

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ROULBER CARVALHO GOMES DA SILVA

**Estudo de caracterização e associação de marcadores  
moleculares relacionados à leptina para características  
de crescimento e precocidade de acabamento em  
bovinos da raça Nelore**

---

Pirassununga – SP

2008

ROULBER CARVALHO GOMES DA SILVA

**Estudo de caracterização e associação de marcadores moleculares relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz

---

Pirassununga – SP

2008

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por abençoar minha família, meu caminho e minhas escolhas.

Aos meus **Pais** e **meus irmãos**, pelo apoio, amor e confiança que depositaram em mim, em momentos complicados de minha vida.

À minha namorada **Patricia**, que mesmo estando longe, me apoiou em todos os momentos críticos do trabalho.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA**, pela realização do Mestrado.

Ao professor orientador, **Dr. José Bento Sterman Ferraz**, pela orientação e pelo enorme aprendizado pessoal e científico neste tempo de convivência.

Ao professor, **Dr. Júlio Balieiro**, pela amizade, paciência, disponibilidade e conhecimentos transmitidos durante todo o tempo de mestrado.

Ao professor, **Dr. Joanir P. Eler**, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do **Grupo de Melhoramento Animal - GMA** pela convivência, amizade e aprendizado em todos os aspectos

Aos amigos da **República Pantanera** pelo prazeroso convívio durante todo o tempo em que estive naquele lar.

Aos amigos **Diego Cucco** e **Luís Fernando** pela disponibilidade em ajudar sempre durante a realização desse trabalho.

À **MERIAL/IGENITY**, em especial, aos amigos **Dr. Henry Berger** e **Dr. Edson Bordin** pela amizade e confiança.

À **Agro-pecuária CFM** e à **Fazenda Mundo Novo** pela cessão dos dados dos animais possibilitando a realização desse trabalho.

À **Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto – FUNPEC - RP**, pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

## RESUMO

SILVA, R. C. G. **Estudo de caracterização e associação de marcadores moleculares relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Tendo em vista a possibilidade da utilização de marcadores moleculares relacionados à leptina em programas de melhoramento genético no Brasil, com o objetivo de auxiliar a seleção de bovinos da raça Nelore para características de importância econômica e, particularmente, para aquelas relacionadas ao crescimento e precocidade de acabamento, a proposta do presente trabalho foi caracterizar as frequências gênicas e genóticas de alguns polimorfismos e estudar seus efeitos nas características de precocidade de acabamento e crescimento em bovinos da raça Nelore. Foram avaliadas as associações dos marcadores moleculares com medidas de ultra-som de área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), espessura de gordura da picanha (EGP), peso à desmama (PD), peso ao sobreano (PS), ganho de peso da desmama ao sobreano (GPS) e circunferência escrotal ao sobreano (CE). Para a caracterização dos marcadores na população Nelore foram avaliadas as frequências genóticas e gênicas, testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigoses, diversidades alélicas e conteúdos de informação polimórfica. A análise dos efeitos dos diferentes genótipos dos marcadores moleculares foi realizada através da análise de variância, desvios de dominância, efeitos aditivos e efeitos médios de substituição. As frequências genóticas e gênicas demonstraram que alguns alelos de determinados marcadores moleculares se encontram em baixa frequência na população, porém apresentam os mesmos polimorfismos já relatados em bovinos de raças européias. Os marcadores A1457G, C963T e UASMS1 apresentaram associação significativa com características avaliadas por ultra-som. Os marcadores

E2JW, A59V e T945M apresentaram associação significativa com características de crescimento. O marcador E2FB apresentou associações significativas apenas pela análise de efeito médio de substituição. Estes achados reforçam o potencial de utilização dos marcadores moleculares ligados a leptina na melhoria das características economicamente importantes em animais da raça Nelore. A seleção assistida por marcadores de animais portadores de alelos favoráveis pode impactar positivamente na cadeia produtiva de bovinos de corte em todos os seus segmentos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, gado de corte, polimorfismos, snp, ultra-som

## ABSTRACT

SILVA, R. C. G. **Characterization and association of molecular markers linked to leptin with growth and finishing traits in Nelore cattle**. 2008. 71f. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Considering the possibility of utilization of molecular markers linked to leptin in animal breeding programs from Brazil and aiming to aid in the selection of Nelore cattle to economic traits and particularly, for those related to growth and finishing traits, the purpose of this research was to characterize the allelic and genotypic frequencies and associate with growth and finishing in Nelore cattle. There were evaluated the associations of the molecular markers on the ultrasound *Longissimus* muscle area (AOL), ultrasound backfat thickness (EGS), ultrasound fat thickness in *Biceps femoris* muscle, weaning weight (PD), yearling weight (PS), weight gain from weaning to yearling (GPS) and yearling scrotal circumference (CE). The characterization of the molecular markers in Nelore cattle was evaluated through of the allelic and genotypic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium tests, heterozygosity, allelic diversity and polymorphism information content. The different genotype effects of the molecular markers were evaluated through ANOVA, dominance deviation, additive and substitution effect. The allelic and genotype frequencies shown some alleles of the molecular markers were low frequencies in Nelore cattle. However there were identified the same polymorphisms described in taurine cattle. Markers A1457G, C963T and UASMS1 demonstrated significant association with ultrasound measurement traits. The E2JW, A59V and T945M markers showed significant association with growth traits. The E2FB marker showed significant effects when it was evaluated for substitution effect. These findings emphasize the potential utilization of molecular markers linked to leptin in the improvement of economic traits in the Nelore cattle. The improvement this traits through marker assisted selection of carrier animals of desirable alleles might positively aid the whole beef cattle productive chain.

Keywords: *Bos indicus*, beef cattle, polymorphisms, snp, ultrasound

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
2.1. <i>A importância da raça Nelore para a pecuária de corte brasileira.....</i>	10
2.2. <i>Seleção Assistida por Marcadores (SAM) .....</i>	11
2.3. <i>Leptina.....</i>	13
2.4. <i>Polimorfismos relacionados à produção de leptina.....</i>	15
2.5. <i>Polimorfismos presentes nos exons do gene da leptina.....</i>	16
2.6. <i>Polimorfismos presentes na região promotora do gene da leptina.....</i>	18
2.7. <i>Polimorfismos presentes no gene do receptor da leptina.....</i>	21
2.8. <i>Ultra-sonografia na avaliação de precocidade de acabamento e crescimento em bovinos de corte .....</i>	21
2.9. <i>Características de crescimento ou desenvolvimento ponderal.....</i>	23
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
5.1. <i>Animais avaliados .....</i>	27
5.2. <i>Coleta de amostras de sangue, extração de DNA, caracterização e determinação dos genótipos para os marcadores SNP avaliados .....</i>	27
5.3. <i>Metodologia de coleta dos dados de ultra-som .....</i>	30
5.4. <i>Avaliação das características de desenvolvimento ponderal .....</i>	32
5.5. <i>Metodologia de análise dos resultados.....</i>	32
5.6. <i>Determinação das frequências genotípicas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população.....</i>	33
5.7. <i>Efeito dos marcadores SNP sobre as características precocidade e de desenvolvimento ponderal .....</i>	34
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
6.1. <i>Frequências genotípicas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população.....</i>	37
6.2. <i>Análise de efeitos dos marcadores nas características avaliadas.....</i>	40
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
7.1. <i>Frequências genotípicas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população.....</i>	51
7.2. <i>Análise de efeitos dos marcadores nas características avaliadas.....</i>	55
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte nacional, devido a sua adequação às exigências de qualidade determinadas pelo mercado, vem se tornando cada vez mais especializada em virtude da abertura de novos mercados consumidores que exigem carne de alta qualidade. Existe também a preocupação com o aumento da produtividade dos animais, visando sempre diminuir os custos produtivos da produção da carne.

Embora o Brasil tenha o maior rebanho comercial bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2007), e seja o maior exportador mundial de carne, com cerca de 1.384.708 toneladas de carne de janeiro a outubro de 2007 (ABIEC, 2007), esses aspectos colocam toda a cadeia produtiva da carne, e principalmente o pecuarista, frente a grandes desafios. Para que possamos nos tornar mais competitivos internacionalmente, torna-se indispensável o desenvolvimento e a implantação de tecnologias que possam auxiliar a melhoria da qualidade e eficiência da produção de carne.

Na busca do aumento de produtividade é indispensável o uso do melhoramento genético na pecuária de corte. Em programas de melhoramento genético de qualquer espécie é fundamental realizar a seleção genética de indivíduos geneticamente superiores para as características de interesse.

O objetivo da seleção pelo mérito genético é escolher indivíduos geneticamente superiores que se tornarão os pais da próxima geração, promovendo assim alterações nas frequências dos genes de interesse e o conseqüente melhoramento genético de determinada característica de importância econômica numa dada população. Atualmente, existem diversas ferramentas para auxiliar a seleção genética em um rebanho, entre elas, a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Essa ferramenta tem por objetivo aumentar a acurácia da seleção, principalmente para as características com expressão fenotípica tardia, como por exemplo, a deposição de gordura subcutânea.

A leptina é um hormônio produzido principalmente pelos adipócitos. Esse hormônio está relacionado à regulação do apetite, balanço energético, crescimento, deposição de gordura, características de carcaça e características reprodutivas em

diversas espécies, inclusive em bovinos (CLARKE; HENRY, 1999; HOUSEKNECHT et al, 1998; MÁCAJOVÁ; LAMOSOVA; ZEMAN, 2004; NEGRÃO; LICINIO, 2000). Alguns estudos indicaram a associação de marcadores moleculares à produção da leptina e às características de precocidade de acabamento e crescimento, principalmente, em bovinos de raças européias, mantidos em sistema de confinamento (BUCHANAN et al, 2002; FITZSIMMONS et al, 1998; NKRUMAH et al, 2004; NKRUMAH et al, 2005).

Considerando que a grande maioria do rebanho brasileiro é constituído de bovinos de genótipo *Bos indicus*, principalmente, da raça Nelore e seus cruzamentos e a possibilidade de utilização de alguns marcadores relacionados ao gene da leptina em programas de melhoramento genético no Brasil, visando auxiliar a seleção de bovinos da raça Nelore para características de importância econômica, a proposta do presente trabalho foi caracterizar as frequências gênicas e genotípicas dos polimorfismos e relacionar suas frequências às características de precocidade de acabamento e crescimento em bovinos da raça Nelore, sob a hipótese de que marcadores moleculares ligados à leptina e descritos na espécie *Bos taurus* possam influenciar características de crescimento e precocidade de acabamento em bovinos da raça Nelore.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A importância da raça Nelore para a pecuária de corte brasileira

Os primeiros exemplares de gado zebuino foram trazidos ao Brasil pelos portugueses nos séculos XVIII e XIX de colônias portuguesas da África e da Índia, uma vez que o Brasil era domínio político, comercial e administrativo dos mesmos (PARDI et al, 1996). Entre 1890 e 1921, mais de 5.000 animais zebuínos originários da Índia foram trazidos para o Brasil, sendo que o primeiro registro de animais da raça Nelore no Brasil foi em 1868 (SANTIAGO, 1985). Porém, segundo Santos (1995), a importação de animais provindos da Índia realizada em 1930, por Manoel Oliveira Prata e Francisco Ravísio Lemos, foi de importância fundamental para o desenvolvimento da raça no Brasil. Nessa importação chegaram animais que tiveram influência decisiva na formação dos plantéis nacionais, como Marajá – um dos pilares da raça Nelore e Rajá – que juntamente com Sheik consolidaram o padrão racial do Nelore no Brasil. De acordo com Lima (1989), a raça Nelore multiplicou-se com uma velocidade espantosa a partir dos núcleos que se formaram logo após as importações da Índia. Essa expansão foi uma consequência dos elevados índices de desempenhos reprodutivos e produtivos alcançados pelo Nelore em climas tropicais (OLIVEIRA; MAGNABOSCO; BORGES, 2002).

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2007). Segundo Josahkian (2000), estima-se que desse total, mais de 80% seja constituído de bovinos com genótipo *Bos indicus*, sendo que grande parte dessa contribuição é da raça Nelore.

A raça Nelore representa a grande maioria dos bovinos nacionais, isso se deve à fertilidade, rusticidade e adaptação (SANTIAGO, 1987). O Nelore é a raça com maior número de criadores no Brasil e corresponde por quase 80% do rebanho zebuino brasileiro (OLIVEIRA; MAGNABOSCO; BORGES, 2002; SANTOS, 1998).

O Nelore é a raça de maior importância no sistema de produção de carne brasileiro devido às suas características como adaptabilidade ao ambiente tropical, resistência aos parasitas, rusticidade e produtividade.

## **2.2. Seleção Assistida por Marcadores (SAM)**

A seleção de indivíduos manifestando fenótipos específicos, que os diferem de seus contemporâneos, tem despertado o interesse do homem desde a domesticação das primeiras espécies. A essência dos programas de seleção animal tem sido a mesma até os dias atuais, consistindo basicamente em observar populações, identificar indivíduos de melhor expressão de características importantes, acasalamento de indivíduos excelentes e aumento das freqüências dos alelos favoráveis desses genes no rebanho (OLIVEIRA; HENKES, 2002).

No moderno sistema produtivo de carne bovina, identifica-se a importância cada vez maior de produção eficiente, caracterizada pelo encurtamento do ciclo de produção e por produtos de melhor qualidade, obtidos pelo uso de animais geneticamente superiores em condições ambientais adequadas (BONILHA, 2003).

Segundo Euclides Filho (1999), a seleção é a escolha dos melhores indivíduos avaliados, os quais serão os responsáveis pela produção da próxima geração. É o processo decisório que indica quais animais de uma geração se tornarão pais da próxima geração.

De acordo com van der Werf (2006), embora a idéia de seleção genética seja aumentar a proporção de genes favoráveis na população, esses genes não são de fato observados nos métodos clássicos de avaliação genética. A seleção clássica quantitativa é baseada no efeito final de todos os genes em conjunto, sendo observado o desempenho fenotípico da característica.

Atualmente, existe a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) que visa aumentar a acurácia na avaliação e seleção dos animais (PAZ et al, 2004). A seleção assistida por marcadores está relacionada com a idéia da possível existência de genes com efeitos significativos sobre a expressão de determinadas características e que podem ser explorados no processo de seleção (VAN DER

WERF, 2006). Bourdon (2000) define SAM como a seleção de animais portadores de alelos específicos usando marcadores moleculares que estão ligados ou próximos suficientemente de QTL (*Quantitative Trait Loci*) de interesse que possam ser usados para identificar alelos desejáveis nesse loci. Segundo Meuwissen (2003), os maiores benefícios da SAM são esperados em características em que a mensuração do fenótipo a ser selecionado ocorre após a época de seleção, tais como características reprodutivas, produção de leite ou características de difícil avaliação, como precocidade de acabamento de carcaça. Se a acurácia de predição dos efeitos dos marcadores é alta, os mesmos podem ser usados para seleção de animais antes da avaliação do fenótipo (MEUWISSEN; GODDARD, 1996).

Davis, D'Occhio e Hetzel (1997) afirmam que a seleção assistida por marcadores moleculares fornece informações para a rápida introgressão do gene e/ou a seleção da característica levando a rápida geração de progênes de pais com alto padrão genético, sendo eficiente para seleção entre e dentro de famílias, linhagens ou raças. Segundo Dekkers e Hospital (2002), estes avanços têm permitido a oportunidade de melhorar os programas de melhoramento genético nos rebanhos pela seleção direta de genes ou regiões ligadas às características de interesse econômico através da SAM e da introgressão desses genes na população.

A integração de novas tecnologias genéticas e reprodutivas (ex: SAM e produção de embriões) resultariam em significativos aumentos nas taxas de ganhos genéticos quando utilizada com os métodos de avaliações genéticas convencionais (DAVIS; D'OCCHIO; HETZEL, 1997).

O uso dos marcadores moleculares pode evitar os empecilhos da avaliação de características de composição de carcaça e qualidade da carne, fornecendo informações suficientemente corretas para analisar as características de interesse nos animais (MORRIS et al, 2001). Jeon et al. (2006) descreveram a utilização da SAM em bovinos de corte e suínos do Instituto Nacional de Pesquisa Agropecuária (National Livestock Research Institute) e Universidade Nacional de Gyeonsang na Coreia do Sul. Eles relataram que apesar da implantação da SAM ter sido recente e as conclusões do uso ainda serem limitadas, há expectativa de que a SAM contribua maximizando o melhoramento de características economicamente importantes, principalmente aquelas com baixa herdabilidade e que apresentam dificuldade de

mensuração. Gao et al. (2007) ressaltam que a SAM deve ser uma importante ferramenta para auxiliar as técnicas de seleção tradicionais e não para substituí-las.

### 2.3. Leptina

A leptina é um hormônio protéico de 162 aminoácidos com peso de 16 kDa produzida pelo gene *ob* ou gene da leptina. Essa proteína é produzida principalmente pelos adipócitos e a sua descoberta se deu devido às investigações realizadas em camundongos, utilizados como modelos experimentais de obesidade, numa série de estudos de parabiose entre duas linhagens de camundongos, porém a leptina ainda era chamada de fator *ob* (COLEMAN, 1973; COLEMAN; HUMMEL, 1973). Zhang et al. (1994) relataram a clonagem do gene deste fator, denominado de proteína *ob* ou leptina (do grego *leptos* que significa magro).

Diversos estudos demonstraram homologia entre o gene da leptina de diversas espécies. O gene da leptina humana tem 84% de homologia quando comparado com o gene da leptina de camundongos e 83% de homologia quando comparado ao de ratos. Bovinos e suínos apresentam 85% de homologia quando comparados ao gene da leptina humano (DOYON et al, 2001; ZHANG et al, 1994).

O tecido adiposo branco é responsável pela maior parte da leptina produzida pelo organismo, sendo sintetizada em menores quantidades no tecido adiposo marrom e em outros tecidos do trato gastrointestinal, músculo esquelético, placenta, epitélio das glândulas mamárias, hipófise e cérebro (BADO et al, 1998; CASABIELL et al, 1997; CINTI et al, 1997; MASUZAKI; OGAWA; SAGAWA, 1997; MORASH; JOHNSTONE; LEOPOLD, 2000; WANG et al, 1998). Conforme os adipócitos aumentam em massa, as concentrações periféricas de leptina aumentam (AHIMA; FLIER, 2000; CONSIDINE; CARO, 1997). Segundo Auwerx e Staels (1998), o aumento ocorre porque o tamanho do adipócito influencia a síntese e a secreção da leptina, pois os maiores adipócitos contêm mais RNA mensageiro (mRNA).

A síntese da leptina é estimulada pela obesidade, insulina, glicocorticóides, processos infecciosos, endotoxinas, citocinas, glicose e estrogénos (GRUNFELD et al, 1996; SALADIN et al, 1995; SLIEKER et al, 1996; WANG et al, 1998). A síntese

de leptina é inibida pelo jejum, frio, atividades físicas, testosterona, hormônios da tireóide e agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (CASTRACANE et al, 1998; ESCOBAR-MORREALE et al, 1997; LI ;MATHENY; SCARPACE, 1997).

Diversos estudos têm relacionado a leptina à regulação do apetite, balanço energético, crescimento, deposição de gordura, características de carcaça e características reprodutivas em diversas espécies, inclusive em bovinos (CLARKE; HENRY, 1999; HOUSEKNECHT et al, 1998; MÁCAJOVÁ; LAMOSOVA; ZEMAN, 2004; NEGRÃO; LICINIO, 2000).

Dentro do sistema nervoso central, o hipotálamo é o principal sitio de ação da leptina, controlando a ingestão de alimentos e o metabolismo energético. Diversos estudos avaliaram a presença de mRNA do receptor da leptina no hipotálamo de diversas espécies incluindo humanos (CONSIDINE et al, 1996), roedores (BROGAN; GROVE; SMITH, 2000; GARCIA et al, 2000; SEEBER; SMITH; WADDELL, 2002) e ruminantes (DYER et al, 1997; REN et al, 2002). Os efeitos da leptina foram observados em ruminantes pela administração de leptina recombinante humana em ovelhas durante três dias, causando diminuição de aproximadamente 1/3 da ingestão normal de matéria seca (HENRY et al, 1999). No entanto, esses efeitos não foram observados em ovelhas subnutridas (HENRY et al, 2001).

Diversos estudos encontraram correlação positiva entre concentração plasmática de leptina e porcentagem de tecido adiposo corporal, crescimento e lactação em ruminantes (BLACHE et al, 2000; CHILLIARD; BOCQUIER, 2000). Correlações positivas significantes entre concentrações plasmáticas de leptina e porcentagem de tecido adiposo corporal foram descritas em ovinos (DELVAUD et al, 2000) e no crescimento de bovinos (EHRHARDT et al, 2000). Yamada, Kawakami e Nakanishi (2003) estudaram a correlação entre as concentrações plasmáticas de leptina e deposição de gordura em cruzamentos F1 de Japanese Black Cattle X Holandês criados em confinamento. Eles verificaram que existem correlações significantes entre níveis plasmáticos de leptina e características de carcaça relacionadas com deposição de gordura (marmoreio, porcentagem de gordura). Um estudo de Geary et. al. (2003), com cruzamentos de gado europeu criado em confinamento, concluiu que altas concentrações de leptina sérica é um forte indicativo de grande deposição de gordura em gado confinado, no entanto, existe

uma correlação negativa entre área do músculo *Longissimus dorsi* (Área de olho de lombo) e concentrações plasmáticas de leptina.

#### **2.4. Polimorfismos relacionados à produção de leptina**

Segundo Clarke e Henry (1999), desde que a leptina foi identificada como um fator de controle do apetite e relacionada aos níveis de gordura corporal, um volume substancial de trabalhos tem apresentado seu papel na regulação do apetite e em várias outras funções, e inclusive aumentaram as pesquisas na área de biologia molecular na tentativa de descobrir polimorfismos relacionados à produção da leptina.

O gene da leptina está localizado no cromossomo 4 de bovinos sendo constituído por três exons separados por dois introns, dos quais o exon 1 não é transcrito para sintetizar a leptina (STONE; KAPPES, 1996; ZHANG et al, 1994). Para entender a regulação da transcrição do gene da leptina, a região promotora foi isolada e caracterizada. Importantes domínios de ligação de fatores de transcrição foram identificados na região promotora de humanos, roedores e ruminantes (GONG et al, 1996; HWANG et al, 1996; MILLER et al, 1996; TANIGUCHI et al, 2002).

Em 1995, o gene receptor da leptina foi isolado por Tartaglia et al. (1995). Esse gene está localizado no cromossomo 3 de bovinos e é constituído por 20 exons. O receptor da leptina é uma glicoproteína com uma simples região de ligação transmembrana, sendo que existem seis diferentes isoformas desse receptor, diferenciando-se apenas pelo domínio intracelular desse receptor e nos tecidos em que estão presentes (TARTAGLIA, 1997).

Diversos marcadores microssatélites polimórficos presentes no gene da leptina foram descritos por Pomp et al. (1997), Stone e Kappes (1996) e Wilkins e Davey (1997). Fitzsimmons et al. (1998) relatou que variantes do marcador microssatélite *BM1500* foram associadas à deposição de gordura em gado de corte em animais das raças Angus, Charolês, Simental e Hereford. Diversos marcadores SNP (*single nucleotide polymorphism*) foram relatados nos introns e exons do gene

da leptina e do gene do receptor da leptina (KONFORTOV; LICENCE; MILLER, 1999; LIEN et al, 1997).

## **2.5. Polimorfismos presentes nos exons do gene da leptina**

A investigação de marcadores SNP nos exons é importante, pois nessa região se encontram os marcadores funcionais, isto é, marcadores cujas variações no DNA causam diferenças funcionais no gene, alterando a seqüência do mRNA e posteriormente, a seqüência de aminoácidos da proteína que o gene codifica (VAN DER WERF, 2006).

Buchanan et al. (2002) descreveram um marcador SNP localizado na posição 73 no Exon 2 do gene da leptina, identificado atualmente como E2FB. O polimorfismo localizado no Exon 2 envolve a substituição C → T que está associada à alteração do aminoácido arginina para uma cisteína na leptina. As freqüências gênicas encontradas foram de 0,54 para o alelo C e 0,46 para o alelo T. O alelo T estava associado a maiores níveis de gordura corporal que o alelo C. Nesse estudo não houve análise das proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Outra observação interessante foi a maior expressão de mRNA da leptina em animais homozigotos para o alelo T. Esse achado sugere que essa mutação está associada à maior expressão de leptina.

Nkrumah et al. (2004) estudaram a associação do marcador E2FB com características de importância econômica em animais de raças de origem européia. Eles observaram diferenças significativas entre os seus genótipos para ganho diário de gordura subcutânea ( $P=0,02$ ), grau de cobertura de gordura na carcaça ( $P=0,005$ ), grau de rendimento de carcaça ( $P=0,01$ ) e rendimento de carne comerciais ( $P=0,007$ ). O alelo T se mostrou favorável para as características de deposição de gordura e desfavorável para características de rendimento de carcaça quando comparado ao alelo C. Relataram ainda, freqüências gênicas de 0,48 para o alelo C e de 0,52 para o alelo T e a distribuição das freqüências genotípicas estavam de acordo com as proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Schenkel et al (2005) estudaram o marcador E2FB em animais de diversas raças de origem européia e relataram frequências gênicas de 0,58 para o alelo C e de 0,42 para o alelo T. As frequências estavam de acordo com as proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos do marcador E2FB apresentaram diferenças significativas para rendimento de carne ( $P=0,038$ ), rendimento de gordura ( $P=0,013$ ) e escore de gordura ( $P=0,016$ ).

Com o objetivo de estudar as variações genéticas presentes no gene da leptina de *Bos indicus*, *Bos taurus* e seus cruzamentos, Choudhary et al. (2005), relataram a ausência da mutação  $C \rightarrow T$ , isto é, a mudança da base citosina para uma timina, em animais de origem *Bos indicus* sugerindo que essa mutação tenha ocorrido após a separação evolutiva de taurinos e zebuínos. No entanto, Meirelles et al. (1999), estudando o mtDNA (DNA mitocondrial) de animais da raça Nelore, Gir e Brahman, confirmaram que uma grande proporção do zebu nacional é decorrente do cruzamento absorvente de fêmeas de origem européia, portadoras de mtDNA europeu com machos de origem indiana, portadores de mtDNA do *Bos indicus*.

Em estudo recente, com vacas multíparas das raças Aberdeen Angus e Charolesa foi investigado o marcador E2FB e verificou-se que as frequências gênicas foram de 0,58 para o alelo T e de 0,42 para o alelo C nas vacas da raça Aberdeen Angus. Nas vacas da raça Charolesa foram descritas frequências gênicas de 0,37 para o alelo T e de 0,63 para o alelo C. Nesse estudo, Almeida et al. (2007), avaliaram as associações desse marcador à média de ganho de peso diário e ao desempenho reprodutivo em vacas pós-parto, porém essa associação não foi verificada.

Lusk (2007) relatou que o marcador E2FB não apresentou associação significativa com estimativas de curva de crescimento e de deposição de gordura em animais cruzados provenientes de rebanhos comerciais do oeste do estado de Kansas nos Estados Unidos da América, mantidos em confinamento.

Lagonigro et al. (2003) relataram a presença de uma mutação na posição 252 do exon 2 do gene da leptina. A mutação presente é a substituição de uma adenina para uma timina ( $A \rightarrow T$ ), levando a substituição do aminoácido tirosina para fenilalanina. As frequências gênicas foram 0,06 para o alelo T e 0,94 para o alelo A. Esse marcador apresentou diferença significativa entre os genótipos para média de ingestão de alimentos ( $P=0,043$ ).

O marcador na posição 252 do exon 2 do gene da leptina, chamado de E2JW por Schenkel et al. (2005), foi investigado em bovinos de raças européias e seus cruzamentos. As diferenças entre seus genótipos foi significativa para rendimento de carne e de gordura. Esses autores relataram que as frequências gênicas encontradas foram 0,04 para o alelo T e de 0,96 para o alelo A, sendo que as frequências genotípicas estavam de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Uma mutação C → T na posição 321 do exon 3 que codifica uma mudança de aminoácidos de alanina para valina foi identificado por Buchanan et al. (2002). Esses autores, porém, não analisaram a frequência e nem a associação desse marcador com características de interesse. Liefers et al, 2002 verificaram que esse marcador, chamado de A59V, apresentou diferenças significativas entre seus genótipos para concentração plasmática em vacas Holandesas, principalmente durante a prenhez, sendo o alelo T favorável ao aumento da concentração plasmática de leptina. As frequências gênicas para o alelo T foi de 0,25 e para o alelo C foi de 0,75, porém não foram analisadas as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nkrumah et al.(2006) estudaram o marcador A59V e verificaram diferenças significativas entre os genótipos do marcador para concentração plasmática de leptina (P=0,0029), média de ganho de peso diário (P=0,039), medidas de área de olho de lombo (P=0,014) e gordura subcutânea (P=0,014) por ultra-som em bovinos de corte das raças Angus e Charolesa. As frequências gênicas para o alelo T foi de 0,75 e para o alelo C foi de 0,25, sendo que as frequências estavam de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## **2.6. Polimorfismos presentes na região promotora do gene da leptina**

A região promotora regula o processo de transcrição do DNA para RNA. São seqüências específicas do DNA, onde a RNA polimerase se liga e é direcionada para as regiões codificadoras. Essa região é muito importante na regulação da expressão gênica (NELSON; COX, 2001).

Estudos em humanos e outras espécies têm demonstrado que polimorfismos presentes na região promotora do gene da leptina podem ser de grande importância, pois alguns polimorfismos são geralmente associados com fatores de regulação da expressão gênica e podem alterar significativamente a expressão gênica (MILLER et al, 1996). A região promotora do gene da leptina foi seqüenciada por Tanigushi et al. (2002).

Nkrumah et al. (2005) identificaram três polimorfismos na região promotora do gene da leptina. Os marcadores SNP identificados foram chamados de UASMS1, UASMS2 e UASMS3, localizados nas posições 207 (substituição C→T), 528 (substituição C→T) e 1759 (substituição A→G), respectivamente, na região promotora do gene da leptina. Em sua análise UASMS1 e UASMS3 apresentaram herança mendeliana e associação idêntica às características. O estudo foi realizado com bovinos produtos de cruzamentos de diversas raças de origem européia provindos de rebanhos comerciais e experimentais. Para o marcador UASMS1 foram descritas freqüências gênicas para o alelo T de 0,59 (rebanhos experimentais) e 0,48 (rebanhos comerciais) e para o alelo C a variação foi entre 0,41 (rebanhos experimentais) e 0,62 (rebanhos comerciais). Para o marcador UASMS2, as freqüências gênicas para o alelo T variaram de 0,21 (rebanhos experimentais) a 0,20 (rebanhos experimentais) e para o alelo C a variação foi entre 0,79 (rebanhos experimentais) e 0,80 (rebanhos comerciais). As freqüências genóticas dos dois marcadores não apresentaram desvios na distribuição de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O marcador UASMS1 apresentou efeito significativo para peso corporal final ( $P=0,04$ ), ingestão de matéria seca ( $P=0,007$ ), tempo de alimentação por dia ( $P=0,005$ ) e espessura de gordura subcutânea medida por ultra-som ( $P=0,04$ ). O marcador UASMS2 apresentou efeito significativo de diferença entre seus genótipos para concentração plasmática de leptina ( $P<0,001$ ), média de ganho de peso diário ( $P=0,002$ ), ingestão de matéria seca ( $P=0,001$ ), tempo de alimentação por dia ( $P=0,02$ ), espessura de gordura subcutânea ( $P=0,001$ ) e escore de marmoreio ( $P=0,01$ ) medidos por ultra-som.

No estudo de Schenkel et al. (2005) foram analisados os marcadores UASMS1 e UASMS2 em animais das raças Angus, Limousin, Charolesa, Simental e seus cruzamentos. Para o marcador UASMS1, a freqüência gênica foi de 0,61 para o alelo T e para o alelo C foi 0,39. Para o marcador UASMS2, o alelo T apresentou

freqüência gênica de 0,74 e para o alelo C de 0,26. As freqüências genotípicas dos dois marcadores não apresentaram desvios na distribuição de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O UASMS1 apresentou diferenças significativas entre os seus diferentes genótipos para rendimento de gordura ( $P=0,012$ ) e o marcador UASMS2 não apresentou efeito significativo para nenhuma das características avaliadas.

Nkrumah et al. (2006) relataram que o marcador UASMS2 apresentou freqüência gênica para o alelo T de 0,18 e para o alelo C de 0,82. As freqüências genotípicas do marcador não apresentaram desvios nas suas distribuições de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O marcador UASMS2 apresentou associação significativa para concentração plasmática de leptina ( $P<0,001$ ), ingestão de matéria seca ( $P=0,036$ ) e para todas as características envolvendo deposição de gordura subcutânea e marmoreio ( $P<0,05$ ).

Em estudo recente, o marcador UASMS2 foi associado com estimativas de curvas de crescimento e de deposição de gordura em animais cruzados, provenientes de rebanho comerciais. O alelo C foi favorável para a melhoria dos parâmetros de crescimento e o alelo T favorável para a deposição de gordura (LUSK, 2007).

Liefers et al. (2005), estudando vacas Holandesas prenhes, identificaram dois polimorfismos na região promotora do gene da leptina. Foram denominados de A1457G (localizado na posição 1457 na região promotora do gene da leptina - substituição A  $\rightarrow$ G) e C963T (localizado na posição 963 na região promotora do gene da leptina - substituição C  $\rightarrow$ T). O marcador A1457G apresentou freqüência gênica para o alelo A de 0,54 e para o alelo G de 0,46, o marcador C963T apresentou freqüência gênica para o alelo T de 0,33 e para o alelo C de 0,87. Os dois marcadores apresentaram associação para concentração plasmática de leptina durante a prenhez. O marcador A1457G apresentou associação significativa para primeira atividade luteal pós-parto ( $P=0,017$ ) e peso vivo da vaca na 1ª semana de lactação ( $P=0,027$ ). O marcador C963T apresentou associação significativa para ingestão de matéria seca ( $P=0,03$ ) e primeiro estro observado pós-parto ( $P=0,007$ ). Porém, nenhum outro trabalho foi encontrado avaliando esses marcadores descritos por Liefers et al (2005).

## **2.7. Polimorfismos presentes no gene do receptor da leptina**

O gene do receptor da leptina está localizado no cromossomo 3 e consiste de 20 exons (PFISTER-GENSKOW et al, 1997). Liefers et al. (2004), estudando o gene do receptor da leptina de vacas da raça Holandesa, relataram a presença do polimorfismo (T945M) na posição 115 (substituição T→C). O estudo foi conduzido com a genotipagem de 323 vacas, sendo que 93% apresentaram o genótipo CC e 7% apresentaram genótipo CT. Nenhum animal apresentou o genótipo TT. Porém suas distribuições estavam de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os animais heterozigotos CT apresentaram maiores concentrações plasmáticas de leptina durante a prenhez que o homozigoto CC ( $P < 0,05$ ).

No trabalho de Schenkel et al. (2006) foi estudado o marcador T945M, citado como LEPR SNP, e verificou-se que a frequência gênica do alelo T foi de 0,04 e o alelo C foi de 0,96. O marcador apresentou associação significativa escore de deposição de gordura subcutânea ( $P=0,005$ ), espessura de gordura subcutânea ( $P=0,019$ ) e rendimento de gordura de carcaça ( $P=0,034$ ).

## **2.8. Ultra-sonografia na avaliação de precocidade de acabamento e crescimento em bovinos de corte**

A produção de carcaças de peso adequado e com quantidade mínima de gordura subcutânea, de forma a garantir a qualidade da carne durante o processo de resfriamento, é um dos principais pontos de interesse para a cadeia produtiva da carne. A determinação do ponto ideal de abate dos animais de diferentes grupos genéticos em cada um dos diversos sistemas de produção disponíveis torna-se ferramenta importante para determinar a qualidade do produto (SUGUISAWA, 2002).

Metodologias utilizando medidas realizadas diretamente na carcaça apresentam uma boa correlação com a composição da mesma, entretanto, exigem o

abate do animal, demandam muito tempo e são de alto custo (HEDRICK, 1983; SILVA, 2002).

Isso levou a procura por métodos não invasivos ou indiretos, como a avaliação de carcaça por ultra-sonografia *in vivo* possibilitando determinar o grau de terminação e de desenvolvimento muscular dos animais, sem os empecilhos de outras metodologias (SILVA, 2002). O monitoramento de características como área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e espessura de gordura sobre o músculo *Bíceps femoris* ou picanha (EGP), além de auxiliar a escolha dos animais a serem abatidos, também fornece informações para serem incorporadas tanto em modelos de crescimento como de seleção animal (BERGEN et al, 1996).

A medida da AOL pelo método de ultra-som é realizada entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, pois é de fácil localização e diversos estudos relatam correlação positiva entre AOL em relação ao peso vivo, musculabilidade, quantidade e porcentagem de porção comestível (HEDRICK, 1983; LUCHIARI FILHO, 2000; SILVA et al, 2003; SUGISAWA, 2002).

A deposição de gordura na carcaça é amplamente variável ao longo do processo de crescimento do animal. À medida que a gordura corporal aumenta, ocorre diminuição da porcentagem de carne magra (BERG; BUTERFIELD, 1979). A deposição de gordura é importante tanto para o produtor quanto para a indústria frigorífica. Do ponto de vista da indústria frigorífica, um nível mínimo de gordura de cobertura é importante para proteção da carcaça durante o resfriamento evitando a desvalorização do produto (LUCHIARI FILHO, 2000). Do ponto de vista do produtor, diminuindo os custos de alimentação e determinando o grau de acabamento de carcaça para o abate (SUGISAWA, 2002).

A EGS, medida a  $\frac{3}{4}$  da borda medial sobre o músculo *Longissimus dorsi* é um eficiente indicador de acabamento de carcaça, sendo inversamente correlacionada à porcentagem de porção de cortes comerciais (HEDRICK, 1983; SILVA et al, 2003; SILVA et al, 2004; SUGISAWA, 2002). A medida da espessura de gordura subcutânea sobre o terço superior do músculo *Biceps femoris* é um bom indicador da gordura total da carcaça, explicando uma grande proporção da variação na porcentagem de gordura na carcaça (BAUD, 1998; WILLIAMS, 1992).

Em programas de melhoramento genético, a técnica de ultra-sonografia é um importante instrumento por apresentar vantagens na seleção de animais para características de precocidade de acabamento e crescimento, pois estão correlacionadas com o rendimento de cortes cárneos e precocidade de acabamento em carcaças de bovinos de corte (SUGUISAWA, 2002).

## **2.9. Características de crescimento ou desenvolvimento ponderal**

Os critérios de seleção de bovinos de corte no Brasil tem se baseado, quase que exclusivamente, em pesos corporais em diferentes idades ou função destes pesos, como ganhos médios diários ou dias para atingir determinado peso e em perímetro escrotal mensurado aproximadamente aos 18 meses, o qual é correlacionado com idade à puberdade, fertilidade, desenvolvimento ponderal e precocidade sexual das filhas (KARSBURG, 2003). Segundo Sarmento et al. (2003), o ganho de peso rápido é uma característica desejável em bovinocultura de corte, pois animais que tem maior capacidade de crescimento precisam de menor período para atingir o peso de abate.

A seleção para aumento de peso vem sendo amplamente aplicada nos programas de melhoramento genético de bovinos de corte (ELER et al, 1996). Estudos de crescimento, por meio das medidas de peso, envolvendo zebuínos são bastante expressivos na literatura (KOURY FILHO, 2001).

O peso ao nascimento e o peso à desmama refletem, de maneira geral, a habilidade materna da vaca e um pouco a capacidade do animal em se desenvolver (KOURY FILHO, 2001).

O peso ao sobreano e ganho de peso pós-desmama são extremamente importantes, sob o ponto de vista do melhoramento genético, pois determinam o desenvolvimento do animal, sem influência de efeitos maternos, tendo em vista que o animal já foi desmamado, na maioria das vezes, a mais de um ano, medindo o potencial de desenvolvimento do animal em diferentes ambientes, refletindo o potencial de ganho de peso após o desmame (PEDROSA, 2006).

A seleção para ganho de peso da desmama ao sobreano é o melhor indicador da capacidade de adaptação dos animais, às diversas condições de clima e ambiente (ALBUQUERQUE e FRIES, 1998).

Segundo Ledic e Deragon (1997), a intensa seleção no Brasil para tamanho corporal implica em um alerta para aumentar os estudos para testar as correlações entre peso final e as características de acabamento de carcaça e precocidade sexual.

### 3. HIPÓTESES

- Existem polimorfismos dos marcadores relacionados à leptina, já avaliados em animais de raças de origem taurina, em animais da raça Nelore?
- Existe associação entre os marcadores estudados e seus diferentes genótipos com precocidade de acabamento e características de desenvolvimento ponderal em bovinos da raça Nelore?

#### 4. OBJETIVOS

Face à escassez de informações na caracterização da frequência de polimorfismos de genes ligados às características relacionadas à precocidade de acabamento e de crescimento, e tendo em vista o potencial de utilização de marcadores moleculares em animais da raça Nelore no Brasil, este estudo teve como objetivos:

- (i) Caracterizar as frequências de polimorfismos em marcadores moleculares relacionados à leptina e com potencial de uso para seleção para precocidade de acabamento e de desempenho em bovinos da raça Nelore;
- (ii) Relacionar as frequências genóticas e gênicas dos diferentes marcadores à precocidade de acabamento e outras características de crescimento pós-desmama, como os de peso à desmama, ganho de peso da desmama ao sobreano, peso ao sobreano e circunferência escrotal ao sobreano.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Animais avaliados**

Foram utilizados 2.162 bovinos machos não castrados da raça Nelore, criados em pastagem até aproximadamente os 18 meses. Os animais eram provenientes da Agro-pecuária CFM Ltda, com propriedades nos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, e da Fazenda Mundo Novo, localizada no Estado de Minas Gerais. As medidas de ultra-som foram realizadas em 1.856 animais pertencentes à Fazenda São Francisco, da Agro-pecuária CFM Ltda, localizada em Magda, SP (20°38'38"S 50°13'34"W, com altitude de 526 metros). Informações de 2.162 animais referentes às características de desenvolvimento ponderal foram obtidos junto ao Laboratório de Melhoramento Genético "*Dr. Gordon Dickerson*", pertencente ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, localizado em Pirassununga, no Estado de São Paulo. As informações de genótipos dos animais para os marcadores estudados, desenvolvimento ponderal e medidas de ultra-som foram incluídas em banco de dados para a realização da análise dos resultados.

### **5.2. Coleta de amostras de sangue, extração de DNA, caracterização e determinação dos genótipos para os marcadores SNP avaliados**

Foram coletadas amostras de aproximadamente 10 ml de sangue dos animais pela veia jugular com tubos coletores a vácuo contendo EDTA. Após a coleta, os tubos foram refrigerados e encaminhados ao laboratório para a extração de DNA, através do método de extração e precipitação de NaCl, descrito por Olerup e Zetterquist (1992).

A caracterização e determinação dos genótipos para os marcadores SNP foi realizada por meio de PCR em Tempo Real utilizando o equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems®). Para isto, foi utilizado o sistema de detecção TaqMan™ em que primers e sonda que pareiam na região do DNA, permitem a identificação dos diferentes alelos. Foram sintetizadas sondas de forma a parear seletivamente no DNA molde onde se encontram os polimorfismos de interesse. A proporção de indivíduos heterozigotos e homozigotos para um de seus genótipos foi estimada por meio das leituras de fluorescências das sondas.

Para a reação de PCR foi utilizado aproximadamente 120 ng de DNA para uma reação de 25 µl, contendo 0,2 µM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador em 32 ciclos de 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 58°C e 1 minuto à 72°C. A seqüência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada gene estudado, estão apresentadas na Tabela 1.

A genotipagem das amostras foi realizada, nos Estados Unidos da América, pelos laboratórios licenciados pela IGENITY™, uma unidade de negócios da Merial Ltda., detentora de licenças de exploração dos citados marcadores moleculares e para facilidade de padronização dos resultados.

Tabela 1 - Identificação dos marcadores, localização gênica, primers, substituição de base e referências bibliográficas

SNP	Localização	Primers (5' – 3')	Substituição	Referências Bibliográficas
<b>E2FB</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 73 no exon 2 do gene da leptina	<b>F</b> AAGGAAAATGCGCTGT <b>R</b> ACGGTTCTACCTCGTC	C→T	Kononoff et al. (2005)
<b>E2JW</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 252 no exon 2 do gene da leptina	<b>F</b> GATTCCGCCGCACCTCTC <b>R</b> GGCTGTGCAGCCTTGACACAGG	A→T	Lagonigro et al. (2003)
<b>A59V</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 321 no exon 3 do gene da leptina	<b>F</b> GGGAAAGGGCAGAAAGATAG <b>R</b> TGCCAGACTGTTTGAGGATC	C→T	Haegeman, Zeveren e Peelman (2000)
<b>UASMS1</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 207 da região promotora do gene da leptina	<b>F</b> GGCACAATCCTGTGTATTGGTAAGA <b>R</b> GTCCATGTACCATTGCCCAATTTT	C→T	Nkrumah et al. (2005)
<b>UASMS2</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 528 da região promotora do gene da leptina	<b>F</b> AGGTGCCCAGGGACTCA <b>R</b> CAACAAAGGCCGTGTGACA	C→T	Nkrumah et al. (2005)
<b>C963T</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 963 da região promotora do gene da leptina	<b>F</b> AAGTCCCCTGTAGTTTTTATG <b>R</b> GCCTGGTTGTTTTGCTTTTA	C→T	Liefers et al. (2005)
<b>A1457G</b>	<b>Cromossomo 4</b> Posição 1.457 da região promotora do gene da leptina	<b>F</b> GGGGGAGGCGGAGAGGAG <b>R</b> TACATGGCCACTAAAAGGTTG	A→G	Liefers et al. (2005)
<b>T945M</b>	<b>Cromossomo 3</b> Posição 115 do exon 20 do gene do receptor da leptina	<b>F</b> ACCACAGAATCAGGAAGGACACA <b>R</b> GACAGGCCTTTCATTATTATTTTC	C→T	Liefers et al. (2004)

### 5.3. Metodologia de coleta dos dados de ultra-som

Foram utilizados 1.856 bovinos não castrados da raça Nelore de 18 a 30 meses de idade. Os animais utilizados para colheita de dados de ultra-som, foram colocados em sistema de confinamento com dieta de alta energia aproximadamente 30 dias antes das medições com ultra-sonografia em tempo real, mas haviam sido criados a pasto desde o seu nascimento. As imagens de ultra-som foram obtidas através de um equipamento de ultra-som marca Piemedical, modelo Scanner 200 VET, com um transdutor de 3,5 MHz e 178 mm de comprimento, com uma guia acústica acoplada para melhor adaptação a anatomia do corpo do animal.

Após a imobilização do animal em um tronco de contenção, o espaço entre a 12ª e 13ª costela foi localizado, através de palpação. Sobre o local da medida foi utilizado óleo vegetal com objetivo de atuar como acoplante acústico. Então era realizada a obtenção das imagens de área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) com o transdutor localizado transversalmente ao animal no espaço entre a 12ª e 13ª costelas do animal (Figura1).

Para a colheita da imagem de espessura de gordura sobre o músculo *Bíceps femoris* (EGP), colocou-se o transdutor, sem a guia acústica, sobre o músculo *Bíceps femoris*, em linha reta entre o íleo e o ísquio, para a determinação da espessura de gordura subcutânea (Figura 2).

As imagens obtidas foram gravadas em microcomputador portátil acoplado ao aparelho de ultra-som e posteriormente, foram analisados através de programa computacional específico para esta finalidade desenvolvido no GMA/FZEA.



Figura 1 – Obtenção das imagens de área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS)



Figura 2 – Obtenção das imagens de espessura de gordura sobre o músculo *Bíceps femoris* (EGP)

#### **5.4. Avaliação das características de desenvolvimento ponderal**

As informações de desenvolvimento ponderal utilizadas foram peso a desmama (PD), peso aos 18 meses ou sobreano (PS), ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano (GPS) e circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano (CE). Esses dados foram coletados nas fazendas onde se encontravam alojados os animais. Todas as informações utilizadas no estudo possuíam divisão por grupos contemporâneos caracterizados por animais nascidos em mesmo rebanho, no mesmo ano, na mesma estação, de mesmo sexo, de mesmo grupo de manejo até a desmama e pertencentes ao mesmo grupo de manejo da desmama ao sobreano. As informações estão incluídas no banco de dados pertencente à Agro-Pecuária CFM Ltda, controlado pelo Laboratório de Melhoramento Genético “*Dr. Gordon Dickerson*”, do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

#### **5.5. Metodologia de análise dos resultados**

As análises das informações foram realizadas pelo programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS INSTITUTE INC, 2004), utilizando-se os módulos SAS/STAT 9.1.3 e SAS/Genetics 9.1.3. As análises de frequências gênicas e genotípicas, teste de Equilíbrio de Hardy-Weiberg, heterozigose, diversidade alélica e conteúdo de informação polimórfica dos marcadores avaliados foram realizadas através do procedimento PROC ALLELE do módulo SAS/Genetics 9.1.3.

As análises de variância, desvios de dominância ou de aditividade, efeitos de aditividade e efeitos médio de substituição dos marcadores foram avaliados através do procedimento PROC MIXED do módulo SAS/STAT 9.1.3.

## 5.6. Determinação das freqüências genotípicas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população

As estimativas das freqüências gênicas e genotípicas foram estimadas para cada loco, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer (1987). Entende-se aqui por freqüência gênica como a proporção dos diferentes alelos de um gene na população, enquanto que freqüência genotípica é a proporção dos genótipos.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) consiste na teoria de que uma grande população, sob acasalamento ao acaso, na ausência de migração, mutação e seleção, tanto as freqüências gênicas como as freqüências genotípicas são constantes, de geração em geração, e as freqüências genotípicas são determinadas pelas freqüências gênicas (FALCONER, 1987). A probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg associado às freqüências genotípicas observadas foram testadas por duas metodologias. Uma das metodologias utilizadas foi a do teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) de aderência. Outra metodologia foi o Teste Exato por Permutação, descrito por Guo e Thompson (1992). Foi considerado como hipótese  $H_0$  a população apresentar suas freqüências genotípicas de acordo com as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo que valores significativos ( $P < 0,05$ ) rejeitam  $H_0$ .

O nível de heterozigose (Het), também chamado de heterozigosidade observada, é a simples proporção de heterozigotos dentro de uma população, sendo calculada pela equação 1:

$$Het = 1 - \sum_{u=1}^k F_{uu} \quad (1)$$

em que,

$F_{uu}$  é a freqüência genotípica dos homozigotos

A diversidade alélica (*Div*), também chamada de heterozigosidade esperada, é a proporção de heterozigotos na população quando se mantém as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo calculada pela equação 2:

$$Div = 1 - \sum_{u=1}^k f_u^2 \quad (2)$$

em que,

$f_u$  é frequência gênica de cada alelo

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é definido como a probabilidade que um dado genótipo de uma progênie permitirá deduzir o genótipo parental para o marcador avaliado (REGITANO; COUTINHO, 2001; SHETE; TIWARI; ELSTON, 1999). Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), PIC varia de 0 a 1 e pode ser classificado como pouco informativo ( $PIC < 0,25$ ), razoavelmente informativo ( $0,25 < PIC < 0,5$ ) e altamente informativo ( $PIC > 0,5$ ). O cálculo do valor de PIC é definido pela equação 3:

$$PIC = 1 - \sum_{u=1}^k f_u^2 - \sum_{v=u+1}^k 2f_u^2 f_v^2 \quad (3)$$

em que,

$f_u$  é frequência gênica do alelo  $u$ ;

$f_v$  é frequência gênica do alelo  $v$ ;

### **5.7. Efeito dos marcadores SNP sobre as características precocidade e de desenvolvimento ponderal**

Para análise das implicações dos resultados moleculares sobre as características de interesse, as informações obtidas por ultra-sonografia e de desenvolvimento ponderal foram utilizadas como variáveis dependentes. Os efeitos dos genótipos encontrados para os diferentes marcadores, foram avaliados a partir

do modelo proposto Kononoff et al. (2005), Nkrumah et al. (2004) e Nkrumah et al. (2005). O modelo estatístico proposto é apresentado abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + \beta_1 (I_{ijkl} - \bar{I}) + e_{ijkl}$$

em que,

$Y_{ijkl}$  = é o valor fenotípico observado para as características relacionadas a precocidade e de desenvolvimento ponderal;

$\mu$  = é uma constante inerente a todas as observações;

$C_i$  = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos e de classe de idade da mãe para peso ao desmame;

$S_j$  = é o efeito aleatório de reprodutor, com média 0 e variância  $\sigma^2_s$ ;

$M_k$  = é o efeito fixo do genótipo do marcador avaliado;

$\beta_1$  = é coeficientes de regressão linear da característica  $Y_{ijkl}$  em relação à idade do animal a mensuração, incluído no modelo como covariável;

$I_{ijkl}$  = é a idade do animal a mensuração;

$\bar{I}$  = é a média de idade a mensuração dos animais avaliados;

$e_{ijkl}$  = efeito aleatório residual associado à característica  $Y_{ijkl}$ , com média 0 e variância  $\sigma^2_e$ .

Os grupos contemporâneos para as características medidas por ultra-som foram caracterizados por animais nascidos em mesmo rebanho, no mesmo ano, na mesma estação, de mesmo sexo, de mesmo grupo de manejo até o desmame, de mesmo grupo de manejo da desmama ao sobreano e pertencentes ao mesmo o grupo de manejo do sobreano a mensuração ultra-sonográfica. Os grupos contemporâneos para a característica de desenvolvimento ponderal foram caracterizados por animais nascidos em mesmo rebanho, no mesmo ano, na mesma estação, de mesmo sexo, de mesmo grupo de manejo até ao desmame, e pertencentes ao mesmo grupo de manejo da desmama ao sobreano.

As análises de variância foram avaliadas por meio de modelos mistos, sendo calculadas as estimativas das médias de quadrados mínimos para cada genótipo de cada marcador. As diferenças entre as estimativas de médias de quadrados mínimos, quando necessárias, foram avaliadas por meio do Teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ).

A estimativas do efeito aditivo ( $\alpha$ ) para cada marcador foram estimadas pela diferença entre os valores genotípicos dos homozigotos, como demonstrado na equação 4. A estimativa dos valores do desvio de dominância ( $\delta$ ) foi calculado através da diferença entre o valor genotípico dos heterozigotos e da média dos valores genotípicos dos homozigotos, como demonstrado na equação 5 (FALCONER, 1987). Os contrastes foram testados pelo Teste *F*.

$$\alpha = \Phi_{uu} - \Phi_{vv} \quad (4)$$

$$\delta = \Phi_{uv} - (\Phi_{uu} + \Phi_{vv}) / 2 \quad (5)$$

em que,

$\Phi$  é o valor genotípico

O efeito médio de substituição é calculado através de uma equação de regressão ajustada aos genótipos de cada marcador, pelo método de quadrados mínimos, sendo cada ponto ponderado pelos valores genotípicos de cada genótipo, considerando o número de alelos favoráveis existente no genótipo. A estimativa do efeito médio de substituição é dada por  $\beta_1$  (FALCONER, 1987).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Frequências genóticas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população

As estimativas das frequências genóticas, gênicas e as probabilidades associadas aos Testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) estão apresentadas na Tabela 2. A maioria dos marcadores apresentou frequência genotípica baixa para os alelos menos freqüentes e em alguns casos, o alelo mais freqüente se apresentou, praticamente, fixado na população estudada, demonstrando baixa variabilidade dentro da população para alguns marcadores avaliados.

Os marcadores E2JW, A59V e UASMS2 não tiveram nenhum indivíduo homocigoto portador do alelo menos freqüente. O marcador T945M, presente no gene do receptor da leptina, e o marcador A1457G tiveram suas frequências genóticas e gênicas melhores distribuídas entre seus genótipos e alelos que os demais marcadores avaliados, conforme demonstrado na Tabela2.

O teste da probabilidade das proporções para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstrou que as frequências genóticas dos marcadores C963T e UASMS1 não se encontravam distribuídas de acordo com as proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg quando avaliados pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado). Os outros marcadores se encontraram distribuídos de acordo com as proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg quando avaliados pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado). Quando a probabilidade é calculada pelo Teste Exato de Permutações, descrito por Guo e Thompson (1992), todos os marcadores se apresentam distribuídos de acordo com as proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em ambos testes foi considerado como  $H_0$  a probabilidade de que as frequências genóticas estão de acordo com as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2. Freqüências genotípicas, gênicas e probabilidades de HWE

SNP	Freqüência Genotípica	Freqüência Gênica	Teste para HWE	
			$\chi^2$	Probabilidade Exata
<b>E2FB</b> (n = 2.152)	F(CC) = 0,876 F(CT) = 0,119 F(TT) = 0,005	f (C) = 0,936 f (T) = 0,064	0,46	0,47
<b>E2JW</b> (n = 1.931)	F(AA) = 0,998 F(AT) = 0,002	f (A) = 0,999 f (T) = 0,001	0,97	1,00
<b>A59V</b> (n = 1.887)	F(CC) = 0,998 F(CT) = 0,002	f (C) = 0,999 f (T) = 0,001	0,97	1,00
<b>C963T</b> (n = 2.095)	F(CC) = 0,960 F(CT) = 0,038 F(TT) = 0,002	f (C) = 0,979 f (T) = 0,021	0,02*	0,06
<b>A1457G</b> (n = 2.138)	F(AA) = 0,602 F(AG) = 0,340 F(GG) = 0,058	f (A) = 0,772 f (G) = 0,228	0,11	0,12
<b>UASMS1</b> (n = 2.116)	F(CC) = 0,001 F(CT) = 0,041 F(TT) = 0,958	f (C) = 0,022 f (T) = 0,978	0,04*	0,07
<b>UASMS2</b> (n = 2.108)	F(CC) = 0,995 F(CT) = 0,005	f (C) = 0,997 f (T) = 0,003	0,90	1,00
<b>T945M</b> (n = 1.871)	F(CC) = 0,773 F(CT) = 0,213 F(TT) = 0,014	f (C) = 0,880 f (T) = 0,120	0,67	0,74

n = número de animais; \* (P<0,05); HWE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para avaliação da variabilidade genética da população foram calculadas as estimativas de heterozigose, diversidade alélica e conteúdo de informação polimórfica. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativas de heterozigose (Het), diversidade alélica (Div) e conteúdo de informação polimórfica (PIC)

<b>Marcador</b>	<b>Het</b>	<b>Div</b>	<b>PIC</b>
<b>E2FB</b>	0,1185	0,1204	0,1132
<b>E2JW</b>	0,0016	0,0016	0,0016
<b>A59V</b>	0,0016	0,0016	0,0016
<b>A1457G</b>	0,3400	0,3521	0,2901
<b>C963T</b>	0,0382	0,0402	0,0394
<b>UASMS1</b>	0,0425	0,0406	0,0416
<b>UASMS2</b>	0,0052	0,0052	0,0052
<b>T945M</b>	0,1889	0,2133	0,1889

De um modo geral, a heterozigose da população, quando considerado cada marcador individualmente, é relativamente baixa, excluindo-se os marcadores A1457G e T945M que apresentaram estimativas de heterozigose e diversidade alélica relativamente alta. É interessante observar através desse resultado que a população encontra-se com uma baixa frequência de indivíduos heterozigotos para a maioria dos marcadores avaliados nesse estudo. A diversidade alélica, sendo definida como a proporção esperada de heterozigotos quando mantidas as proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstra que a frequência de heterozigotos não apresentaria grandes alterações, inclusive, as estimativas de heterozigose e diversidade alélica dos marcadores E2JW e A59V são iguais numericamente.

As estimativas do conteúdo de informação polimórfica demonstraram que os polimorfismos são pouco informativos para informação do genótipo parental, com exceção do marcador A1457G que pela sua estimativa seria considerado razoavelmente informativo, segundo as definições de Botstein et al. (1980).

## 6.2. Análise de efeitos dos marcadores nas características avaliadas

### 6.2.1. Análise dos efeitos dos marcadores nas características avaliadas por ultra-som

O número de animais avaliados, média, desvios padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo das medidas AOL, EGS e EGP avaliadas por ultra-som estão descritas na Tabela 4. EGS e EGP mostraram variação considerável entre os animais, sendo isso desejável para comparação dos animais com diferentes genótipos. AOL apesar de apresentar menor variação, avaliada pelo coeficiente de variação, apresenta uma grande amplitude em suas informações, sendo bastante informativo, se considerarmos as baixas frequências de alguns genótipos.

Tabela 4. Número de animais avaliados, média da característica, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo das medidas AOL (área de olho de lombo), EGS(espessura de gordura subcutânea) e EGP (espessura de gordura na picanha)

<b>Característica</b>	<b>n</b>	<b><math>\hat{m}</math></b>	<b><math>\hat{\sigma}</math></b>	<b>CV</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>AOL (cm<sup>2</sup>)</b>	1.856	65,09	7,42	11,40	40,20	93,80
<b>EGS (mm)</b>	1.856	2,17	1,27	58,75	0,00	7,60
<b>EGP (mm)</b>	1.856	3,82	1,86	48,75	0,00	11,90

n = número de animais avaliados;  $\hat{m}$  = média da característica;  $\hat{\sigma}$  = desvio padrão da característica; CV = coeficiente de variação da característica; min = valor mínimo da característica; max = valor máximo da característica

As probabilidades obtidas nas análises de variância para os efeitos dos marcadores nas medidas de ultra-som estão apresentados na Tabela 5. Observa-se, na Tabela 5, que os marcadores C963T e UASMS1 foram significativamente

associados com AOL ( $P < 0,05$ ). Já o marcador A1457G apresentou resultados significativos para a característica EGS ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5. Valores de probabilidade da análise de variância para testar os efeitos dos marcadores moleculares nas características AOL (área de olho de lombo), EGS (espessura de gordura subcutânea) e EGP (espessura de gordura de picanha)

<b>Marcador</b>	<b>AOL</b>	<b>EGS</b>	<b>EGP</b>
<b>E2FB</b>	0,0823	0,0788	0,1013
<b>E2JW</b>	0,3702	0,3030	0,4422
<b>A59V</b>	0,2761	0,7339	0,6073
<b>A1457G</b>	0,1417	0,0192*	0,2551
<b>C963T</b>	0,0451*	0,9256	0,9834
<b>UASMS1</b>	0,0176*	0,8688	0,7187
<b>UASMS2</b>	0,7345	0,6767	0,9884
<b>T945M</b>	0,5124	0,7251	0,3423

\* diferenças significativas  $P < 0,05$

Na Tabela 6 estão apresentadas as estimativas das médias de quadrados mínimos e erros padrão para os marcadores que apresentaram diferença significativa entre seus respectivos genótipos ( $P < 0,05$ ). O marcador A1457G foi associado significativamente com EGS, apresentando aumento da EGS para animais portadores do alelo A (Tabela 5), sendo que os homozigotos AA e heterozigotos AG não diferiram significativamente entre si ( $P < 0,05$ ). Os animais heterozigotos CT apresentaram maior AOL que os animais homozigotos CC para o marcador C963T, sugerindo que o alelo T do marcador C963T seja favorável para o aumento da AOL. O marcador UASMS1 também mostrou associação significativa para AOL, sendo que os animais heterozigotos apresentaram maior AOL, demonstrando o efeito favorável do alelo C (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa das médias de quadrados mínimos e erros padrão associados aos efeitos dos genótipos dos marcadores que demonstraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para as avaliações ultra-sonográficas de AOL ( $\text{cm}^2$ ), EGS (mm) e EGP (mm)

Marcador	Genótipos	AOL $\pm$ EP	EGS $\pm$ EP
<b>A1457G</b>	AA		2,32 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
	AG	–	2,30 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
	GG		1,88 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
<b>C963T</b>	CC	64,48 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	
	CT	66,56 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	–
<b>UASMS1</b>	TT	64,50 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>	
	CT	66,84 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	–

<sup>a,b</sup> Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna, para cada marcador, diferem entre si ( $P < 0,05$ ); AOL = Área de olho de lombo; EGS = espessura de gordura subcutânea; EGP = Espessura de gordura da picanha.

As probabilidades para os Testes F relacionados aos efeitos aditivo ( $\alpha$ ) e desvios de dominância ( $\delta$ ) para os marcadores avaliados, em relação a características ultra-sonográficas de AOL, EGS e EGP, bem como, as estimativas desses efeitos, encontram-se na Tabela 7 e 8, respectivamente.

O marcador A1457G demonstrou significativo desvio de dominância ( $P < 0,05$ ) para AOL, demonstrando que o marcador pode demonstrar efeito de dominância entre seus alelos para AOL ( $\delta = 0,95 \pm 0,48$ ), apesar de não ter sido demonstrado efeito na análise de variância para essa característica ( $P < 0,05$ ). Esse marcador também apresentou significativo efeito aditivo ( $\alpha = 0,44 \pm 0,16$ ) e de desvio de dominância ( $\delta = 0,20 \pm 0,92$ ) para EGS ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente). Os marcadores C963T e UASMS1 apresentaram significativos desvios de dominância para AOL, sendo que para C93T a estimativa foi  $\delta = 2,08 \pm 1,04$  ( $P < 0,05$ ) e para o marcador UASMS1 foi  $\delta = -2,35 \pm 0,99$  ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7. Probabilidades dos Testes F associados aos contrastes para os efeitos aditivos ( $\alpha$ ) e desvios de dominância ( $\delta$ ) dos marcadores, segundo as características ultra-sonográficas avaliadas de AOL (área de olho de lombo), EGS (espessura de gordura subcutânea) e EGP (espessura de gordura de picanha)

Marcador	AOL		EGS		EGP	
	$\alpha$	$\delta$	$\alpha$	$\delta$	$\alpha$	$\delta$
<b>E2FB</b>	0,3292	0,9053	0,3305	0,0922	0,3316	0,8791
<b>E2JW</b>	-	0,3702	-	0,3030	-	0,4422
<b>A59V</b>	-	0,2761	-	0,7339	-	0,6073
<b>A1457G</b>	0,1838	0,0484*	0,0052*	0,0281*	0,1173	0,1384
<b>C963T</b>	-	0,0451*	-	0,9256	-	0,9834
<b>UASMS1</b>	-	0,0176*	-	0,8688	-	0,7187
<b>UASMS2</b>	-	0,7345	-	0,6767	-	0,9884
<b>T945M</b>	0,6553	0,8999	0,4686	0,6800	0,3744	0,8366

- sem estimativa da probabilidade por ausência de um dos genótipos

\* diferenças significativas  $P < 0,05$

Tabela 8. Estimativas do efeito aditivo ( $\alpha$ ) e desvio de dominância ( $\delta$ ) e erros padrão (EP) associados dos marcadores que mostraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para as avaliações ultra-sonográficas de AOL (área de olho de lombo) e EGS (espessura de gordura subcutânea)

Marcador	AOL		EGS	
	$\alpha \pm EP$	$\delta \pm EP$	$\alpha \pm EP$	$\delta \pm EP$
<b>A1457G</b>	-	0,95 $\pm$ 0,48	0,44 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,92
<b>C963T</b>	-	2,08 $\pm$ 1,04	-	-
<b>UASMS1</b>	-	-2,35 $\pm$ 0,99	-	-

Todos os marcadores foram testados para efeito médio de substituição, através de uma equação de regressão linear ajustada aos genótipos de cada

marcador, considerando o número de alelos favoráveis presentes no genótipo do animal, e encontra-se na Tabela 9.

Na Tabela 10, verifica-se que o marcador E2FB apresentou efeito médio de substituição significativo para AOL ( $P < 0,05$ ) e EGP ( $P < 0,05$ ), apesar de não demonstrar efeito significativo na análise de variância ( $P < 0,05$ ). Os marcadores C963T e UASMS1 apresentaram efeito médio de substituição significativo para AOL ( $P < 0,05$ ) (tabela 9). A estimativa de efeito médio de substituição e seu respectivo erro padrão do marcador E2FB para AOL foi  $1,05 \pm 0,47$  e para EGP  $0,28 \pm 0,13$ . Para o marcador C963T, a estimativa de efeito médio de substituição e seu respectivo erro padrão para AOL foi  $2,08 \pm 1,04$  e o marcador UASMS1 apresentou efeito médio de substituição e respectivo erro padrão para AOL foi  $2,35 \pm 0,99$ .

Tabela 9. Probabilidades do teste F associado ao efeito médio de substituição dos marcadores para as avaliações ultra-sonográficas de AOL (área de olho de lombo), EGS (espessura de gordura subcutânea) e EGP (espessura de gordura de picanha)

<b>Marcador</b>	<b>AOL</b>	<b>EGS</b>	<b>EGP</b>
<b>E2FB</b>	0,0256*	0,1339	0,0328*
<b>E2JW</b>	0,3702	0,3030	0,4422
<b>A59V</b>	0,2761	0,7339	0,6073
<b>A1457G</b>	0,9124	0,0792	0,4640
<b>C963T</b>	0,0451*	0,9256	0,9834
<b>UASMS1</b>	0,0176*	0,8688	0,7187
<b>UASMS2</b>	0,7345	0,6767	0,9884
<b>T945M</b>	0,2503	0,4916	0,1470

\* diferenças significativas  $P < 0,05$

Tabela 10. Estimativas de efeito médio de substituição ( $\beta_1$ ) e erro padrão (EP) associados dos marcadores que mostraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para as avaliações ultrasonográficas de AOL (área de olho de lombo) e EGP (espessura de gordura de picanha)

Marcador	AOL	EGP
	$\beta_1 \pm EP$	$\beta_1 \pm EP$
E2FB	1,05 $\pm$ 0,47	0,28 $\pm$ 0,13
C963T	2,08 $\pm$ 1,04	-
UASMS1	2,35 $\pm$ 0,99	-

### 6.2.2. Análise dos efeitos dos marcadores nas características de crescimento

O número de animais avaliados, média, desvios padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo das medidas PD, PS, GPS e CE estão descritos na Tabela 11. As informações fenotípicas dos animais demonstraram maior variação para GPS quando comparada as outras características. A variação é importante para comparação dos animais com diferentes genótipos.

As probabilidades obtidas para análise de variância para os efeitos dos marcadores nas características de desenvolvimento ponderal estão apresentados na Tabela 12.

O marcador E2JW apresentou efeito significativo entre seus genótipos para PD ( $P < 0,05$ ) e CE ( $P < 0,01$ ). O marcador A59V apresentou efeito significativo entre seus genótipos para GPS ( $P < 0,05$ ) e o marcador T945M apresentou efeito significativo entre seus genótipos para GPS ( $P < 0,01$ ).

Tabela 11. Números de animais avaliados, média da característica, desvio padrão, coeficiente de variação, valor mínimo e máximo das medidas PD (peso à desmama), PS (peso aos 18 meses ou sobreano), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

<b>Característica</b>	<b>n</b>	<b><math>\hat{m}</math></b>	<b><math>\hat{\sigma}</math></b>	<b>CV</b>	<b>min</b>	<b>max</b>
<b>PD (kg)</b>	2.162	196,04	27,48	14,02	89,00	294,00
<b>PS (kg)</b>	2.154	322,20	47,08	14,61	162,00	510,00
<b>GPS (kg)</b>	2.151	126,77	32,54	25,67	25,90	338,70
<b>CE (cm)</b>	2.143	27,50	3,25	11,80	17,00	38,00

n = número de animais avaliados;  $\hat{m}$  = média da característica;  $\hat{\sigma}$  = desvio padrão da característica; CV = coeficiente de variação da característica; min = valor mínimo da característica; max = valor máximo da característica

Tabela 12. Valores de probabilidade associados aos efeitos dos marcadores pela análise de variância para as características PD (peso à desmama), PS (peso aos 18 meses ou sobreano), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

<b>Marcador</b>	<b>PD</b>	<b>PS</b>	<b>GPS</b>	<b>CE</b>
<b>E2FB</b>	0,2381	0,7432	0,1244	0,5448
<b>E2JW</b>	0,0163*	0,2727	0,3407	0,0014**
<b>A59V</b>	0,9831	0,1116	0,0290*	0,5927
<b>A1457G</b>	0,8684	0,5475	0,3195	0,6569
<b>C963T</b>	0,2467	0,3797	0,1497	0,1891
<b>UASMS1</b>	0,2486	0,2553	0,2059	0,2325
<b>UASMS2</b>	0,3878	0,6226	0,8928	0,3694
<b>T945M</b>	0,5985	0,3226	0,0076**	0,9623

\* diferenças significativas  $P < 0,05$ ; \*\* diferenças significativas  $P < 0,01$

A estimativa de média de quadrados mínimos e erro padrão dos efeitos dos genótipos para os marcadores E2JW, A59V e T945M estão representados na tabela 13. O alelo T do marcador E2JW demonstrou ser favorável para PD e CE. Os animais com genótipo heterozigoto AT foram 13% mais pesados para PD que os homozigotos AA, considerando a estimativa de média de quadrados mínimos. O alelo T do marcador E2JW também foi favorável para CE, sendo os animais heterozigotos AT superiores em aproximadamente 16% para CE que os animais homozigotos AA.

Tabela 13. Estimativas de médias de quadrados mínimos e erros padrão associado aos efeitos dos genótipos dos marcadores que demonstraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para PD (kg), GPS (kg) e CE (cm)

Marcador	Genótipos	PD $\pm$ EP	GPS $\pm$ EP	CE $\pm$ EP
<b>E2JW</b>	AA	196,49 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	–	29,41 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>
	AT	221,67 $\pm$ 20,09 <sup>a</sup>	–	34,00 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>
<b>A59V</b>	CC	–	134,18 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	–
	CT	–	108,77 $\pm$ 11,72 <sup>b</sup>	–
<b>T945M</b>	TT	–	155,98 $\pm$ 4,64 <sup>a</sup>	–
	CT	–	146,52 $\pm$ 1,98 <sup>b</sup>	–
	CC	–	144,02 $\pm$ 1,76 <sup>c</sup>	–

<sup>a,b,c</sup> Médias acompanhadas por letras diferentes na mesma coluna, para cada marcador, diferem entre si ( $P < 0,05$ ); PD = peso à desmama; GPS = ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano; CE = Circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano

As probabilidades associadas ao Teste F para os efeitos aditivo ( $\alpha$ ) e desvios de dominância ( $\delta$ ), segundo os marcadores avaliados para as características PD, PS, GPS e CE, bem como as particulares estimativas desses efeitos, encontram-se nas Tabelas 14 e 15 respectivamente.

Verifica-se pela Tabela 14, que alelo T do marcador E2JW demonstrou ter efeito de dominância para PD e CE. Para GPS, o alelo C do marcador A59V foi

associado significativamente ao incremento da característica em aproximadamente 23%, além de apresentar efeito significativo de dominância como representado na tabela 14 e 15 ( $P < 0,05$ ). O marcador T945M também demonstrou associação significativa para GPS, sugerindo que o alelo T seja favorável ao incremento da característica ( $P < 0,01$ ), apresentando efeito aditivo para a característica.

Tabela 14. Probabilidades do Teste F associados aos contrastes dos efeitos aditivo ( $\alpha$ ) e desvios de dominância ( $\delta$ ) dos marcadores para PD (peso à desmama), PS (peso aos 18 meses ou sobreano), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

Marcador	PD		PS		GPS		CE	
	$\alpha$	$\delta$	$\alpha$	$\delta$	$\alpha$	$\delta$	$\alpha$	$\delta$
<b>E2FB</b>	0,0987	0,1755	0,8053	0,5996	0,2281	0,6743	0,4184	0,6681
<b>E2JW</b>	-	0,0163*	-	0,2727	-	0,3407	-	0,0014**
<b>A59V</b>	-	0,9831	-	0,1116	-	0,0290*	-	0,5927
<b>A1457G</b>	0,5963	0,7580	0,2730	0,4561	0,1322	0,3864	0,7047	0,3770
<b>C963T</b>	0,3447	0,7103	0,2806	0,1839	0,0692	0,1526	0,1751	0,0863
<b>UASMS1</b>	0,3440	0,6924	0,2967	0,1515	0,0774	0,1143	0,0997	0,1706
<b>UASMS2</b>	-	0,3878	-	0,6226	-	0,8928	-	0,3694
<b>T945M</b>	0,5525	0,9172	0,1726	0,3941	0,0084**	0,1052	0,7956	0,8616

- sem estimativa da probabilidade por ausência de um dos genótipos

\* diferenças significativas  $P < 0,05$

\*\* diferenças significativas  $P < 0,01$

Tabela 15. Efeito aditivo ( $\alpha$ ) e desvio de dominância ( $\delta$ ) e os erros padrão (EP) associados dos marcadores que mostraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para PD (peso à desmama), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

Marcador	PD		GPS		CE	
	$\alpha \pm EP$	$\delta \pm EP$	$\alpha \pm EP$	$\delta \pm EP$	$\alpha \pm EP$	$\delta \pm EP$
E2JW	-	27,13 $\pm$ 11,29	-	-	-	4,59 $\pm$ 1,43
A59V	-	-	-	-25,40 $\pm$ 11,62	-	-
T945M	-	-	-11,96 $\pm$ 4,52	$\pm$	-	-

As probabilidades associadas ao Teste F para o efeito médio de substituição dos marcadores estudados para as características PD, PS, GPS e CE, são apresentados na Tabela 16.

Todos os marcadores foram testados para efeito médio de substituição, através de uma equação de regressão linear ajustada aos genótipos de cada marcador, considerando a quantidade de alelos favoráveis presentes no genótipo do animal.

Na Tabela 16, observa-se que os marcadores E2FB, A59V e T945M apresentaram significativo efeito de substituição para GPS ( $P < 0,05$ ). O marcador E2JW apresentou significativo efeito médio de substituição para PD e CE ( $P < 0,05$ ). Na Tabela 17 encontram-se as estimativas dos efeitos médio de substituição dos marcadores que apresentaram efeito significativo ( $P < 0,05$ ). O marcador E2FB apesar de não ter apresentado efeito na análise de variância, apresentou efeito médio de substituição significativo, sendo o alelo C considerado favorável para incremento no GPS. O marcador E2JW apresentou efeito médio de substituição significativo para PD e CE, sendo o alelo T favorável ao incremento dessas características. O marcador A59V apresentou efeito médio de substituição significativo para GPS e o alelo C foi favorável para a melhoria da característica. O marcador T945M apresentou efeito médio de substituição significativo GPS e o alelo T foi significativo para o aumento da GPS (Tabela 17).

Tabela 16. Probabilidades do Teste F associados aos efeitos médio de substituição dos marcadores para as características PD (peso à desmama), PS (peso ao sobreano), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

<b>Marcador</b>	<b>PD</b>	<b>PS</b>	<b>GPS</b>	<b>CE</b>
<b>E2FB</b>	0,3083	0,5727	0,0457*	0,3098
<b>E2JW</b>	0,0163*	0,2727	0,3407	0,0014**
<b>A59V</b>	0,9831	0,1116	0,0290*	0,5927
<b>A1457G</b>	0,6651	0,4201	0,2155	0,8067
<b>C963T</b>	0,1028	0,6794	0,1858	0,5336
<b>UASMS1</b>	0,1050	0,4120	0,4144	0,6491
<b>UASMS2</b>	0,3878	0,6226	0,8928	0,3694
<b>T945M</b>	0,3133	0,2147	0,0054**	0,8270

\* diferenças significativas  $P < 0,05$

\*\*diferenças significativas  $P < 0,01$

Tabela 17. Estimativa de efeito médio de substituição ( $\beta_1$ ) e erro padrão (EP) associado dos marcadores que mostraram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre seus genótipos para PD (peso à desmama), GPS (ganho de peso da desmama até os 18 meses ou sobreano) e CE (circunferência escrotal aos 18 meses ou sobreano)

<b>Marcador</b>	<b>PD</b>	<b>GPS</b>	<b>CE</b>
	$\beta_1 \pm EP$	$\beta_1 \pm EP$	$\beta_1 \pm EP$
<b>E2FB</b>	-	2,71 $\pm$ 1,35	-
<b>E2JW</b>	27,13 $\pm$ 11,29	-	4,59 $\pm$ 1,43
<b>A59V</b>	-	25,40 $\pm$ 11,62	-
<b>T945M</b>	-	3,22 $\pm$ 1,16	-

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Frequências genóticas, gênicas e estimação da variabilidade genética da população

De um modo geral, as frequências genóticas e gênicas encontradas nesse estudo divergem dos relatos encontrados na literatura consultada. O marcador E2FB avaliado em 154 bovinos das raças Angus, Charolesa, Hereford e Simental apresentou frequência gênica para o alelo T de 0,46 (BUCHANAN et al, 2002). Um estudo do marcador E2FB de Kononoff et al. (2005), em animais cruzados de raças britânicas e continentais (sem nenhuma participação de raças zebuínas), encontraram frequências gênicas e genóticas semelhantes a Buchanan et al. (2002). Schenkel et al. (2005) encontraram frequência gênica do alelo T para o marcador E2FB de 0,42 e analisando as frequências genóticas detectou que as mesmas estavam em de acordo com as proporções de HWE ( $P > 0,05$ ). Em estudo de frequência genotípica e gênica de bovinos das raças Hariana, Sawihal, Gir e Nimari, todas raças zebuínas, detectou-se a ausência da mutação C→T (CHOULDHARY et al, 2005). Nkrumah et al. (2004), relataram frequências gênicas de 0,48 para o alelo C e de 0,52 para o alelo T e a distribuição das frequências genóticas estavam de acordo com as proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estudo apresentado em 2006, Schenkel et al. (2006) relataram que as frequências gênicas em bovinos da raça Angus, Charolês, Simental, Limousin e seus cruzamentos foram similares aqueles encontrados por Schenkel et al. (2005). Como verificado, em nossos resultados, a raça Nelore, a maior representante de raças zebuínas no Brasil, apresentou a existência da mutação C→T em alguns indivíduos da raça, sugerindo a hipótese de que os resultados obtidos por Choudhary et al. (2005) divergiram dos resultados encontrados no presente estudo, devido a participação de matriarcas *Bos taurus* na formação da população zebuína nacional (MEIRELLES et al, 1999). O alelo T ( $f(T) = 0,064$ ) se apresenta em menor frequência do que em animais de raças européias de acordo com os estudos consultados. Em

nosso estudo, as freqüências genotípicas do marcador E2FB encontram-se de acordo com as proporções do HWE.

Lagonigro et al. (2003), estudando o marcador E2JW em cruzamentos F1 de vacas Holandesas e touros Charolês, encontraram freqüências gênicas de 0,06 para o alelo T e 0,94 para o alelo A. Outro estudo relatou freqüências gênicas 0,04 para o alelo T e de 0,96 para o alelo A, sendo que as freqüências estavam de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (SCHENKEL et al, 2005). De acordo com os achados no presente estudo, o alelo A ( $f(A) = 0,999$ ) se encontra em maior freqüência que o alelo T, estando de acordo com a tendência mostradas nos estudos citados acima, porém, de 1.931 animais genotipados da raça Nelore, apenas três animais apresentaram um alelo T em seu genótipo, sugerindo que o alelo A está praticamente fixado no rebanho estudado.

Estudo do marcador A59V, presente no exon3 do gene da leptina, em vacas Holandesas apresentou freqüências gênicas para o alelo T de 0,25 e para o alelo C de 0,75, porém não foi analisado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (LIEFERS et al, 2002). Nkrumah et al.(2006) estudaram o marcador A59V em animais das raças Angus, Charolesa e seus cruzamentos e verificaram freqüências gênicas para o alelo T de 0,75 e para o alelo C foi de 0,25, sendo que as freqüências estavam de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na raça Nelore, o alelo T ( $f(T) = 0,001$ ) se mostrou com uma freqüência baixíssima quando comparado ao alelo C, demonstrando divergência dos estudos realizados em gado de raças de origem européia.

Liefers et al. (2005), estudando vacas Holandesas, relataram freqüência gênica para o alelo A de 0,54 e para o alelo G de 0,46 do marcador A1457G, demonstrando superioridade da freqüência gênica do alelo A para esse marcador, como o encontrado em nosso estudo, porém, na raça Nelore o alelo A estava com freqüência bem superior a encontrada no estudo com vacas Holandesas. Para o marcador C963T, apresentou freqüência gênica para o alelo T de 0,33 e para o alelo C de 0,87 (LIEFERS et al, 2005). Na raça Nelore, o alelo C tem maior freqüência que alelo T, sendo que a freqüência do alelo C na raça Nelore é superior que em animais da raça Holandesa, como demonstrado no estudo.

Nkrumah et al. (2005) relataram freqüências gênicas para o alelo T de 0,59 (rebanhos experimentais) e 0,48 (rebanhos comerciais) e para o alelo C a variação

foi entre 0,41 (rebanhos experimentais) e 0,62 (rebanhos comerciais) para o marcador UASMS1. Para o marcador UASMS2, as frequências gênicas para o alelo T variaram de 0,21 (rebanhos experimentais) a 0,20 (rebanhos comerciais) e para o alelo C a variação foi entre 0,79 (rebanhos experimentais) e 0,80 (rebanhos comerciais). As frequências genotípicas dos dois marcadores não apresentaram desvios na distribuição de acordo com as proporções do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No estudo de Schenkel et al. (2005) foram estudados os marcadores UASMS1 e UASMS2 em animais das raças Angus, Limousin, Charolês, Simental e seus cruzamentos. Para o marcador UASMS1, a frequência gênica foi de 0,61 para o alelo T e para o alelo C foi 0,39. Para o marcador UASMS2, o alelo T apresentou frequência gênica de 0,74 e para o alelo C de 0,26. As frequências genotípicas dos dois marcadores não apresentaram desvios na distribuição para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Nkrumah et al. (2006) avaliando o marcador UASMS2, verificaram que a frequência gênica para o alelo T de 0,18 e do alelo C de 0,82. As frequências genotípicas desse marcador não apresentaram desvios na sua distribuição quando comparados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No presente trabalho o alelo T do marcador UASMS1 ( $f(T) = 0,978$ ) é mais freqüente que o alelo C em bovinos da raça Nelore, sendo superior a sua frequência em rebanhos da raça Nelore, quando comparados aos resultados descritos na literatura em bovinos de raças européias. Este fato demonstra menor variabilidade para o marcador UASMS1 em animais da raça Nelore do que em animais de raça européia. Para o marcador UASMS2, a frequência gênica do alelo T encontrada em animais da raça Nelore é bem menor quando comparados aos estudos em animais de raças européias, sendo que em animais da raça Nelore a frequência gênica do alelo T foi de 0,003, divergindo aos resultados apresentados em trabalhos com animais de raças européias.

Liefers et al. (2004) avaliando vacas da raça Holandesa e o marcador T945M relataram frequência genotípica para genótipo CC de 0,93 e 0,07 para o genótipo CT. Nenhum animal apresentou o genótipo TT, porém suas distribuições estavam de acordo com as proporções do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. No trabalho de Schenkel et al. (2006) foi estudado o marcador T945M, citado como LEPR SNP, e

verificou-se que a frequência gênica do alelo T foi de 0,04 e o alelo C foi de 0,96. De acordo com os achados do presente trabalho, o alelo C é mais freqüente na raça Nelore, porém as frequências genótípicas e gênicas do marcador T945M são bem mais equilibradas entre os genótipos e os alelos quando comparados aos resultados encontrados pelos dois estudos citados acima.

Para o Teste para Equilíbrio de Hardy-Weinberg, associados as frequências genótípicas, os trabalhos citados acima que o utilizaram a metodologia do Teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado), não encontraram desvios das proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ). Porém, na raça Nelore, quando utilizada essa metodologia, os marcadores C963T ( $P = 0,02$ ) e UASMS1 ( $P = 0,04$ ) apresentaram desvios das proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Segundo Guo e Thompson (1992), esse Teste não é ineficiente para populações pequenas ou no caso, em que a frequência de algum dos alelos é muito baixa, sendo que a restrição do Teste  $\chi^2$  é associada à frequência observada de no mínimo 5 indivíduos para cada genótipo, que no caso não acontece com os marcadores C963T e UASMS1 que apresentam apenas três indivíduos com genótipos menos freqüente. Nesse caso, em particular, recomenda-se a utilização do Teste Exato de permutação para verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (GUO; THOMPSON, 1992). Utilizando o Teste Exato de Permutações, o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg não foi observado para nenhum dos marcadores avaliados ( $P < 0,05$ ).

As estimativas de heterozigose e diversidade alélica são comumente investigadas para estimar a extensão da variabilidade genética de uma população, informação que contribui na seleção dos animais a serem empregados como genitores nas próximas gerações (MARSON, 2005). Segundo Machado et al. (2003), as informações da heterozigose e da diversidade alélica, aliado as frequências gênicas bem distribuídas faz com que um loco ou marcador seja um bom candidato para ser usado em testes de paternidade e em análises de segregação. As estimativas de heterozigose, diversidade alélica e PIC não foram encontradas em nenhum dos estudos que avaliaram os marcadores estudados no atual trabalho. Analisando a heterozigose e a diversidade alélica dos diferentes marcadores dentro da raça Nelore podemos observar que a variabilidade para a maioria dos marcadores é baixa, excluindo-se os marcadores A1457G e T945M que apresentaram valores relativamente razoáveis. PIC é uma estimativa de

probabilidade de informação de um marcador para deduzir o genótipo dos progentiros de uma determinada progênie.

Segundo os resultados obtidos no estudo, o marcador A1457G é razoavelmente informativo para PIC, enquanto os outros são pouco informativos devido ao  $PIC < 0,25$  (BOTSTEIN et al, 1980).

## **7.2. Análise de efeitos dos marcadores nas características avaliadas**

O marcador E2FB apresentou associação com AOL, EGP e GPS para efeito de substituição ( $P < 0,05$ ), porém não apresentou associação pela análise de variância. Buchanan et al. (2002), em análise dos diferentes genótipos desse marcador, relataram associação com níveis de mRNA da leptina e medidas de gordura na carcaça pela análise de variância, sendo que o alelo T foi favorável para ambas características avaliadas. Nkrumah et al. (2004) relataram diferenças significativas entre os genótipos do marcador E2FB para ganho diário de gordura subcutânea, grau de cobertura de gordura na carcaça, grau de rendimento de carcaça e rendimento de cortes comestíveis. O alelo T se mostrou favorável para as características de deposição de gordura e desfavorável para características de rendimento de carcaça quando comparado ao alelo C.

Outro achado importante foi a verificação do desvio de dominância significativo dos alelos favoráveis para todas as características que apresentaram associação com o marcador E2FB ( $P < 0,05$ ).

Schenkel et al (2005) relataram que os genótipos do marcador E2FB apresentaram diferenças significativas para rendimento de carne, rendimento de gordura e escore de gordura, sendo que os alelos apresentaram efeito semelhantes aos encontrados por Buchanan et al. (2002) e Nkrumah et al. (2004).

Em estudo recente com vacas multíparas das raças Aberdeen Angus e Charolesa, o marcador E2FB sendo avaliadas as associações desse marcador à média de ganho de peso diário e ao desempenho reprodutivo em vacas pós-parto. Essa associação, porém, não foi verificada por Almeida et al (2007). Lusk (2007), que estudou o efeito desse marcador nas curvas de crescimento e de deposição de

gordura, não verificou diferença significativa entre os genótipos de bovinos cruzados em rebanhos comerciais.

De acordo com os resultados da análise do efeito médio de substituição do marcador E2FB, onde o alelo T foi favorável para EGP (Tabelas 9 e 10) e GPS (Tabelas 16 e 17), sendo que, na análise de variância, esse efeito não foi observado (Tabelas 5 e 12). De acordo com as estimativas das análises de efeito médio de substituição, cada alelo T presente no genótipo do animal pode aumentar a EGP em aproximadamente 0,27 mm e o GPS em aproximadamente 2,71 kg. Para AOL o alelo C foi favorável, sendo estimado aumento de aproximadamente 1,05 cm<sup>2</sup> para cada alelo C presente no genótipo do animal. Os resultados obtidos diferem do encontrado na literatura, considerando que os efeitos foram avaliados pela análise de variância, porém esses efeitos descritos na literatura podem não ter sido captados na análise de variância devido a baixa frequência genotípica de TT, aumentando o erro padrão estimado para esse genótipo, sendo captado efeito apenas pelo efeito médio de substituição (análise de regressão linear).

O marcador E2JW apresentou efeito apenas para as características de crescimento (PD e CE). Schenkel et al. (2005) relataram associação do marcador com características de acabamento e rendimento de carcaça. Nesse estudo, não foi encontrado efeito significativo do marcador E2JW para nenhuma das características de precocidade de acabamento e rendimento avaliadas através do ultra-som (Tabela 9). Nenhum estudo de associação do marcador E2JW com características de crescimento foi encontrado na literatura, sugerindo que esses são os primeiros resultados apresentados de associação do E2JW com características de crescimento, mais especificamente para PD e CE.

Liefers et al, 2002 verificaram que o marcador A59V, apresentou diferenças significativas entre seus genótipos para concentração plasmática em vacas Holandesas, principalmente durante a prenhez, sendo o alelo T favorável ao aumento da concentração plasmática de leptina. Nkrumah et al.(2006) estudaram o marcador A59V e verificou diferenças significativas entre os genótipos do marcador para concentração plasmática de leptina, média de ganho de peso diário, medidas de área de olho de lombo e gordura subcutânea por ultra-som em gado de corte das raças Angus e Charolesa. Em animais da raça Nelore avaliados não foi observado efeito do marcador A59V para características medidas pelo ultra-som, diferindo dos

resultados relatados por Nkrumah et al. (2006), porém foi encontrado efeito significativo do marcador para GPS, sendo o alelo C favorável para essa característica, divergindo do resultado citado na literatura. Isso sugere inversão dos efeitos dos alelos na raça Nelore, quando comparado aos resultados em raças européias. Esse efeito de inversão pode estar relacionado à interação genótipo ambiente, porém maiores estudos devem ser realizados para esclarecer esse fato. O fato de bovinos taurinos serem confinados logo após o desmama nos países frios do hemisfério norte, onde a maioria dos marcadores foi descoberta, difere, e muito, dos sistemas de produção brasileiros, onde o animal é recriado em condições de pastagem, sofrendo os efeitos da seca num período crítico de seu crescimento, pode alterar de forma drástica as rotas metabólicas envolvidas nos processos de crescimento e terminação. Desta forma, discrepâncias entre as observações relatadas na literatura e as encontradas neste trabalho podem ser justificáveis, mas merecem estudos mais aprofundados.

Segundo Liefers et al. (2005), o marcador A1457G apresentou associação significativa para concentração plasmática de leptina, sendo o alelo G favorável para aumento da concentração plasmática.

Na presente pesquisa, o marcador apresentou efeito para EGS, demonstrando efeito aditivo e de dominância significativos para a característica. O alelo A estava relacionado ao aumento de EGS, sendo que os genótipos AA e AG apresentaram médias de quadrados mínimos superiores aos animais com genótipo GG. Considerando que a concentração de leptina está relacionada a maior porcentagem de gordura corporal em bovinos (GEARY et al, 2003) e os resultados apresentados por Liefers et al. (2005), então pode-se sugerir inversão dos efeitos dos alelos na raça Nelore, quando comparado aos resultados encontrados em animais de raças européias, possivelmente pelas diferenças nos sistemas de criação. Animais que sofrem restrições alimentares, pela má qualidade das pastagens tropicais no período de seca, podem se utilizar de outras rotas metabólicas, com outros marcadores moleculares envolvidos ou até mesmo com efeitos diversos dos relatados em *Bos taurus*.

O marcador C963T apresentou associação significativa para concentração plasmática de leptina, sendo o alelo T favorável para aumento da concentração plasmática, de acordo com Liefers et al (2005). Os resultados obtidos pelo estudo

com animais da raça Nelore demonstraram que o marcador C963T apresentou efeito significativo para AOL na análise de variância, desvio de dominância e efeito médio de substituição. Sendo o alelo T favorável para o aumento da AOL, sendo que o alelo T apresentou efeito de dominância com relação ao alelo C. As estimativas do efeito médio de substituição sugerem que cada alelo T presente no genótipo do indivíduo pode aumentar aproximadamente 2,08 cm<sup>2</sup> de AOL.

Nkrumah et al. (2005) em estudo realizado com bovinos produtos de cruzamentos de diversas raças de origem européia provindos de rebanhos comerciais e experimentais relataram que o marcador UASMS1 apresentou efeito significativo de diferença entre seus genótipos para peso corporal final e EGS medidas por ultra-som, sendo o alelo T favorável para ambas características. Também foi relatado efeito aditivo do alelo T para peso corporal final ( $P < 0,01$ ) e efeito de dominância do alelo C para EGS ( $P < 0,05$ ). Em estudo realizado por Schenkel et al. (2005), o marcador UASMS1 apresentou diferenças significativas entre os seus diferentes genótipos para espessura de gordura subcutânea corporal. Em ambos trabalhos o alelo T estava relacionado as características de deposição gordura subcutânea e peso corporal final. De acordo com os resultados obtidos na população avaliada de animais da raça Nelore, o marcador UASMS1 apresentou efeito apenas para AOL, sendo o alelo C relacionado ao favorecimento da característica, sugerindo que pela avaliação indireta de rendimento de cortes comestíveis e de carcaça pela avaliação de ultra-som e considerando que a quantidade de gordura na carcaça apresenta correlação negativa com rendimento de cortes comestíveis, o marcador UASMS1 pode apresentar efeito para rendimento de carcaça e de cortes comestíveis. Outro fato a ser considerado é o efeito de dominância do alelo C para a característica AOL. Nkrumah et al. (2005) também relatou efeito de dominância do alelo C para as características de peso corporal final e EGS.

Em estudos publicados avaliando o marcador UASMS2, seus efeitos foram significativos para diversas características de crescimento e precocidade de acabamento (LUSK, 2007; NKRUMAH et al, 2005; NKRUMAH et al, 2006). Neste estudo, o marcador UASMS2 não apresentou efeito significativo para nenhuma das características avaliadas, porém o efeito pode não ter sido verificado devido a baixa frequência gênica para o alelo T encontrada no estudo.

Liefers et al. (2004), estudando o marcador T945M, relatou que os animais heterozigotos CT apresentaram maiores concentrações plasmáticas de leptina durante a prenhez que o homozigoto CC ( $P < 0,05$ ), sendo o alelo T favorável ao aumento da concentração plasmática da leptina. No trabalho de Schenkel et al. (2006) foi estudado o marcador T945M, citado como LEPR SNP, e verificou-se associação significativa com escore de deposição de gordura subcutânea, espessura de gordura subcutânea e rendimento de gordura de carcaça. De acordo com os resultados apresentados na raça Nelore, o marcador T945M não apresentou associação com nenhuma das características citadas na literatura, porém apresentou efeito significativo para GPS. O alelo T apresentou efeito significativo na análise de variância, efeito aditivo e efeito médio de substituição. Essa avaliação permite sugerir que a seleção assistida por marcadores moleculares de animais pode ser voltada para o alelo T do marcador T945M quando GPS está entre os objetivos de seleção.

## 8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi verificada a presença dos polimorfismos estudados em animais da raça Nelore, sendo que para os diferentes marcadores foram encontradas as mesmas mutações descritas em animais de raças européias. Porém, a variabilidade para a maioria dos marcadores é baixa, excluindo-se os marcadores A1457G e T945M que apresentaram variabilidade relativamente razoável dentro da população Nelore estudada. Apesar da pequena variabilidade, o uso dos marcadores estudados apresenta grande potencial na seleção de animais portadores de alelos favoráveis, podendo auxiliar significativamente o progresso genético da raça Nelore para as características estudadas, já que a maioria dos alelos favoráveis está em baixa frequência na população estudada.

O estudo também demonstrou que a maioria dos marcadores estudados presentes no gene da leptina e no gene do receptor da leptina apresentou associação significativa para as características de crescimento e precocidade de acabamento. O marcador E2FB apresentou associação com AOL, EGP e GPS na análise de efeito médio de substituição, porém não apresentou associação estatisticamente significativa pela análise de variância. O alelo T apresentou-se favorável para EGP e GPS, sendo estimado que cada alelo T presente no genótipo do animal pode contribuir com 0,27 mm de EGP e 2,71 kg para GPS. O alelo C apresentou-se favorável para o aumento da AOL, sendo estimado que cada alelo C presente no genótipo pode incrementar 1,05 cm<sup>2</sup>.

O alelo T do marcador E2JW apresentou associação favorável para PD e CE, sendo que animais heterozigotos foram 13% mais pesados para PD e apresentaram incremento de 16% para CE que animais homozigotos AA quando considerada a estimativa de médias de quadrados mínimos.

O marcador A59V apresentou associação com GPS, sendo o alelo C responsável pelo aumento de aproximadamente 23% da característica. Já o marcador A1457G apresentou associação significativa com EGS, sendo o alelo A responsável pelo incremento de aproximadamente 20% na característica. O alelo T do marcador C963T apresentou associação favorável para AOL, sendo responsável pelo aumento de aproximadamente 2,08 cm<sup>2</sup> da característica. O marcador UASMS1

apresentou efeito significativo para AOL, sendo o alelo C favorável para o incremento da característica. O marcador T945M associação significativa para GPS, sendo o alelo T favorável para o incremento de aproximadamente 3,22 kg no ganho de peso do animal.

A seleção de animais portadores de alelos favoráveis dos marcadores estudados pode auxiliar fortemente a aceleração do progresso genético na raça Nelore. São necessários estudos do efeito conjunto desses marcadores para essas características, porém os resultados observados nesse estudo confirmam o potencial de utilização dos marcadores moleculares estudados, via seleção assistida por marcadores (SAM), em animais da raça Nelore. O uso desses marcadores através da seleção assistida por marcadores de animais portadores de alelos favoráveis pode impactar positivamente a cadeia produtiva de bovinos de corte em todos os seus segmentos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne: Estatística**. 2007. Disponível em : <[http://www.abiec.com.br/estatisticas\\_relatorios.asp](http://www.abiec.com.br/estatisticas_relatorios.asp)>. Acesso em: 30 nov. 2007.

AHIMA, R.S.; FLIER, I.S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.62, p.413-37, 2000.

ALBUQUERQUE, L.G.; FRIES, L.A. Selection for reducing ages of marketing units in beef cattle. . In: **World Congress on the Genetics Applied to Livestock Production**, 6., **Proceedings...**, 1998. CD-ROM

ALMEIDA, S.E.M. et al. Association between molecular markers linked to the leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.206-11, 2007.

ANUALPEC 2007. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo, Instituto FNP e Argos comunicação, p. 61-3, 2007.

AUWERX, J. ; STAELS, B. Leptin. **The Lancet**, London, v.351, p.737-42, 1998.

BADO, A. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, London, v.394, p.790-3, 1998.

BAUD, S. An evaluation of the use of ultrasound scanning to predict carcass traits in steers grain fed for the Japanese market. **Australian Journal of Agriculture Research**, Melbourne, v.49, n.1, p.147-52, 1998.

BERG, R.T.; BUTERFIELD, R.M. **Nuevos Conceptos sobre el desarrollo del ganado vacuno**. Zaragoza: Acríbia, 1979. 279p.

BERGEN, R.D. et al. Prediction of lean yield in yearling bulls using real-time ultrasound. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.76, p.305-11, 1996.

BLACHE, D. et al. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.165, p.625-37, 2000.

BONILHA, S.F.M. **Efeitos da seleção para peso pós-desmama sobre características de carcaça, rendimento de cortes e composição corporal de bovinos Nelore e Caracu.** 2003. 55f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz , Piracicaba, 2003.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314-31.

BOURDON, R.M. Biotechnology and animal breeding. In: BOURDON, R.M. **Understanding animal breeding.** New Jersey: Prentice Hall, 2000. p.440-46.

BROGAN, R.S.; GROVE, K.L.; SMITH, M.S. Differential regulation of leptin receptor but not Orexin in the hypothalamus of the lactating rat. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v.12, p.1077-86, 2000.

BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 34, p.105-16, 2002.

CASABIELL, X. et al. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v.82, 4270-73, 1997.

CASTRACANE, V.D. et al. Serum leptin concentration in women : effect of age, obesity, and estrogen administration. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.70, p.472-7, 1998.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F. Direct effects of photoperiod on lipid metabolism, leptin synthesis and milk secretion in adult sheep. In: CRONJÉ, P.B. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. New York: CABI Publishing, 2000. p.205-23.

CHOULDHARY, V. et al. DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.4, p.740-742, 2005.

CINTI, S. et al. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, p.797-804, 1997.

CLARKE, I.J.; HENRY, B.A. Leptin and reproduction. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v.4, p.48-55, 1999.

COLEMAN, D.L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, New York, v.9, p.294-8, 1973.

COLEMAN, D.L.; HUMMEL, K.P. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. **Diabetologia**, New York, v.9, p.287-93, 1973.

CONSIDINE, R.V. et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New England Journal of Medicine**, v.334, p.292-5, 1996.

CONSIDINE, R.V.; CARO, I.F. Leptin and the regulation of body weight. **The International Journal Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 29, supp.11, p.1255-72, 1997.

DAVIS, G.P.; D'OCCHIO, M.J.; HETZEL, D.J.S. Smart breeding: Selection with markers and advanced reproductive technologies. In: CONGRESS OF ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 12., 1997, Melbourne. **Proceedings...** p.429-32, 1997.

DEKKERS, J.C.M. ; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, p. 22-32, 2002.

DELAVAUD, C. et al. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specified RIA in sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.165, p.509-16, 2000.

DOYON, C. et al. Molecular evolution of leptin. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v.124, p.188-98, 2001.

DYER, C.J. et al. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissue and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.14, p.119-28, 1997.

EHRHARDT, R.A. et al. Development of a specific radio-immunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.166, p.519-28, 2000.

ELER, J.P. et al. Parâmetros genéticos para peso, avaliação visual e de circunferência escrotal na raça Nelore, estimados por modelo animal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, n.2, p.203-213, 1996.

ESCOBAR-MORREALE, H.F. et al. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, p.4485-8, 1997.

EUCLIDES FILHO, K. **Melhoramento Genético no Brasil**: fundamentos, história e importância. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1999. p.1999.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 4ed. Essex Addison Wesley Longman Ltda., 1987, p.1-2.

FITZSIMMONS, C.J. et al. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, New York, v.9, p.432-34, 1998.

GAO, Y et al. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farms animals. **Meat Science**, Barking, v.77, p.36-45, 2007.

GARCIA, M.C. et al. Gestacional profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, p.698-703, 2000.

GEARY, T.W. et al. Leptin as predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, p.1-8, 2003.

GONG, D.W. et al. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p.3971-74, 1996.

GRUNFELD, C. et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the *ob* gene product, in hamsters. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.97, p.2152-7, 1996.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v.48, p.361-72.

HEDRICK, H.B. Methods of estimating live animal and carcass composition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.57, p.1316-26, 1983.

HENRY, B.A. et al. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion hormones from the pituitary gland : Evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.3, p.1175-82, 1999.

HENRY, B.A. et al. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v.168, n.1, p.67-77, 2001.

HOUSEKNECHT, K. L. et al. The biology of leptin: A review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.1405-20, 1998.

HWANG, C.S. et al. Transcriptional activation of the mouse obese (*ob*) gene by CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.873-77, 1996.

JEON et al. Application of DNA markers in animal industries. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.46, p.173-82, 2006.

JOSAHKIAN, L.A. Programa de melhoramento genético das raças zebuínas. In: SIMPÓSIO PECUÁRIA 2000 – PERSPECTIVAS PARA O III MILÊNIO, 1., 2000, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FZEA-USP, 2000. 1 CD-ROM.

KARSBURG, J.H.H. **Estimativas de parâmetros genéticos de características de carcaças medidas por ultra-sonografia e de desenvolvimento ponderal em bovinos da raça Santa Gertrudis**. 2003. 82f. FZEA-USP, Pirassununga, 2003.

KONFORTOV, B.A.; LICENCE, V.E.; MILLER, J.R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, New York, v.10, p.1142-45, 1999.

KOURY FILHO, W. **Análise genética de escores de avaliações visuais e suas respectivas relações com desempenho ponderal na raça Nelore.** 2001. 82f. Dissertação (Mestrado) – FZEA – USP, Pirassununga, 2001.

LAGONIGRO, R. et al. Short Communication: A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, Oxford, v.34, p.371-74, 2003.

LEDIC, I.L.; DERAGON, L.A.G. Correlação fenotípica entre medidas corporais e peso em touros Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.49, p.649-54, 1997.

LI, H.; MATHENY, M.; SCARPACE, M.J. Beta 3-adrenergic mediated suppression of leptin gene expression in rats. **American Journal of Physiology**, v.272, p.1031-36, 1997.

LIEFERS, S.C. et al. Association between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.1633-8, 2002.

LIEFERS, S.C. et al. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. **Animal Genetics**, Oxford, v.35, p.138-41, 2004.

LIEFERS, S.C. et al. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. **Animal Genetics**, Oxford, v.36, p.111-8, 2005.

LIEN, S. et al. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p.245, 1997.

LIMA, F.P. **Nelore: a força de uma raça.** São Paulo: Associação de criadores de Nelore do Brasil, 1989. p.129.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária de carne bovina.** 1 ed. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000. 134p.

LUSK, J.L. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, p.1865-72, 2007.

MÁCAJOVÁ, M.; LAMOSOVÁ, D.; ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.51, p.157-66, 2004.

MACHADO, M.A. et al. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.1, p.93-8, 2003.

MARSON, E.P. **Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte compostas**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature Medicine**, New York, v.3, p.1029-33, 1997.

MEIRELLES, F.V. et al. Is the american Zebu really *Bos indicus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.22, n.4, p.543-6, 1999.

MEWISSEN, T. **Genomic selection: the future of marker assisted selection and animal breeding**. In: Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session II: MAS in animals. FAO Electronic Forum on biotechnology in food and agriculture, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/biotech/conf10.htm>>

MEWISSEN, T.; GODDARD, M.E. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 28, p. 161-76, 1996.

MILLER, S.G. et al. The adipocyte specific transcription factor C/EBP $\alpha$  modulates human *ob* gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.5507-11, 1996.

MORASH, B.; JOHNSTONE, L.; LEOPOLD, C. The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.165, p.97-105, 2000.

MORRIS, C.A. et al. Progress in DNA marker studies of beef carcass composition and meat quality in New Zealand. In: CONGRESS OF ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT ANIMAL BREEDING GENETICS, 14., **Proceedings...** p.17-22, 2001.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v.44, n.3, p.205-14, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of biochemistry**. New York: Prentice Hall, 2005. p.998.

NKRUMAH, J.D. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Canadian Journal of Animal Science**, Otawwa, v.84, p.211-19, 2004.

NKRUMAH, J.D. et al. Polymorphism in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.83, p.20-8, 2005.

NKRUMAH, J.D. et al. Polymorphisms in the leptin gene and their associations with performance, feed efficiency, and carcass merit of beef cattle. In: World Congress on the Genetics Applied to Livestock Production, 8., **Proceedings...**, 2006. CD-ROM.

OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigen**, London, v.39, p.225-35, 1992

OLIVEIRA, J.F.C.; HENKES, L.E. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: Gonsalves, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora, 2002. p.261-79.

OLIVEIRA, J.H.F.; MAGNABOSCO, C.U.; BORGES, A.M.S.M. **Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. p.54.

PARDI, M.C. et al. **A epopéia do zebu: Um estudo zootécnico-econômico 1944/1994**. Goiânia: Editora UFG, 1996. p. 126.

PAZ, C.C.P. et al. Influência de polimorfismos genéticos sobre os parâmetros da curva de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n.4, p.858-69, 2004.

PEDROSA, V.B. **Estimação de parâmetros genéticos do peso adulto em matrizes da raça Nelore**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – FZEA – USP, Pirassununga, 2006.

PFISTER-GENSKOW, M. et al. The leptin receptor (LEPR) gene maps to bovine chromosome 3q33. **Mammalian Genome**, New York, v.8, p.227, 1997.

POMP, D. et al. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p.1427, 1997.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.215.

REN, M.Q. et al. Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.23, p.371-81, 2002.

SALADIN, R. et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, London, v.377, p.527-9, 1995.

SANTIAGO, A.A. Gado Nelore: 100 anos de seleção. São Paulo: Editora dos Criadores, 1987. p.594.

SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo**. Campinas: Instituto de Ensino Agrícola, 1985. p. 744.

SANTOS, R. **Nelore: a vitória brasileira**. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical, 1995. v.2. 392p.

SANTOS, R. **O Zebu: edição comemorativa dos 60 anos do registro genealógico**. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical, 1998. p.134.

SARMENTO, J.L.R. et al. Fatores ambientais e genéticos sobre o ganho em peso diário de bovinos Nelore no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.2, p.325-30, 2003.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT 9.1. USER'S GUIDE**. 2004. Disponível em:  
<[http://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc\\_91/stat\\_ug\\_7313.pdf](http://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf)>  
Acesso em: 14 set. 2007.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of single nucleotide polymorphism in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.83, p.2009-20, 2005.

SCHENKEL, F.S. et al. Association of SNPs in the leptin and leptin receptor genes with different fat depots in beef cattle. In: World Congress on the Genetics Applied to Livestock Production, 8., **Proceedings...**, 2006. CD-ROM.

SEEBER, R.M; SMITH, J.T.; WADDELL, B.J. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.66, p.1762-7, 2002.

SILVA, S.L. **Estimativa de características de carcaça e ponto ideal de abate por ultra-sonografia, em bovinos submetidos a diferentes níveis energéticos na ração**. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado) – FZEA-USP, Pirassununga, 2002.

SILVA, S.L. et al. Estimativa do peso e do rendimento de carcaça de tourinhos Brangus e Nelore, por medidas de ultra-sonografia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.5, p.1227-35, 2003.

SILVA, S.L. et al. Estimativa da gordura de cobertura ao abate, por ultra-som, em tourinhos Brangus e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.2, p.511-7, 2004.

SLIEKER, L.J. et al. Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p.5301-04, 1996.

STONE, R.T.; KAPPES, S.M. Two polymorphic microsatellites within an 18 kb genomic clone containing the bovine *ob* gene. **Animal Genetics**, Oxford, v.27, p.64, 1996.

SUGUISAWA, L. Ultra-sonografia para predição das características e composição da carcaça de bovinos. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2002.

TANIGUCHI, Y. et al. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life**, Philadelphia, v. 53, p.131-135, 2002.

TARTAGLIA, L.A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor : OB-R. **Cell**, Cambridge, v.83, p.1263-71, 1995.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.272, p.6093-6, 1997.

VAN DER WERF, J. Seleção assistida por marcador. In: KINGHORN, B.; VAN DER WERF, J.; RYAN, M. **Melhoramento animal: Uso de novas tecnologias**. Piracicaba: FEALQ, 2006. p.151-63.

WANG, J. et al. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, London, v.393, p.684-88, 1998.

WILLIAMS, R.E. *Biceps femoris* and rump fat as additional ultrasound measurements for predicting retail product and trimmable fat in beef carcass. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p.7-13, 1992.

YAMADA, T.; KAWAKAMI, S.; NAKANISHI, N. The relationship between plasma leptin concentrations and distribution of body fat in crossbred steers. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.74, p.95-100, 2003.

ZHANG, Y et al. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. **Nature**, London, v.372, p. 425-32, 1994.