed, carcass grade traits, and subcutaneous fat removal on postmortem muscle characteristics and beef palatability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 444–453, 1992.

MIQUEL, M. C.; VILLARREAL, E.; MEZZADRA, C.; MELUCCI, L.; SORIA, L.; CORVA, P.; SCHOR, A. The association of CAPN1 316 marker genotypes with growth and meat quality traits of steers finished on pasture. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 491–496, 2009.

MOORE, S. S.; MARQUES, E. F. Associations of polymorphisms in the fibroblast growth factor 8 (FGF8) and its haplotypes with carcass quality, growth and feed efficiency in beef cattle, **Google Patents**, 2008.

MORALES, D. C. **Caracterização dos tipos de fibras musculares e das isoformas da MYHC e suas relações com a qualidade da carne de bovinos nelore superprecoces**. 2007. 81 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

O’CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, D. M.; GREEN, R. D.; SMITH, G. C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822–1830, 1997.

OCKERMAN, H. W.; JAWOREK, D.; VANSTAVERN, B.; PARRETT, N.; PIERSON, C. J. Castration and sire effects on carcass traits, meat palatability and muscle fibre characteristics in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 981-990, 1984.

OLER, A.; GŁOWINSKA, B.; MŁYNEK, K. Slaughter and carcass characteristics, chemical composition and physical properties of longissimus lumborum muscle of heifers as related to marbling class. **Archives Animal Breeding**, v. 58, p. 145–150, 2015.

OUALI, A.; TALMANT, A. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. **Meat Science**, v. 28, p. 331-348, 1990.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077–3085, 2002.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; QUAAS, R. L.; THALLMAN, R. M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHARAIE, M.; WHITE, S. N.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W.; DIKEMAN, M. E.; SMITH, T. P. Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3474–3481, 2004.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; FILIPOWICZ, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? **Trends in Cell Biology**, v. 17, p. 118-126, 2007.

PLACE, R. F.; LI, L.-C.; POOKOT, D.; NOONAN, E. J.; DAHIYA, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 1608-1613, 2008.

QUAAS, R. L.; LI, J.; THALLMAN, R. M.; VAN EENENNAAM A. L.; FERNANDO, R. L.; GILL C. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef traits. In *8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. **Annais eletrônicos...** Belo Horizonte, 2006, MG, Brasil. Disponível em: <http://www.nbcec.org/research/QuantitativeBeefTraitsArticle.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2016.

REARDON, W.; MULLEN, A. M.; SWEENEY, T.; HAMILL, R. M. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. **Meat Science**, v. 86, p. 270–275, 2010.

REVERTER, A.; JOHNSTON, D. J.; FERGUSON, D. M.; PERRY, D.; GODDARD, M. E.; BURROW, H. M.; ODDY, V. H.; THOMPSON, J. M.; BINDON, B. M. Genetic and phenotypic characterization of animal, carcass, and meat quality traits from temperate and tropically adapted beef breeds.4. Correlations among animal, carcass, and meat quality traits. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 149–158, 2003.

ROMAO, J. M.; JIN, W.; HE, M.; MCALLISTER, T.; GUAN, L. L. Elucidation of Molecular Mechanisms of Physiological Variations between Bovine Subcutaneous and Visceral Fat Depots under Different Nutritional Regimes. **Plos One**, v. 8, 2013.

SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Software. SAS Institute Inc: Version 9.3. Cary NC.

SCHEET, P.; STEPHENS, M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, p. 629–644, 2006.

SEVANE, N.; ARMSTRONG, E.; CORTÉS, O.; WIENER, P.; PONG WONG, R.; DUNNER, S.; THE GEMQUAL CONSORTIUM. Association of bovine meat quality traits with genes included in the PPARG and PPARGC1A networks. **Meat Science**, v. 94, p. 328–335, 2013.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.

TAIT JR., R. G.; ZHANG, S.; KNIGHT, T.; STROHBEHN, D. R.; BEITZ, D. C. (2008). **Genetic correlations of fatty acid concentrations with carcass traits in Angus-sired beef cattle**. *Animal Industry Report*, AS 654. Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol654/iss1/34/>. Acesso em 09 de fev. 2016.

TIZIOTO, P. C.; MEIRELLES, S. L.; VENERONI, G. B.; TULLIO, R. R.; ROSA, A. N.; ALENCAR, M. M.; MEDEIROS, S. R.; SIQUEIRA, F.; FEIJÓ, G. L.; SILVA, L. O.; TORRES JR, R. A.; REGITANO, L. C. A SNP in ASAP1 gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, v. 92, p. 855–857, 2012.

TIZIOTO, P. C.; DECKER, J. E.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; MUDADU, M. A.; SILVA, F. L.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. L.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T. S.; ROSA, A. N.; ALENCAR, M. M.; TULLIO, R. R.; MEDEIROS, S. R.; NASSU, R. T.; FEIJÓ, G. L.; SILVA, L. O.; TORRES, R. A.; SIQUEIRA, F.; HIGA, R. H.; REGITANO, L. C. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, v. 45, p. 1012–1020, 2013.

VAN DEN BERG, I.; FRITZ, S.; BOICHARD, D. QTL fine mapping with Bayes C(π): a simulation study. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 45, 2013.

VAN EENENNAAM, A. L.; LI, J.; THALLMAN, R. M.; QUAAS, R. L.; DIKEMAN, M. E.; GILL, C. A.; FRANKE, D. E.; THOMAS, M. G. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 891–900, 2007.

VASCONCELLOS, L. P.; TAMBASCO-TALHARI, D.; PEREIRA, A. P.; COUTINHO L. L.; REGITANO, L. C. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 133–137, 2003.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, p. 1931–1934, 2007.

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

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA, 1995.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M. Characterization of biological types of cattle (Cycle V): Carcass traits and longissimus palatability. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1209–1222, 2001.

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

WOOD, J. D. Consequences for meat quality of reducing carcass fatness. In J. D. Wood, & A. V. Fisher (Eds.), **Reducing fat in meat animals**. London: Elsevier Applied Science. 1990. p. 344–397.

WOOLFE, A.; MULLIKIN, J. C.; ELNITSKI, L. Genomic features defining exonic variants that modulate splicing. **Genome Biology**, v. 11, 2010.

WU, Y.; FAN, H.; WANG, Y.; ZHANG, L.; GAO, X.; CHEN, Y.; LI, J.; REN, H.; GAO, H. Genome-wide association studies using haplotypes and individual SNPs in Simmental cattle. **PLoS One**, v. 9, e109330, 2014.

YANG, J.; BENYAMIN, B.; MCEVOY, B. P.; GORDON, S.; HENDERS, A. K.; NYHOLT, D. R.; MADDEN, P. A.; HEATH, A. C.; MARTIN, N. G.; MONTGOMERY, G. W.; GODDARD, M. E.; VISSCHER, P. M. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. **Nature Genetics**, v. 42, p. 565–569, 2010.

ZHOU, G.; DUDGEON, C.; LI, M.; CAO, Y.; ZHANG, L.; JIN, H. Molecular cloning of the HGD gene and association of SNPs with meat quality traits in Chinese red cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 603–611, 2010.

ZHOU, X.; STEPHENS, M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. **Nature Genetics**, v. 44, p. 821–824, 2012.

CAPÍTULO 3 – Identificação de QTL para maciez da carne utilizando haplótipos construídos a partir de janelas sobrepostas na raça Nelore

RESUMO – Após o sequenciamento do genoma bovino, milhares de SNPs foram identificados ao longo do genoma. Com isso, painéis contendo uma quantidade significativa de marcadores SNPs foram disponibilizados, tornando possível conduzir estudos de associação genômica ampla (GWAS – Genome Wide Association Study). A utilização de haplótipos construídos a partir de janelas sobrepostas nos estudos de associação pode aumentar a capacidade de identificação de QTL, considerando que o loco causal sempre será considerado na análise. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi realizar uma análise de associação genômica ampla, utilizando haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas, para identificar QTL na característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore. Foram utilizados 3.161 machos inteiros da raça Nelore, dos quais 1.405 foram genotipados utilizando o painel Illumina Bovine HD, e 1.756 animais foram genotipados com painel 70 K (Neogen), os quais foram imputados para o painel HD. Os haplótipos foram construídos com base na metodologia de janelas sobrepostas, cobrindo todo o genoma, com tamanho de cinco, sete e nove SNPs. Os efeitos dos haplótipos e dos SNPs foram estimados pela metodologia GBLUP (*Genomic Best Linear Unbiased Predictor*) e as variâncias de cada haplótipo e SNP foram calculadas. Os genes *NOS1AP*, *SUCLG1*, *PHLDB2* e *LOC107132946* foram associados com a característica maciez da carne, por meio de análises de GWAS utilizando SNPs individuais e haplótipos. A análise utilizando SNPs identificou QTL diferentes das análises com haplótipos e, em alguns casos, SNPs apresentaram variâncias genéticas aditivas maiores do que as apresentadas pelos haplótipos. A análise que utilizou haplótipos construídos com cinco SNPs identificou uma maior quantidade de possíveis QTL do que as análises de haplótipos construídos com sete e nove SNPs. Sugere-se que análises utilizando haplótipos, baseados em janelas sobrepostas, sejam realizadas para complementar a análise de SNPs individuais em estudos de GWAS.

Palavras-chave: associação, bovinos de corte, marcador molecular, variância genética aditiva

CHAPTER 3 – Identification QTL for meat tenderness using haplotypes constructed based on overlapping sliding windows in Nelore cattle

ABSTRACT – After the bovine genome sequencing, thousands SNPs were identified across the genome. Thus, panels containing a significant amount of SNP markers were available, making possible to conduct genome-wide association study (GWAS). Moreover, the use of haplotypes constructed based on overlapping sliding windows, in association studies, can enhance the capacity of the identification of QTL, when the causal locus always is considered in the analysis. Thus, the aim of this study was to conduct a genome-wide association analysis using haplotypes constructed based on overlapping sliding windows to identify QTL for meat tenderness in Nelore cattle. In this analysis, 1,405 animals genotyped with the Illumina Bovine HD panel and 1,756 genotyped animals with 70 K panel (Neogen) were used and then, the genotypes of the 1,756 were imputed to the HD panel, in a total of 3,161 animals analyzed. Haplotypes were constructed based on the methodology of overlapping sliding windows, covering the whole genome, with five, seven and nine SNPs size. The haplotype effects and SNPs were estimated by the GBLUP method (Best Linear Unbiased Genomic Predictor) and the additive genetic variances were calculated for each haplotype and SNP. The *NOS1AP*, *SUCLG1*, *PHLDB2* and *LOC107132946* genes were associated with meat tenderness through GWAS analysis using individual SNPs and haplotypes. The analysis using SNPs identified different QTL than haplotype analyzes, and in some cases, SNPs showed additive genetic variances greater than those presented by the haplotypes. The analysis used haplotypes constructed with five SNPs identified more QTL than haplotype analysis constructed with seven and nine SNPs. Analyzes using haplotypes based on overlapping sliding windows, should be conducted as additional analyzes for individual SNPs in genome-wide association studies.

Keywords: association, beef cattle, molecular marker, additive genetic variance

2.6 Introdução

Com o sequenciamento do genoma bovino, milhares de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismos de nucleotídeo único) foram identificados ao longo do genoma (MEUWISSEN, 2007), possibilitando avanços científicos e tecnológicos importantes na área de melhoramento genético animal. Consequentemente, painéis contendo uma quantidade significativa de marcadores SNPs foram disponibilizados, tornando possível conduzir estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genome Wide Association Study*). Estes estudos exploram o desequilíbrio de ligação existente entre os marcadores e as variantes causais do fenótipo de interesse (BOLORMAA et al., 2013), identificando genes ou locos relacionados com a expressão de características quantitativas (QTL – *Quantitative Trait Loci*).

Uma vantagem dos estudos de GWAS é que estes se baseiam na busca, em todo o genoma, de possíveis genes que afetam o fenótipo e não apenas em regiões candidatas (BOLORMAA et al., 2013). Porém, Barendse (2011) relata que muitos estudos de GWAS utilizando marcadores SNPs não conseguem detectar associações entre genes candidatos e fenótipos relacionados. Além disso, segundo o autor, têm sido identificadas várias regiões genômicas, algumas das quais não contém genes, com pequeno efeito sobre as características. A utilização de haplótipos nos estudos de associação tem aumentado a capacidade de identificação de QTL (LORENZ et al., 2010; BARENDSE, 2011). Esse aumento se deve a maior quantidade de informações, relacionadas com a arquitetura genética da característica, que podem ser obtidas utilizando haplótipos nas análises estatísticas (MORRIS; KAPLAN, 2002; SHAID, 2004; LI; ZHOU; ELSTON, 2006).

Estudos com haplótipos apresentam ainda uma maior capacidade de identificar mutações quando comparados com SNP individuais devido à característica bi-alélica da maioria dos marcadores SNPs. Dessa forma, mesmo que mutações ocorram, é possível que as frequências alélicas dos SNPs permaneçam quase inalteradas (CURTIS; NORTH; SHAM, 2001). No entanto, segundo os autores, com a utilização de haplótipos, mutações em locos diferentes tendem a causar mudanças nas frequências dos haplótipos. Assim, como relatado por Cuyabano, Su e Lund (2014) um QTL tem

maior probabilidade de estar em desequilíbrio de ligação com um haplótipo multi-alélico aumentando, portanto, as chances de identificar o QTL.

O uso de haplótipos em análises de GWAS é pouco explorado, pois não existe consenso na literatura da quantidade de SNPs que devem formar um haplótipo, bem como qual a melhor metodologia para a construção e análise dos haplótipos (MARTIN et al., 2000). Até o momento, a construção de haplótipos tem sido realizada com base no desequilíbrio de ligação entre marcadores (GABRIEL et al., 2002). Entretanto, essa metodologia pode resultar em SNPs “órfãos” os quais não são incluídos nos haplótipos e, conseqüentemente, não são analisados estatisticamente (LI; SUNG; LIU, 2007). Dessa forma, o uso de haplótipos construídos com base no desequilíbrio de ligação, como unidades fundamentais dos testes de associação, pode não ser a melhor estratégia (LIN; CHAKRAVARTI; CUTLER, 2004).

Para contornar os problemas apresentados anteriormente, tem se proposto na literatura a utilização de haplótipos construídos a partir de janelas sobrepostas, cobrindo todo o genoma, independente do grau de ligação existente entre marcadores da região (CHENG et al., 2005; MATHIAS et al., 2006; LI; SUNG; LIU, 2007; GUO et al., 2009; SHA et al., 2009). Com essa metodologia se aumenta a identificação de possíveis QTL, considerando que o loco causal sempre será considerado na análise (GUO et al., 2009). Porém, uma limitação desta metodologia é a alta demanda computacional para a realização das análises estatísticas (CHENG et al., 2005; GUO et al., 2009; SHA et al., 2009). Assim, o presente estudo tem como objetivo realizar uma análise de associação genômica ampla, utilizando SNPs e haplótipos construídos com base em janelas sobrepostas, de diferentes tamanhos, para identificar QTL na característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

2.7 Material e Métodos

3.2.1 Animais

Foram utilizados 3.161 machos inteiros da raça Nelore, provenientes de mesma população base, que participam dos programas de melhoramento genético animal

DeltaGen e PAINT e nascidos entre os anos de 2008 e 2013. Os animais foram criados a pasto, terminados em confinamento, por um período aproximado de 90 dias, e abatidos em abatedouros comerciais com idade média de 691 ± 102 dias. Os grupos de contemporâneos (GC) foram definidos a partir de fazenda, ano de nascimento, grupo de manejo ao sobreano e mês e ano de abate. Os 3.161 animais estão distribuídos em 116 GCs com pelo menos 3 animais. Como os dados são provenientes de banco de dados comercial existente, esta pesquisa não envolveu aprovação do Comitê de Ética.

3.2.2 Dados fenotípicos e genotípicos

Os animais foram abatidos em abatedouros comerciais e as carcaças foram identificadas e resfriadas por 24 a 48 horas post-mortem. Após, as amostras com 2,54 cm de espessura foram colhidas do músculo *Longissimus thoracis* entre a 12^a e 13^a costelas da meia carcaça esquerda de cada animal. Posteriormente, as amostras foram embaladas a vácuo e mantidas em câmara fria por 150 horas a 1°C para o estabelecimento pleno do rigor mortis e em seguida foram congeladas a -20°C.

O ensaio de força de cisalhamento Warner-Bratzler (WBSF), uma medida mecânica da maciez, foi realizado após as amostras serem descongeladas em câmara fria a 1°C por aproximadamente 24 horas. Assim que as amostras atingiram a temperatura interna de 5°C, as mesmas foram assadas em forno até atingirem a temperatura interna de 71°C (WHEELER et al., 1995). As temperaturas foram medidas com a utilização de termopar posicionado no centro geométrico da amostra. A força de cisalhamento foi obtida utilizando o equipamento Warner-Bratzler shear force SALTER. Oito amostras em cilindros de 1,27 cm foram retiradas da região central de cada amostra e a média foi usada nas análises, para se obter uma melhor precisão.

Tecidos do músculo *Longissimus thoracis* foram usados para a extração de DNA utilizando o DNeasy Bloody & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A genotipagem foi realizada utilizando o chip de alta densidade Illumina BovineHD Infinium Assay® no Illumina HiScan System®. O software Illumina Genome Studio foi utilizado para analisar as imagens HiScan e transformá-las

em genótipos. Dos 3.161 animais genotipados, 1.405 foram genotipados utilizando o painel Illumina Bovine HD, que contém cerca de 777.000 marcadores SNPs posicionados ao longo do genoma. Os 1.756 animais remanescentes foram genotipados com painel de menor densidade (70 K Neogen), os quais foram imputados para o painel HD, utilizando o software FImpute (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014) com a inclusão do pedigree.

Foram mantidas apenas amostras com *call rate* maior que 90%. O controle de qualidade dos marcadores SNP considerou *call rate* acima de 95%, frequência alélica maior do que 5% e nível de significância do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg maior do que 10^{-5} . Além disso, os SNPs localizados em cromossomos não autossômicos foram excluídos. Após este controle de qualidade, 413.705 SNPs permaneceram para as análises (Tabela 1). Todos os SNPs foram mapeados de acordo com a sequência do genoma de referência bovino UMD 3.1. Os custos referentes à coleta de informações fenotípicas e genotípicas dos animais foram financiados pelo projeto temático “Ferramentas genômicas no melhoramento genético de características de importância econômica direta em bovinos da raça Nelore”, Processo FAPESP 2009/16118-5.

3.2.3 Construção dos haplótipos

Os haplótipos foram construídos baseados na metodologia de janelas sobrepostas, cobrindo todo o genoma, com tamanho variados de 5 (HP5), 7 (HP7) e 9 (HP9) SNPs (MATHIAS et al., 2006). Após a construção dos haplótipos foram determinadas as variações (alelos) de cada haplótipo, bem como o número de cópias que cada animal possui do alelo i no haplótipo j . Dessa forma, os alelos foram codificados como: 0 = não possui cópia do alelo, 1 = possui uma cópia do alelo (paterno ou materno), e 2 = possui duas cópias do alelo (paterno e materno). A descrição do número de alelos para cada análise se encontra apresentada na Tabela 1.

3.2.4 Análises de associação genômica ampla

Foram realizadas análises de associação para os SNPs e haplótipos separadamente com WBSF utilizando o software GEMMA (ZHOU; STEPHENS, 2012) ajustando para um modelo misto linear univariado (similar ao GBLUP) como segue:

$$y = W\alpha + X\beta + u + e$$

em que: y é um vetor do fenótipo WBSF; W é uma matriz de incidência dos efeitos fixos (GC e idade ao abate); α é um vetor correspondente aos efeitos fixos incluindo o intercepto; X é uma matriz de SNPs ou de haplótipos identificados para cada animal; β é o efeito de cada SNP ou haplótipo; u é um vetor de efeitos genéticos aditivos residuais aleatórios; e é um vetor de resíduos. Assume-se que $u \sim MVN(0, GV_g)$, em que G é a matriz de parentesco genômica e V_g é o componente de variância genética aditiva poligênica. Para o resíduo assume-se que $e \sim MVN(0, IV_e)$, em que V_e é o componente de variância residual e I é a matriz identidade. Os componentes de variância para os efeitos genéticos aditivos e residuais de cada haplótipo foram estimados da seguinte forma: $y = \sum_{i=1}^k X_i \beta_i + \epsilon$, sendo que $\beta_i \sim N(0, (\sigma_i^2/p_i))$, em que σ_i^2 é a variância do $i^{ésimo}$ haplótipo e p_i é a categoria do haplótipo i .

A matriz G foi construída utilizando informações de genótipos padronizados dos 413.355 SNPs usando o software GEMMA, como segue:

$$G = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p \frac{1}{v_{m_i}} (m_i - 1_n \bar{m}_i)(m_i - 1_n \bar{m}_i)^T$$

em que: M é a matriz de genótipos dos 413.355 SNPs, na qual m_i é a i^{th} coluna representando os genótipos em todos as n animais para o i^{th} SNP (0, 1 ou 2), $\bar{m}_i$ é a média da amostra do genótipo, v_{m_i} é a variância da amostra do i^{th} SNP e 1_n é um vetor de 1s para os n animais. A mesma matriz G , construída utilizando apenas os SNPs, foi utilizada nas análises de SNPs e haplótipos para que não houvesse superestimação da mesma, caso fosse construída utilizando informações dos haplótipos sobrepostos.

Tabela 1. Número de marcadores e alelos dos haplótipos por cromossomo (BTA) antes e depois do controle de qualidade (CQ).

BTA	Número total de SNP		Número total de alelos		
	Antes do CQ	Depois do CQ	HP5	HP7	HP9
1	46.495	25.624	386.393	764.795	1 314.773
2	40.056	22.145	334.475	659.339	1 130.264
3	35.579	20.925	313.719	618.133	1 059.409
4	34.980	18.886	291.474	582.726	1 010.135
5	34.842	18.470	276.244	543.564	931.356
6	35.519	21.349	311.406	603.600	1 020.428
7	33.168	18.893	281.895	556.213	956.533
8	33.529	20.207	301.644	593.307	1 016.769
9	31.060	18.395	276.400	547.631	943.531
10	30.449	15.907	249.492	501.127	871.278
11	32.015	17.525	264.454	523.142	900.053
12	26.127	13.771	212.708	424.412	734.294
13	23.594	13.547	209.287	422.515	741.351
14	24.780	15.667	232.610	457.370	782.998
15	24.755	13.532	211.785	425.447	739.615
16	24.178	13.484	207.463	415.573	722.828
17	22.266	13.091	200.803	399.503	684.317
18	19.386	11.010	167.257	332.182	572.575
19	18.908	9.640	155.041	316.655	557.862
20	21.490	11.624	178.618	355.459	613.451
21	21.175	11.909	182.879	365.677	634.862
22	18.034	9.934	155.225	311.611	540.416
23	15.215	8.682	143.529	297.711	530.528
24	18.620	10.522	162.539	323.898	559.345
25	12.931	7.202	112.218	225.239	392.554
26	15.242	8.946	137.970	274.177	472.790
27	13.152	7.383	119.543	244.555	431.592
28	13.038	7.360	120.886	248.299	437.534
29	14.710	7.725	126.360	258.977	456.321
Total	735.293	413.355	6 324.332	12 592.852	21 764.762

HP5, HP7 e HP9 = haplótipos construídos com tamanhos de cinco, sete e nove SNPs, respectivamente.

3.2.5 Variância genética aditiva

A variância genética aditiva explicada pelos SNPs foi calculada de forma diferente daquela utilizada para os haplótipos, pois SNPs são bi-alélicos e haplótipos

multi-alélicos. Dessa forma, a variância genética aditiva para os SNPs foi calculada da seguinte forma:

$$V_{a_i} = 2p_iq_ia_i^2$$

em que: V_{a_i} é a variância genética aditiva do $i^{ésimo}$ SNP; p e q são as frequências alélicas do i^{th} SNP e a é o efeito aditivo do i^{th} SNP.

Para calcular a variância genética aditiva dos haplótipos (σ_j^2) foi utilizado o método descrito por Lynch e Walsh (1998), como segue:

$$\sigma_j^2 = \sum_{i=1}^k (a_i - a_l)^2 p_i p_l$$

em que: σ_j^2 é a variância aditiva genética do $j^{ésimo}$ haplótipo, a_i é o efeito aditivo do $i^{ésimo}$ alelo no $j^{ésimo}$ haplótipo, p_i é a frequência do $i^{ésimo}$ alelo no $j^{ésimo}$ haplótipo, k é o número de alelos existentes no $j^{ésimo}$ haplótipo, l varia de $i+1$ até k .

O limiar a partir do qual as variâncias genéticas aditivas explicadas pelos SNP ou blocos de haplótipos foram consideradas importantes, foi estabelecido assumindo-se que a distribuição das variâncias segue uma distribuição gama. A partir dos parâmetros estimados nas próprias amostras (variâncias dos SNP ou dos haplótipos), os limiares foram estabelecidos pelo valor do quantil da distribuição gama referente ao nível de significância ($\alpha=0,05$) corrigido para testes múltiplos pelo método de Bonferroni.

3.3 Resultados e Discussão

O valor mínimo da característica WBSF foi de 1,56 kg e máximo de 11,20 kg, sendo que a média foi $6,21 \pm 1,38$ kg. Em média, estes animais não apresentam carnes macias, uma vez que, para animais *Bos indicus*, carnes com valores de força de

cisalhamento menores que 5 kg, após o cozimento, podem ser consideradas potencialmente macias (SHACKELFORD et al., 1991; KOOHMARAIE et al., 2003).

No presente trabalho foram realizados estudos de associação genômica ampla (GWAS) utilizando, como unidade fundamental dos testes, SNPs individuais e haplótipos construídos pelo método de janelas sobrepostas com tamanho de 5 (HP5), 7 (HP7) e 9 (HP9) SNPs. Foram identificados oito SNPs que explicam uma proporção significativa da variância genética aditiva da característica WBSF ($P \leq 0,05$), após a correção para múltiplos testes (Figura 1A). Estes SNPs estão localizados nos cromossomos 3, 4, 9, 10 e 11, sendo que três SNPs estão no cromossomo 3 (Tabela 1). Na GWAS com HP5, as regiões que apresentaram as maiores variâncias genéticas aditivas estão localizadas nos cromossomos 1, 3, 10, 11 e 25, enquanto que para HP7 e HP9 estão apenas nos cromossomos 3 e 10, respectivamente.

Nos cromossomos 3 e 10 os SNPs significativos apresentaram variância genética aditiva maior (0,072 e 0,063 kg², respectivamente) do que as variâncias dos haplótipos, na mesma região. Estes haplótipos apresentaram variâncias genéticas aditivas entre 0,041 a 0,068 kg² pelas análises com HP5 e HP7 no cromossomo 3 (Figura 1B e 1C). No cromossomo 10 apenas um haplótipo na análise com HP5 apresentou variância genética aditiva acima do limiar, de 0,037 kg², na mesma região do SNP associado com a característica em estudo. Além disso, as regiões dos SNPs significativos para a característica WBSF encontrados nos cromossomos 4 e 9, não apresentaram variâncias genéticas aditivas acima do limiar pelas análises de associação utilizando haplótipos. Ainda, a região significativa no cromossomo 11 para as análises de SNPs e HP5, não foram significativas nas análises utilizando HP7 e HP9 (Figura 1D).

Lorenz et al. (2010) também relataram que haplótipos apresentaram variância menor do que os SNPs individuais. Além disso, estudos reportaram que um maior número de variantes significativas foram detectadas pela análise de SNP individuais, em relação à análise baseada em haplótipos (SERÃO et al., 2013; WU et al., 2014). SNPs que apresentam mais variância genética aditiva do que seus haplótipos podem ser mutações causais ou estarem em forte desequilíbrio de ligação com as mutações causais. Segundo Lorenz et al. (2010) se o SNP analisado é uma mutação causal, o

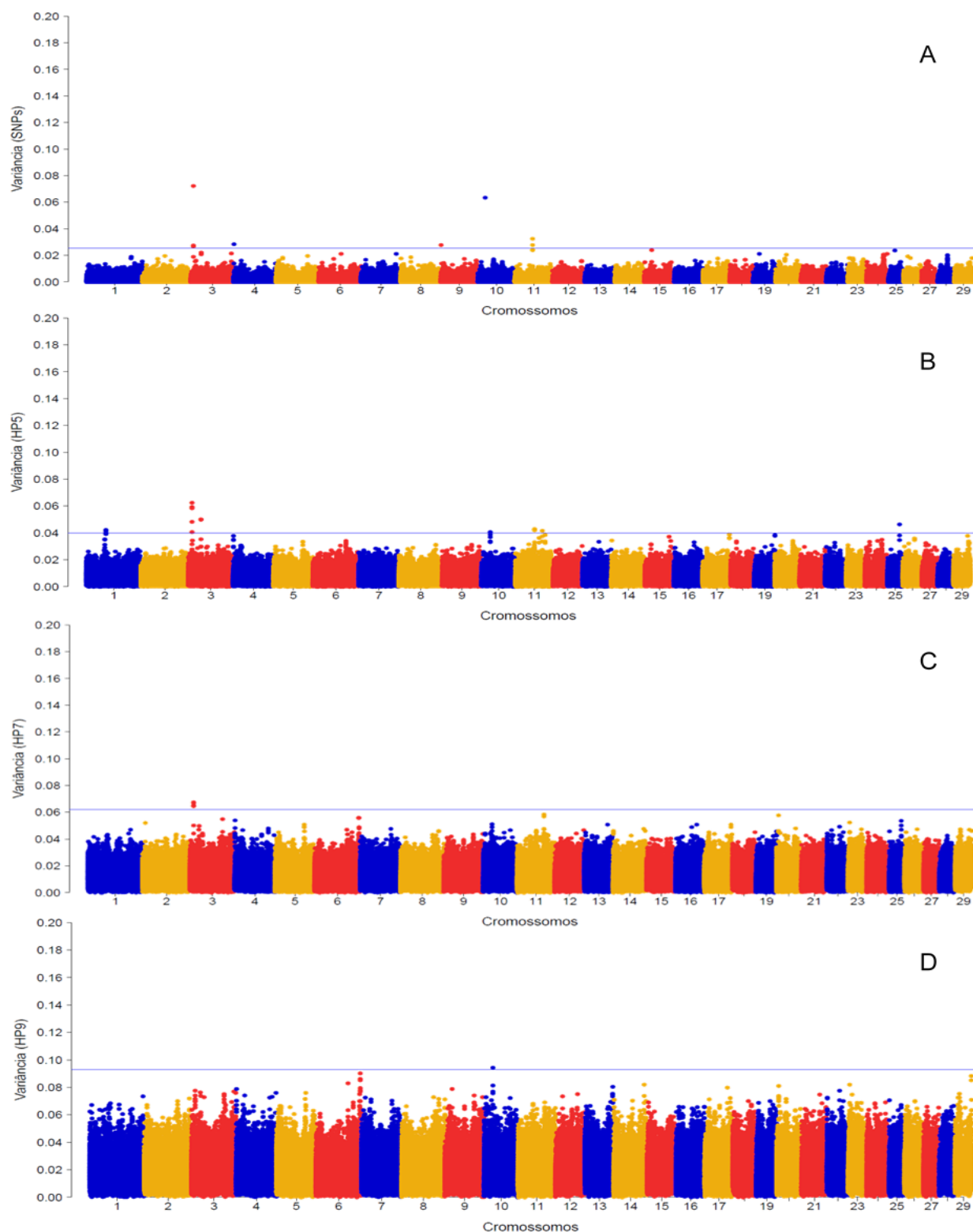


Figura 1. Manhattan plot dos resultados da associação genômica ampla utilizando SNPs individuais (A), haplótipos construídos com 5 SNPs (B), haplótipos construídos com 7 SNPs (C) e haplótipos construídos com 9 SNPs (D) para a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

poder da análise de SNP individual é superior à de haplótipos. Assim, quando o SNP causal está presente no haplótipo, a vantagem da análise de haplótipos, em geral, pode ser pequena em relação à análise de SNPs individuais, apesar do potencial aumento dos níveis de informações que podem ser obtidos pelos haplótipos (BADER, 2001; MORRIS; KAPLAN, 2002; SCHAID, 2004; DE BAKKER et al., 2005; LI; ZHOU; ELSTON, 2006). Porém, a maioria dos painéis de SNPs em bovinos não contém um grande número de mutações causais (BARENDSE, 2011).

Outra hipótese sobre o resultado do presente estudo está relacionada com o tamanho e o efeito do QTL analisado. Lorenz et al. (2010) relataram que a utilização de haplótipos não forneceu vantagens na identificação de QTL de tamanhos menores, em dados simulados. Segundo os autores, a análise de haplótipos apresentou vantagem apenas na identificação de QTL de maiores tamanhos. Além disso, os autores demonstraram que existe um aumento de poder de detecção, utilizando o método de janelas sobrepostas em relação à análise de SNP individuais, apenas quando o QTL apresenta grande efeito. Porém, os QTL da maioria das características quantitativas em bovinos apresentam pequenos efeitos (HAYES; GODDARD, 2001; HINDORFF et al., 2009; BICKEL; KOPP; NUZHDIN, 2011).

Com a utilização de HP5 foi possível identificar regiões que apresentam substanciais variâncias genéticas aditivas, para a característica WBSF, nos cromossomos 1, 3, 11 e 25 que não foram detectadas pela análise de SNPs individuais. Inclusive, existem regiões identificadas utilizando HP5 que são diferentes daquelas mais proeminentes pela análise de SNPs individuais nos mesmos cromossomos. Pela análise com HP9, apenas um haplótipo apresentou variância genética aditiva acima do limiar estabelecido, no cromossomo 10, sendo que essa região diverge da região significativa pelas análises de SNPs e HP5 neste cromossomo, estando a 650 kb de distância da mesma. Serão et al. (2013) e Wu et al. (2014) também detectaram associações utilizando haplótipos em regiões diferentes dos SNPs individuais significativos.

Guo et al. (2009) analisaram regiões genômicas utilizando métodos de SNPs individuais e janelas sobrepostas. Os autores reportaram que a abordagem de janelas

sobrepostas possibilita detectar maior associação para a característica de interesse. Além disso, os autores observaram que o poder estatístico do procedimento de janelas sobrepostas foi maior do que o poder das análises de SNPs individuais. Goddard (2009) e Lorenz et al. (2010) relataram que o poder de detectar o QTL é mais elevado quando o alelo do SNP tem frequência semelhante à do alelo do QTL. Segundo os mesmos autores, se um alelo do QTL possui frequência mais baixa do que a dos SNPs mais próximos, a combinação de SNPs pode gerar um haplótipo com alelo que apresenta frequência parecida com a do QTL, aumentando o poder de detecção do mesmo.

A distribuição de SNPs não é uniforme em todo o genoma, portanto haplótipos podem capturar associações que SNPs individuais não identificam (LORENZ et al., 2010; CUYABANO; SU; LUND, 2014). De acordo com os autores, isto acontece, pois haplótipos podem estar em LD mais forte com o QTL do que qualquer um de seus SNPs constituintes. Lorenz et al. (2010) relataram que, em dados simulados, os haplótipos estavam em maior DL com QTL do que os SNPs. Além disso, haplótipos podem capturar possíveis interações epistáticas entre SNPs de um mesmo loco (CLARK, 2004; BARDEL et al., 2005). Guo et al. (2009) reportaram que as análises de SNPs individuais quase perderam o sinal de associação, quando comparadas com as análises de haplótipos baseados em janelas sobrepostas. Segundo McClure et al. (2012) o fato de haplótipos explicarem consideravelmente mais variância do que SNPs individuais, indica que a mutação causal não está entre os polimorfismos testados, ou que exista mais de uma variante causal na mesma região. No entanto, na prática, não há garantia de que a análise de associação de haplótipos é sempre mais poderosa do que a análise usando SNPs individuais para uma determinada região genômica (CHENG et al., 2005). Contudo, recomenda-se realizar análises que utilizam haplótipos, baseados em janelas sobrepostas, para complementar a análise de SNPs individuais em estudos de GWAS, e dessa forma, a informação completa dos dados genotípicos será analisada (CHENG, 2005; LORENZ et al., 2010; SERÃO 2013).

No presente estudo foi identificado um maior número de QTL com a utilização de HP5, em relação às análises que utilizaram HP7 e HP9. Além disso, os haplótipos significativos nos cromossomos 1, 10, 11 e 25 para HP5, não foram significativos nas

análises utilizando HP7 e HP9. No entanto, um novo haplótipo significativo no cromossomo 10 foi identificado na análise com HP9, como mencionado anteriormente. Os haplótipos significativos encontrados no cromossomo 3 pra HP7 estão na mesma região dos haplótipos significativos pela análise de HP5, porém pela análise de HP9 essa região não demonstrou estar influenciando estatisticamente na característica WBSF.

De acordo com os resultados apresentados pelas análises de haplótipos, a utilização de haplótipos e a quantidade de SNPs utilizados na construção dos mesmos pode tanto diminuir a variância genética aditiva explicada pela região, como aumentá-la. Um fator que pode contribuir para essas diferenças observadas é o DL existente entre os marcadores. De acordo com Hayes et al. (2007) os benefícios de estudos de GWAS baseados em haplótipos dependem do grau de DL entre os SNPs que compõem o haplótipo. Barendse (2011) relataram que DL insuficiente entre os SNPs do haplótipo pode acarretar em falta de associação do mesmo com a característica. Além disso, a inclusão de SNPs com baixo DL no haplótipo pode resultar no aumento da quantidade de alelos do mesmo.

Segundo Hayes et al. (2007) o comprimento do haplótipo e a distância entre as variantes são importantes para que o haplótipo possa detectar o QTL. Durrant et al. (2004), utilizando haplótipos construídos por 4, 6, 8 e 10 marcadores, observaram que houve uma diminuição acentuada do poder dos testes com haplótipos formados por 8 e 10 SNPs, enquanto que haplótipos construídos com 6 SNPs apresentaram maior poder do teste estatístico. Isto ocorre porque haplótipos constituídos por muitos marcadores apresentam maior diversidade de alelos, são influenciados pelo DL entre os marcadores, bem como aumentam os graus de liberdade (ZAYKIN et al., 2002; DURRANT et al. 2004; CHENG et al., 2005). Portanto, de acordo com os autores, o ideal seria utilizar janelas de tamanhos menores para os testes de associação. Qin et al. (2002) e Niu et al. (2003) sugeriram que os haplótipos devem ser construídos utilizando 5 a 8 SNPs.

O tamanho ideal do haplótipo pode variar de acordo com o nível de DL da região estudada (DURRANT et al., 2004; LI et al., 2007; SHA et al., 2009). O uso de haplótipos de tamanho fixo pode ser um problema quando as análises de haplótipos

são realizadas ao longo de todo o genoma, onde os padrões de DL são variáveis (LI et al., 2007). Além disso, a densidade dos marcadores SNPs também deve ser considerada para definir o tamanho ótimo da janela (DURRANT et al., 2004). MATHIAS et al. (2006) afirmaram que janelas menores devem ser preconizadas, devido a distância entre os marcadores. Contudo, de acordo com os resultados apresentados, haplótipos construídos por 5 SNPs apresentaram maior capacidade de detecção de QTL para a característica WBSF, nesta população, comparando os diferentes tamanhos de haplótipos analisados.

Os QTL identificados no presente estudo, pelas análises de SNP individuais (Tabela 2), HP5, HP7 e HP9 (Tabela 3), estão localizados nas regiões de três genes (*NOS1AP*, *SUCLG1* e *PHLDB2*) com funções biológicas conhecidas e um gene do tipo *LOC* (*LOC107132946*). O gene *NOS1AP* foi associado com a característica maciez da carne pelas análises de SNP, HP5 e HP7, enquanto que o gene *SUCLG1* foi associado pelas análises de SNP e HP5. Os genes *PHLDB2* e o *LOC107132946* foram associados apenas pelas análises com HP5.

Tabela 2. Descrição dos SNPs significativamente associados ($P \leq 0,05$) com a característica maciez da carne.

Cromossomo	Posição	ID de Referência do SNP	Gene
3	7390035	rs134499129	NOS1AP
3	7384182	rs109294639	NOS1AP
3	7391544	rs41595711	NOS1AP
4	1008553	rs43490295	-
9	1116610	rs137367597	-
10	20486971	rs41623448	-
11	50406682	rs42732955	SUCLG1
11	50332078	rs136174419	-

O gene *PHLDB2* (domínio de homologia de plectrina, família B, membro 2 - Gene ID: 509784) está localizado no cromossomo 1 em bovinos da posição 56.904.953 até 57.147.279 pb, com um tamanho de 242.327 pb. O *PHLDB2* possui 26 éxons, 12 isoformas em bovinos e codifica uma proteína que está presente no citoesqueleto celular (NGAN et al., 2009). As proteínas do citoesqueleto são degradadas por enzimas proteolíticas no período *post-mortem* durante o processo de maturação da carne

(GOLL et al., 1983; KOOHMARAIE, 1996; ASLAN, 2010). Segundo Nowak (2011) o nível de degradação de proteínas do citoesqueleto tem uma grande influência na maciez da carne.

Tabela 3. Descrição dos haplótipos, construídos por 5 (HP5), 7 (HP7) e 9 (HP9) SNPs, com variâncias acima do limiar para a característica maciez da carne em uma análise de GWAS com haplótipos baseados em janelas sobrepostas.

BTA	Posição inicial – Posição final	Distância	Gene
HP5			
1	57047414-57058720	11307	PHLDB2
1	57049755-57062126	12372	PHLDB2
1	57052347-57075876	23530	PHLDB2
3	7379865-7390035	10171	NOS1AP
3	7381031-7390674	9644	NOS1AP
3	7384182-7391544	7363	NOS1AP
3	7387174-7392196	5023	NOS1AP
3	7390035-7393088	3054	NOS1AP
3	29577995-29591484	13490	-
3	29581953-29601595	19643	-
10	20464107-20496249	32143	-
11	50401750-50414602	12853	SUCLG1
11	50402735-50417494	14760	SUCLG1
11	50406682-50422295	15614	SUCLG1
11	76526558-76560323	33766	LOC107132946
25	31571976-31587644	15669	-
HP7			
3	7379865-7391544	11680	NOS1AP
3	7381031-7392196	11166	NOS1AP
3	7384182-7393088	8907	NOS1AP
3	7387174-7393605	6432	NOS1AP
3	7390035-7394777	4743	NOS1AP
HP9			
10	21142993-21163663	20670	-

O principal sistema proteolítico, que desempenha um papel importante no amaciamento da carne, é realizado por proteases endógenas chamadas calpaínas, em particular a μ -calpaína (SENTANDREU et al, 2006; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; OUALI et al., 2006; BERNARD et al, 2007; NEATH et al, 2007). A μ -calpaína é uma enzima produzida pelo gene *CAPN1*, o qual tem sido associado com a característica maciez da carne em bovinos (PAGE et al., 2002; CASAS et al., 2005; WHITE et al.,

2005; CASAS et al., 2006; CURI et al., 2009; TIZIOTO et al., 2013), também relatado no Capítulo 2 na presente tese. Além disso, a proteína domínio de homologia de plectrina família B membro 2 é da família de proteínas que compõem o citoesqueleto como espectrina, alfa-actinina e distrofina (MARCHLER-BAUER et al., 2015), sendo que a alfa-actinina e a espectrina são substratos da calpaína (LEBART; BENYAMIN, 2006) e a distrofina é degradada no processo proteolítico para o amaciamento da carne (KOOHMARAIE, 1996). Dessa forma, a calpaína está envolvida na regulação do citoesqueleto (CROALL; ERSFELD, 2007). Supõe-se que o sistema de calpaínas em um músculo esquelético, responsável pelo amaciamento da carne, pode ser afetado por diferentes enzimas que são ainda desconhecidas (NOWAK, 2011). Estudos sobre a relação do *PHLDB2* e a maciez da carne não foram encontrados na literatura. Sugere-se que a proteína codificada pelo gene *PHLDB2* possa ser degradada durante o amaciamento da carne e, portanto, influenciar na característica WBSF.

O gene *NOS1AP* (proteína adaptadora óxido nítrico-sintase 1 - Gene ID: 539686) possui 10 éxons distribuídos em 342.138 pb, está localizado nas posições 7.121.479 até 7.463.616 pb no cromossomo 3 em bovinos e não apresenta isoformas descritas até o momento. O *NOS1AP* codifica uma proteína adaptadora (CAPON) envolvida na regulação da atividade da enzima óxido nítrico-sintase neuronal 1 (nNOS ou NOS1) (JAFFREY et al., 1998). A NOS1 é uma enzima óxido nítrico-sintase (NOS) responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) e pode ser encontrada em neurônios, células epiteliais, sistema nervoso central e periférico, rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino e células b pancreáticas (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Chang et al. (2008) observaram que o aumento da expressão do *NOS1AP* resulta no aumento da síntese de NOS1 o qual leva a um aumento de NO, ou seja, estão envolvidos na mesma via metabólica. Cottrell et al. (2002) e Suster et al. (2005) ao injetar um inibidor da NOS (L-NAME), em cordeiros no pré-abate, observaram carne mais macia em amostras colhidas do músculo *Longissimus thoracis et lumborum*.

O NO está envolvido na fisiologia do estresse (ESCH et al., 2002), na regulação homeostática do cálcio na célula muscular (HARE, 2003) e na atividade da calpaína (MICHETTI et al., 1995), sendo que todos estes fatores podem estar relacionados e

influenciam na maciez da carne. A liberação de NO nos músculos esqueléticos no período pré-abate, devido ao estresse, afeta a atividade proteolítica no período *post-mortem*, levando a um decréscimo na maciez da carne bovina (WARNER et al., 2005; WARNER et al., 2007; GRUBER et al., 2010; PIGHIN et al., 2015). Warner et al. (2005) sugerem que o NO pode influenciar diretamente na maciez da carne no *post-mortem* por meio do controle de atividade de calpaína, ou indiretamente por afetar o cálcio, sendo o cálcio necessário para a ativação de calpaína. O sistema proteolítico dependente do cálcio tem sido considerado como um dos mais importantes fatores responsáveis pela variação na maciez da carne (KOOHMARAI, 1994). Além disso, o gene que codifica a calpaína (*CAPN1*) tem sido associado com a característica maciez da carne em bovinos, como mencionado anteriormente.

O gene *NOS1AP* foi associado com o ácido graxo ômega 3 em animais da raça Nelore da mesma população base do presente estudo (LEMOS et al., 2016). Perez et al. (2010) relataram que quantidades do ácido graxo ômega 3 na carne afetam características sensoriais como maciez, sabor, suculência e marmoreio. No entanto, o presente estudo é o primeiro que evidencia associação entre o *NOS1AP* e a maciez da carne.

O gene *SUCLG1* (subunidade alfa da succinato-CoA ligase - Gene ID: 509983) está localizado no cromossomo 11 em bovinos, onde se inicia na posição 50.400.445 e termina na posição 50.453.412 pb. Possui 9 exons e não apresenta isoformas até o momento. O *SUCLG1* codifica a subunidade alfa da enzima succinato Coenzima A sintase. Esta enzima catalisa a conversão de succinil CoA e ADP ou GDP em succinato e ATP ou GTP no ciclo do ácido cítrico, permitindo que as células utilizem oxigênio e gerem energia (NOGUEIRA et al., 2015). Segundo os autores, esta enzima é mais ativa em tecidos que necessitam de uma grande quantidade de energia, como os tecidos dos músculos. Mutações neste gene podem levar a deficiência ou escassez de succinato-CoA-ligase causando acidose láctica, hipotonia (tônus muscular fraco) e depleção do DNA mitocondrial (OSTERGAARD et al., 2007). Essa deficiência pode prejudicar o ciclo do ácido cítrico nos tecidos, levando a um acúmulo de NADH, que por sua vez, favorece a conversão do piruvato, oriundo da glicólise, em ácido láctico levando à acidose láctica (ROCHA, 2009). Contudo, o ácido láctico é importante para a queda do

pH no período de transformação do músculo em carne (JUDGE et al., 1989). Com o pH alto há maior propensão para o desenvolvimento de carnes do tipo DFD (escura, firme e seca), influenciando diretamente a cor, sabor, suculência e maciez da carne (SILVA et al., 2011).

A depleção do DNA mitocondrial (mtDNA) caracteriza-se por uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA em relação às do DNA nuclear. Essa depleção muitas vezes está associada a um déficit múltiplo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial, afetando a produção de energia em células e tecidos (NASSEH et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2015). Além disso, a nível histológico, a depleção do mtDNA pode provocar fibrose (NOGUEIRA et al., 2015), sendo que a fibrose é inversamente relacionada com a maciez da carne, ou seja, menos fibrose, carne mais macia (DEL COZ et al., 2005). Ainda, segundo Nogueira et al. (2015) a depleção pode causar hipotonia e hipoglicemia. A hipoglicemia é caracterizada pelo baixo nível de glicose no sangue o que pode levar a alta produção de ácido láctico, que por sua vez, pode influenciar na maciez da carne como descrito anteriormente (BACILA, 2003; CHIQUITELLI NETO; PARANHOS DA COSTA, 2004; SILVA et al., 2011). Este é o primeiro estudo que associa o gene *SUCLG1* com maciez da carne.

Foi identificado no presente estudo que o gene *LOC107132946* está associado com a característica WBSF. O *LOC107132946* (Gene ID: 107132946) é um gene do tipo RNA não codificante (ncRNA), localizado no cromossomo 11 em bovinos da posição 76.285.033 até a posição 76.632.844 (347.812 pb), possui 6 éxons e 3 isoformas. Alguns ncRNAs são estruturais e com funções bem estabelecidas, como os RNAs transportadores, RNAs ribossômicos, pequenos RNAs e pequenos RNAs nucleares (MATTICK et al., 2006). Tanto a tradução como o processo de *splicing* requerem RNAs estruturais fundamentais para o reconhecimento da sequência de substratos de RNA, bem como para o próprio processo catalítico (NILSEN, 2003; STEITZ; MOORE, 2003; BUTCHER; BROW, 2005; NOLLER, 2005). Estudos indicam que RNAs podem estar envolvidos nos processos de regulação gênica. (YANG et al., 2001; KWEK et al., 2002; O’GORMAN et al., 2005; YIK et al., 2005). Além disso, ncRNAs desempenham um papel importante na manutenção e segregação dos cromossomos, no controle da arquitetura da cromatina, na memória epigenética e

estão envolvidos em processos biológicos da célula central (BERNSTEIN; ALLIS, 2005; MORISON et al., 2005). Não foram encontradas funções específicas do *LOC107132946* ou sua associação com maciez da carne na literatura. Contudo, mais estudos devem ser realizados a fim de melhor elucidar as funções deste gene, bem como esclarecer como *LOC107132946* influencia na regulação de genes que possam afetar a maciez da carne.

No presente estudo, 50% dos SNPs e 23% dos haplótipos que explicam parte importante da variância genética aditiva da característica maciez da carne, estão localizados em regiões intergênicas (cromossomos 4, 9, 10 e 11 para SNPs e 3, 10 e 25 para haplótipos). Regiões intergênicas têm sido reportadas significativas nos estudos de GWAS para muitas características quantitativas (BOLORMAA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014; WU et al., 2014; LEMOS et al., 2016). Estas regiões são sequências de DNA localizadas entre os genes e que não codificam proteínas. No passado, as funções do DNA não codificante não eram compreendidas, sendo que o termo "DNA lixo" era utilizado para designar estas regiões. Após o sequenciamento e a anotação do genoma humano, houve revelações sobre a complexidade do DNA não codificante em mamíferos (SHABALINA et al., 2004). Em bactérias, aproximadamente 15% do genoma não codificam proteínas, sendo que este valor aumenta para 30%, 70% e 95% em leveduras, nematódeos e humanos, respectivamente. Assim, acredita-se que a importância funcional do DNA não codificante aumenta com a complexidade do organismo (SHABALINA et al., 2001). Ainda, segundo os autores, as regiões intergênicas em mamíferos são tão importantes quanto seus genes e podem ser a chave para a complexidade dos mesmos.

Algumas das sequências em regiões intergênicas de mamíferos representam sítios de ligação para fatores de transcrição conhecidos e proteínas reguladoras. Entretanto, muitas regiões ainda não apresentam função biológica conhecida (KONDRASHOV; SHABALINA, 2002). Heinen et al. (2009) identificaram um novo gene que surgiu de uma região que era considerada intergênica em camundongos (*Mus musculus*), sendo que esta região está presente em muitos mamíferos. Os autores afirmam que os sinais de *splicing* para os éxons, bem como o sinal de poliadenilação, existiam no DNA intergênico. Ainda, Toll-Riera et al. (2009) demonstraram que 15

candidatos a genes podem ter evoluído de regiões intergênicas em primatas, sugerindo que genes provenientes de DNA intergênico pode não ser um fenômeno raro. Dessa forma, estudos em regiões intergênicas são muito importantes para se obter um melhor entendimento de sua funcionalidade e atuação na regulação dos genes.

3.4 Conclusões

Os genes *NOS1AP*, *SUCLG1*, *PHLDB2* e *LOC107132946* foram associados com a característica maciez da carne em bovinos da raça Nelore, por meio de análises de associação genômica ampla utilizando SNPs individuais e haplótipos. A análise utilizando SNPs identificou QTL diferentes das análises com haplótipos e, em alguns casos, SNPs apresentaram variâncias genéticas aditivas maiores do que as apresentadas pelos haplótipos. A análise que utilizou haplótipos construídos com cinco SNPs identificou mais QTL do que as análises de haplótipos construídos com sete e nove SNPs. Sugere-se que análises utilizando haplótipos, baseados em janelas sobrepostas, sejam realizadas para complementar as análises de SNPs individuais em estudos de associação genômica ampla.

3.5 Referências

- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: J. M. Varela, 2003. p. 534.
- BADER, J. S. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests. **Pharmacogenomics**, v. 2, p. 11–24, 2001.
- BARDEL, C.; DANJEAN, V.; HUGOT, J. P.; DARLU, P.; GENIN, E. On the use of haplotype phylogeny to detect disease susceptibility loci. **BMC Genetics**, v. 6, 2005.
- BARENDSE, W. Haplotype Analysis Improved Evidence for Candidate Genes for Intramuscular Fat Percentage from a Genome Wide Association Study of Cattle. **Plos One**, v.6, e29601, 2011.
- BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 5229-5237, 2007.

BERNSTEIN, E.; ALLIS, C. D. RNA meets chromatin. **Genes & Development**, v. 19, p. 1635–1655, 2005.

BICKEL, R. D.; KOPP, A.; NUZHDIN, S. V. Composite effects of polymorphisms near multiple regulatory elements create a major-effect QTL. **Plos Genetics**, v. 7, 2011.

BOLORMAA, S.; PORTO NETO, L. R.; ZHANG, Y. D.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; GODDARD, M. E.; BARENDSE, W. A genome-wide association study of meat and carcass traits in Australian cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, 2011.

BOLORMAA, S.; PRYCE, J. E.; KEMPER, K. E.; HAYES, B. J.; ZHANG, Y.; TIER, B.; BARENDSE, W.; REVERTER, A.; GODDARD, M. E. Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle using genome-wide association studies. **Genetics Selection Evolution**, v. 45, 2013.

BUTCHER, S. E.; BROW, D. A. Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 447–449, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE, C. C. JR. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13–19, 2005.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D. G.; CHASE JR. C. C.; JOHNSON, D. D.; SMITH, T. P. L. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 520–525, 2006.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 419–423, 2002.

CHANG, K. C.; BARTH, A. S.; SASANO, T.; KIZANA, E.; KASHIWAKURA, Y.; ZHANG, Y.; FOSTER, B.; MARBÁN, E. CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, 2008.

CHENG, R.; MA, J. Z.; ELSTON, R. C.; LI, M. D. Fine mapping functional sites or regions from case-control data using haplotypes of multiple linked SNPs. **Annals of Human Genetics**, v. 9, p. 102–112, 2005.

CLARK, A. G. The role of haplotypes in candidate gene studies. **Genetic Epidemiology**, v. 27, p. 321–333, 2004.

COTTRELL, J. J.; DUNSHEA, F. R.; MCDONAGH, M. B.; WARNER, R. D. In vivo inhibition of nitric oxide synthase increases postslaughter lactate production and improves tenderness in ovine *Longissimus thoracis et lumborum*. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 129–137, 2002.

CROALL, D. E.; ERSFELD, K. The calpains: Modular designs and functional diversity. **Genome Biology**, v. 8, p. 218. 2007.

CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; MASON, M. C.; ARRIGONI, M. D. B.; SILVEIRA, A. C.; DE OLIVEIRA, H. N. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. **Animal Genetics**, v. 40, p. 456–462, 2009.

CURTIS, D.; NORTH, B. V.; SHAM, P. C. Use of an artificial neural network to detect association between a disease and multiple marker genotypes. **Annals of Human Genetics**, v. 65, p. 95–107, 2001.

CUYABANO, B. C. D.; SU, G.; LUND, M. S. Genomic prediction of genetic merit using LD-based haplotypes in the Nordic Holstein population. **BMC Genomics**, v. 15, 2014.

DE BAKKER, P. I. W.; YELENSKY, R.; PE'ER, I.; GABRIEL, S. B.; DALY, M. J.; et al. Efficiency and power in genetic association studies. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1217–1223, 2005.

DEL COZ, J. J.; BAYÓN, G. F.; DÍEZ, J.; LUACES, O.; BAHAMONDE, A.; SAÑUDO, C. Trait selection for assessing beef meat quality using non-linear SVM. In: SAUL, L. K.; WEISS, Y.; BOTTOU, L. (Eds.) **Advances in Neural Information Processing Systems 17 (NIPS 2004)**, Cambridge: MIT Press, 2005, p. 321-328.

DURRANT, C.; ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R.; HUNT, S.; DELOUKAS, P.; MORRIS, A. P. Linkage Disequilibrium Mapping via Cladistic Analysis of Single-Nucleotide Polymorphism Haplotypes. **The American Journal Human Genetics**, v. 75, p. 35–43, 2004.

ESCH, T.; STEFANO, G. B.; FRICCIONE, G. L.; BENSON, H. Stress related diseases – a potential role for nitric oxide. **Medical Science Monitor**, v. 8, p. 103–118, 2002.

GABRIEL, S. B.; SCHAFFNER, S. F.; NGUYEN, H.; MOORE, J. M.; ROY, J.; BLUMENSTIEL, B.; HIGGINS, J.; DEFELICE, M.; LOCHNER, A.; FAGGART, M.; LIUCORDERO, S. N.; ROTIMI, C.; ADEYEMO, A.; COOPER, R.; WARD, R.; LANDER, E. S.; DALY, M. J.; ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, p. 2225-2229, 2002.

GODDARD, M. E.; WRAY, N. R.; VERBYLA, K.; VISSCHER, P. M. Estimating effects and making predictions from genome-wide marker data. **Statistical Science**, v. 24, p. 517-529, 2009.

GOLL, D. E.; OTSUKA, Y.; NAGAINIS, P. A.; SHANNON, J. D.; SATHE, S. K.; MUGURUMA, M. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. **Journal of Food Biochemistry**, v. 7, p. 137-177, 1983.

GRUBER, S. L.; TATUM, J. D.; ENGLE, T. E.; CHAPMAN, P. L.; BELK, K. E.; SMITH, G. C. Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef LM tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 1148–1159, 2010.

GUO, Y.; LI, J.; BONHAM, A. J.; WANG, Y.; DENG, H. Gains in power for exhaustive analyses of haplotypes using variable-sized sliding window strategy: a comparison of association-mapping strategies. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, p. 785–792, 2009.

HARE, J. M. Nitric oxide and excitation–contraction coupling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 719–729, 2003.

HAYES, B.; GODDARD, M. E. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. **Genetics Selection Evolution**, v. 33, p. 209–229, 2001.

HAYES, B. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; MCPARTLAN, H.; MACLEOD, I.; SETHURAMAN, L.; GODDARD, M. E. Accuracy of marker-assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. **Genetics Research**, v. 89, p. 215–220, 2007.

HEINEN, T. J. A. J.; STAUBACH, F.; HAMING, D.; TAUTZ, D. Emergence of a New Gene from an Intergenic Region. **Current Biology**, v. 19, p. 1527–1531, 2009.

HINDORFF, L. A.; SETHUPATHY, P.; JUNKINS, H. A.; RAMOS, E. M.; MEHTA, J. P.; COLLINS, F. S.; MANOLIO, T. A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 106, p. 9362–9367, 2009.

JAFFREY, S. R.; SNOWMAN, A. M.; ELIASSON, M. J.; COHEN, N. A.; SNYDER, S. H. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. **Neuron**, v. 20, 115e24, 1998.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; HEDRICK, H. B.; MERKEL, R. A. **Principles of meat science**. Dubuque: Kendall/Hunt, 1989. p. 351.

KONDRASHOV, A. S.; SHABALINA, S. A. Classification of common conserved sequences in mammalian intergenic regions. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 669–674, 2002.

KOOHMARAIE M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 36, p. 93–104, 1994.

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

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. **Beef tenderness: regulation and prediction**. Meat Animal Research Center, USDA-ARS, Clay Center, 2002. 11p.

KOOHMARAIE, M., GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, v. 74, p. 34-43, 2006.

KWEK, K. Y.; MURPHY, S.; FURGER, A.; THOMAS, B.; O'GORMAN, W.; KIMURA, H.; PROUDFOOT, N. J.; AKOULITCHEV, A. U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation. **Nature Structural & Biology**, v. 9, p. 800–805, 2002.

LEBART, M. C.; BENYAMIN, Y. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. **The FEBS journal**, v. 273, p. 3415–3426, 2006.

LEMONS, M. V. A.; CHIAIA, H. L. J.; BERTON, M. P.; FEITOSA, F. L. B.; ABOUJAUD, C.; CAMARGO, G. M. F.; PEREIRA, A. S. C.; ALBUQUERQUE, L. G.; FERRINHO, A. M.; MUELLER, L. F.; MAZALLI, M. R.; FURLAN, J. J. M.; CARVALHEIRO, R.; GORDO, D. M.; TONUSSI, R.; ESPIGOLAN, R.; SILVA, R. M. O.; OLIVEIRA, H. N.; DUCKETT, S.; AGUILAR, I.; BALDI, F. Genome-wide association between single nucleotide polymorphisms with beef fatty acid profile in Nelore cattle using the single step procedure. **BMC Genomics**, v. 17, 2016.

LI, J.; ZHOU, Y. Y.; ELSTON, R. C. Haplotype-based quantitative trait mapping using a clustering algorithm. **BMC Bioinformatics**, v. 7, 2006.

LI, Y.; SUNG, W. K.; LIU, J. J. Association Mapping via Regularized Regression Analysis of Single Nucleotide Polymorphism Haplotypes in Variable-Sized Sliding Windows. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, p.705–715, 2007.

LIN, S.; CHAKRAVARTI, A.; CUTLER, D. V. Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 36, p. 1181–1188, 2004.

LIN, H.; SHABBIR, A.; MOLNAR, M.; LEE, T. Stem cell regulatory function mediated by expression of a novel mouse Oct4 pseudogene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 111–116, 2007.

LORENZ, A. J.; HAMBLIN, M. T.; JANNINK, J. L. Performance of Single Nucleotide Polymorphisms versus Haplotypes for Genome-Wide Association Analysis in Barley. **Plos One**, v. 5, e14079, 2010.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sunderland: Sinauer, 1998. p. 980.

MARCHLER-BAUER A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, DI.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 222-226, 2015.

MARTIN, E. R.; LAI, E. H.; GILBERT, J. R.; ROGALA, A. R.; AFSHARI, A. J.; RILEY, J.; FINCH, K. L.; STEVENS, J. F.; LIVAK, K. J.; SLOTTERBECK, B. D.; SLIFER, S. H.; WARREN, L. L.; CONNEALLY, P. M.; SCHMECHEL, D. E.; PURVIS, I.; PERICAK-VANCE, M. A.; ROSES, A. D.; VANCE, J. M. SNPing away at complex diseases: Analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 383–394, 2000.

MATHIAS, R. A.; GAO, P.; GOLDSTEIN, J. L.; WILSON, A. F.; PUGH, E. W.; FURBERT-HARRIS, P.; DUNSTON, G. M.; MALVEAUX, F. J.; TOGIAS, A.; BARNES, K. C.; BEATY, T. H.; HUANG, S. K. A graphical assessment of p-values from sliding window haplotype tests of association to identify asthma susceptibility loci on chromosome 11q. **BMC Genetics**, v. 7, 2006.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, v. 15, p. 17–29, 2006.

MCCLURE, M. C.; RAMEY, H. R.; ROLF, M. M.; MCKAY, S. D.; DECKER, J. E.; CHAPPLE, R. H.; KIM, J. W.; TAXIS, T. M.; WEABER, R. L.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F. Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner–Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. **Animal Genetics**, v. 43, p. 662–673, 2012.

MEUWISSEN, T. H. E. Genomic selection: marker assisted selection on genome-wide scale. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, p. 321–322, 2007.

MICHETTI, M.; SALAMINO, F.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. Reversible inactivation of calpain isoforms by nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, p. 1009–1114, 1995.

MORISON, I. M.; RAMSAY, J. P.; SPENCER, H. G. A census of mammalian imprinting. **Trends in Genetics**, v. 21, p. 457–465, 2005.

MORRIS, R. W.; KAPLAN, N. L. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. **Genetic Epidemiology**, v. 23, p. 221–233, 2002.

NASSEH, I. E.; TENGAN, C. H.; KIYOMOTO, B. H.; GABBAI, A. A. Doenças Mitocondriais. **Revista Neurociências**, v. 9, p. 60-69, 2001.

NEATH, K. E.; DEL BARRIO, A. N.; LAPITAN, R. M.; HERRERA, J. R. V.; CRUZ, L. C.; FUJIHARA, T.; MUROYA, S.; CHIKUNI, K.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Protease activity higher in postmortem water buffalo meat than Brahman beef. **Meat Science**, v. 77, p. 389–396, 2007.

NGAN, S.; STRONACH, E. A.; PHOTIOU, A.; WAXMAN, J.; ALI, S.; BULUWELA, L. Microarray coupled to quantitative RT–PCR analysis of androgen-regulated genes in human LNCaP prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 28, p. 2051–2063, 2009.

NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? **Bioessays**, v. 25, p. 1147–1149, 2003.

NIU, T.; QIN, Z. S.; XU, X.; LIU, J. S. Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v.70, p.157-169, 2002.

NOGUEIRA, C.; ALMEIDA, L. S.; VIDEIRA, A.; SANTORELLI, F. M.; VILARINHO, L. Doenças da comunicação intergenômica: abordagem clínica e laboratorial. **Arquivos de medicina**, v. 29, p. 11-19, 2015.

NOLLER, H. F. RNA structure: reading the ribosome. **Science**, v. 309, p. 1508–1514, 2005.

NOWAK, D. Enzymes in Tenderization of Meat – The System of Calpains and Other Systems – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, p. 231-237, 2011.

O'GORMAN, W.; THOMAS, B.; KWEK, K. Y.; FURGER, A.; AKOULITCHEV, A. Analysis of U1 snRNA interaction with cyclin H. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 36920–36925, 2005.

OLIVEIRA, P. S. N.; CESAR, A. S. M.; NASCIMENTO, M. L.; CHAVES, A. S.; TIZIOTO, P. C.; TULLIO, R. R.; LANNA, D. P. D.; ROSA, A. N.; SONSTEGARD, T. S.; MOURAO, G. B.; REECY, J. M.; GARRICK, D. J.; MUDADU, M. A.; COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. **BMC Genetics**, v. 15, 2014.

OSTERGAARD, E.; CHRISTENSEN, E.; KRISTENSEN, E.; MOGENSEN, B.; DUNO, M.; SHOUBRIDGE, E. A.; WIBRAND, F. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 383-387, 2007.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, v. 74, p. 44-58, 2006.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077–3085, 2002.

PEREZ, R.; CAÑÓN, J.; DUNNER, S. Genes associated with long-chain omega-3 fatty acids in bovine skeletal muscle. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, p. 479–487, 2010.

PIGHIN, D. G.; DAVIESB, C. D. E. P.; PAZOSA, A. A.; CECONIB, D. I., CUNZOLOC S. A. D.; MENDEZB, D.; BUFFARINI, M. B.; GRIGIONIA G. C. D. Biochemical profiles and physicochemical parameters of beef from cattle raised under contrasting feeding systems and pre-slaughter management. **Animal Production Science**, v. 55, p. 1310–1317, 2015.

QIN, Z. S.; NIU, T.; LIU, J. S. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v.71, p.1242-1247, 2002.

R CORE TEAM (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

ROCHA, P. N. Uso de bicarbonato de sódio na acidose metabólica do paciente gravemente enfermo. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 31, p. 297-306, 2009.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, v. 15, 2014.

SCHAID, D. J. Evaluating associations of haplotypes with traits. **Genetic Epidemiology**, v. 27, p. 348–364, 2004.

SENTANDREU, M.; COULIS, G.; OUALI, A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 400-421, 2002.

SERÃO, N. V. L.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; BEEVER, J. E.; FAULKNER, D. B.; SOUTHEY, B. R; RODRIGUEZ-ZAS, S. L. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genetics**, v. 14, 2013.

SHA, Q.; TANG, R.; ZHANG, S. Detecting susceptibility genes for rheumatoid arthritis based on a novel sliding-window approach. **BMC Proceedings**, v. 3, p. 7-14, 2009.

SHABALINA, S. A.; OGURTSOV, A. Y.; KONDRASHOV, V. A.; KONDRASHOV, A. S. Selective constraint in intergenic regions of human and mouse genomes. **Trends in Genetics**, v. 17, 2001.

SHABALINA, S. A.; SPIRIDONOV, N. A. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. **Genome Biology**, v. 5, 2004.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v.69, p.171-177, 1991.

SILVA, A. V.; DIAS, M. I. O.; MATA, V. J. V.; SANTOS, R. C.; SALGADO, R. L. Influência do manejo pré-abate na qualidade da carne de bovinos abatidos no município de Parauapebas – PA. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48., 2011, Belém. **Resumos...** Belém: SBB, 2011.

STEITZ, T. A.; MOORE, P. B. RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 411–418, 2003.

SUSTER, D.; DUNSHEA, F. R.; PONNAMPALAM, E. N.; COTTRELL, J. J.; WARNER, R. D. Timing of nitric oxide inhibition preslaughter influences lamb meat tenderness and proteolysis. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 51., 2005, Baltimore. **Abstracts...**, Baltimore: CMST, 2005.

TIZIOTO, P. C.; TAYLOR, J. F.; DECKER, J. E.; GROMBONI, C. F.; MUDADU, M. A.; SCHNABEL, R. D.; COUTINHO, L. L.; MOURÃO, G. B.; OLIVEIRA, P. S. N.; SOUZA, M. M.; REECY, J. M.; NASSU, R. T.; BRESSANI, F. A.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T. S.; ALENCAR, M. M.; TULLIO, R. R.; NOGUEIRA, A. R. A.; REGITANO, L. C. A. Detection of quantitative trait loci for mineral content of Nelore longissimus dorsi muscle. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, p. 15-24, 2015.

TOLL-RIERA, M.; BOSCH, N.; BELLORA, N.; CASTELO, R.; ARMENGOL, L.; ESTIVILL, X.; ALBÀ, M. M. Origin of primate orphan genes: A comparative genomics approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, p. 603–612, 2009.

WARNER, R. D.; DUNSHEA, F. R.; PONNAMPALAM, E. N.; COTTRELL, J. J. Effects of nitric oxide and oxidation in vivo and postmortem on meat tenderness. **Meat Science**, v. 71, p. 205–217, 2005.

WARNER, R. D.; FERGUSON, D. M.; COTTRELL, J. J.; KNEE, B. W. Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 47, p. 782–788, 2007.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA, 1995.

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

WU, Y.; FAN, H.; WANG, Y.; ZHANG, L.; GAO, X.; CHEN, Y.; LI, J.; REN, H.; GAO, H. Genome-wide association studies using haplotypes and individual SNPs in Simmental cattle. **Plos One**, v. 9, e109330, 2014.

YANG, Z.; ZHU, Q.; LUO, K.; ZHOU, Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. **Nature**, v. 414, p. 317–322, 2001.

YIK, J. H.; CHEN, R.; PEZDA, A. C.; ZHOU, Q. Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 16368–16376, 2005.

ZAYKIN, D. V.; WESTFALL, P. H.; YOUNG, S. S.; KARNOUB, M. A.; WAGNER, M. J.; EHM, M. G. Testing Association of Statistically Inferred Haplotypes with Discrete and Continuous Traits in Samples of Unrelated Individuals. **Human Heredity**, v. 53, p. 79–91, 2002.

ZOU, M.; BAITEI, E. Y.; ALZHRANI, A. S.; AL-MOHANNA, F.; FARID, N. R.; MEYER, B.; SHI, Y. Oncogenic activation of MAP kinase by BRAF pseudogene in thyroid tumors. **Neoplasia**, v. 11, p. 57–65, 2009.