

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Marcadores Moleculares Aplicados à Bovinocultura

Alexandre Ferreira Bilhalva

Pelotas, 2014

Alexandre Ferreira Bilhalva

Marcadores Moleculares Aplicados à Bovinocultura

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Priscila Marques Moura De Leon

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B595m Bilhalva, Alexandre Ferreira

Marcadores moleculares aplicados à bovinocultura /
Alexandre Ferreira Bilhalva ; Priscila Marques Moura De
Leon, orientadora. — Pelotas, 2014.

55 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Genômica. 2. Pecuária. 3. Melhoramento genético. 4.
Dna mitocondrial. 5. Marcadores autossômicos. I. Leon,
Priscila Marques Moura De, orient. II. Título.

CDD : 599.64

Alexandre Ferreira Bilhalva

Marcadores Moleculares Aplicados à Bovinocultura

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10/12/2014

Banca Examinadora: Dr.Cássio Cassal Brauner, Dr.Vinicus Farias Campos e Me. Lucas Teixeira Hax

.....
Prof^a. Dr^a. Priscila Marques Moura De Leon (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner

Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Vinicus Farias Campos

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Me. Lucas Teixeira Hax

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus pais Edson Borges Bilhalva e Maria Helena Tavares Ferreira, e meu irmão Thiago Ferreira Bilhalva, por todo o carinho, oportunidades e força na minha caminhada pela graduação e durante toda a minha vida. Sem eles nada disso seria possível.

À minha namorada, Monique da Silva Costa, por todo o incentivo, compreensão e grande ajuda que me forneceu durante a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora acadêmica e amiga, Priscila Marques Moura De Leon, por todos os conselhos e credibilidade que me depositou para que este trabalho ficasse o melhor possível.

Aos professores do curso de Biotecnologia, pois me forneceram um conhecimento de valor inestimável por toda a graduação.

Aos meus amigos de fé, verdadeiros irmãos que levarei para o resto da vida, Joaquim, Igor, Rodrigo, Gustavo, Alessandro, Eduardo, Pedro e Guilherme.

E a Deus, por ter me dado toda a força e confiança necessária para realizar todos os meus desafios.

Obrigado.

Resumo

BILHALVA, Alexandre Ferreira. **Marcadores Moleculares Aplicados à Bovinocultura**. 2014. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A genômica aplicada à bovinocultura surge como uma ferramenta em potencial para ser utilizada por criadores com o objetivo de manter um alto padrão genético no seu rebanho. Com a busca intensificada por uma maior produtividade animal em uma área cada vez menor, os marcadores moleculares surgem como uma grande ferramenta de auxílio. Também, a possibilidade de selecionar, com uma maior garantia, animais com características de interesse financeiro, tem aumentado a curiosidade destes pecuaristas. Este trabalho de revisão visa demonstrar as principais ferramentas genômicas que estão sendo aplicadas na criação e seleção bovina, e as que têm maior potencial de utilização. Para melhor desenvolvimento dos tópicos abordados, o trabalho foi dividido em três principais categorias: marcadores autossômicos, marcadores associados ao cromossomo Y e marcadores associados ao DNA mitocondrial, permitindo uma visão ampla, das principais pesquisas realizadas e com grande potencial de utilização. Atualmente percebe-se a grande procura por parte dos criadores em empresas que utilizam estes marcadores moleculares com auxílio na seleção genética do seu rebanho. Isso ocorre, principalmente, devido a maior precisão na determinação de características de interesse zootécnico a partir da análise do genoma dos animais, utilizando técnicas moleculares de alta tecnologia. Dessa forma, este trabalho fornece informações relevantes para pesquisadores e também criadores que tenham interesse em selecionar um programa de melhoramento genético que utilize novas tecnologias a favor do seu rebanho.

Palavras-chave: genômica; pecuária; melhoramento genético; dna mitocondrial; cromossomo y; marcadores autossômicos

Abstract

BILHALVA, Alexandre Ferreira. **Molecular Markers Applied to Cattle Breeding**. 2014. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso, – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Genomics applied to cattle breeding emerges as a potential tool to be used by creators in order to maintain a high genetic pattern on its herd. With the search intensified for greater animal productivity in an ever smaller area, molecular markers emerge as a great tool to support. Also, the ability to select, with greater assurance, animals with characteristics of financial interest, has raised the curiosity of these ranchers. This study aims to demonstrate the key genomic tools being applied in the creation and selection of the cattle and have the greatest potential for use. For better development of the topics covered, the work was divided into three main categories: autosomal markers, Y-chromosomal markers and mitochondrial DNA markers, allowing a broad view of the main research projects with great potential for utilization. Currently we see a great demand from breeders to companies that use these molecular markers to aid in genetic selection of their herd. This occurs, primarily, due to greater accuracy in determining the characteristics of zootechnical interest from the analysis of the genome of the animals, using molecular techniques of high technology. Thus, this paper provides relevant information to researchers and breeders who have an interest in select breeding programs that use new technologies for the benefit of their herd.

Key-words: genomics; livestock; genetic improvement; mitochondrial dna; y chromosome; autosomal markers

Lista de Figuras

- Figura 1 Esquema ilustrativo da técnica molecular de PCR-AFLP 15
(Polymerase Chain Reaction - Amplified Fragment Length Polymorphism). Enzimas de restrição MseI (Micrococcus species I) e EcoRI (Escherichia coli R) clivando o DNA em locais específicos e posterior ligação de adaptadores específicos a essas regiões. Setas azuis indicam o local da clivagem
- Figura 2 Princípio da técnica de RFLP. Em (A) a clivagem do DNA foi 17
realizada, a enzima de restrição reconheceu seu sitio específico, isso resultou em dois fragmentos na análise. Em (B) não há o sitio de ligação específico para a enzima, portanto, não haverá clivagem do DNA, assim havendo apenas um fragmento
- Figura 3 Exemplo de diferentes alelos de microssatélites. No primeiro alelo 19
há 15 repetições CA; no segundo alelo há 17 repetições CA; e no 3º alelo há 18 repetições CA. Essas variações poderão ser detectadas através da realização de uma análise de PCR e posterior verificação em gel de agarose
- Figura 4 Fenômeno de duplicação cromossômica gerando uma variação 21
no número de cópias de segmentos genômicos
- Figura 5 Cariótipo bovino onde está demonstrado as regiões c CNVs. As 23
setas verdes se referem a ganho de material genético, as vermelhas demonstram perda de material genético

- Figura 6 Distribuição genômica dos CNVs. As setas localizadas na parte 24
esquerda dos cromossomos representam CNVs com um maior
número de cópias (ganhos de CNVs) no genoma sequenciado do
touro Holstein. As setas localizadas na parte direita dos
cromossomos demonstram CNVs com um maior número de
cópias (ganhos de CNVs) no genoma seqüenciado do touro da
raça Black Angus.
- Figura 7 Exemplo de alteração causada por um SNP. Enquanto que no 27
primeiro indivíduo, em uma dada região genômica, temos o
nucleotídeo adenina pareado com uma timina, enquanto que no
segundo indivíduo, na mesma região genômica, temos o
nucleotídeo guanina pareado com uma citosina
- Figura 8 BovineSNP50 Genotyping BeadChip, possui capacidade de 31
avaliação de mais de 54.000 SNPs, suporta até 24 amostras
simultâneas
- Figura 9 BovineHD Genotyping BeadChip, possui capacidade de avaliação 33
de mais de 770.000 SNPs, sendo possível analisar até 8
amostras simultaneamente
- Figura 10 Placa de análises Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate, com 34
a utilização da placa é possível a identificação de mais de 618.000
SNPs, sendo possível analisar até 96 amostras simultaneamente
- Figura 11 Apresentação de Loci de Características Quantitativas com 37
influência positiva em características zootécnicas de interesse
econômico

Figura 12 Processo de regulação gênica através do microRNA. Os 38
microRNAs podem inibir a formação de uma proteína se sua
sequência nucleotídica for complementar ao RNA mensageiro
referente a esta proteína. Não havendo complementaridade
específica entre as bases, a proteína será formada normalmente.

Figura 13 Em (A) é demonstrada a região alvo do miR-378 interagindo e 40
inibindo a expressão do gene MAPK1, portanto, induzindo
adipogênese. Em (B) está representado a possível via de
sinalização do miR-378 na adipogênese, através da regulação
gênica.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFL	Amplified Fragment Length Polymorphism
CPE	Carboxypeptidase E
CNV	Copy Number Variation
D-loop	Displacement Loop
DGAT1	Diacylglycerol Acyltransferase 1
GHR	Growth Hormone Receptor
GWAS	Genome Wide Association Study
ISAG	International Society for Animal Genetics
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MT2A	Methallothionein IIa
miR	microRNA
mtDNA	DNA mitocondrial
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ
PGC-1 β	Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator 1 Beta
QTL	Quantitative Trait Loci
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIM1	Single-minded Homolog 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UCP2	Uncoupling Protein 2

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Objetivo	13
2	Revisão de Literatura	14
2.1	Marcadores Autossômicos	14
2.1.1	Marcadores Polimórficos Identificados por AFLP	15
2.1.2	Marcadores Polimórficos Amplificados por RFLP	16
2.1.3	Microssatélites	19
2.1.4	Variação no Número de Cópias de Segmentos Genômicos	21
2.1.5	Polimorfismos de Nucleotídeo Único	26
2.1.5.1	Plataformas de Genotipagem de SNPs	30
2.1.6	Loci de Características Quantitativas	35
2.1.7	MicroRNA	38
2.2	Marcadores do cromossomo Y	42
2.3	DNA Mitocondrial	43
3	Perspectivas na Área	45
4	Conclusão e Considerações Finais	46
5	Referências	47

1 Introdução

A domesticação animal foi um fator essencial no desenvolvimento cultural e demográfico humano. Durante a história e o desenvolvimento dos rebanhos bovinos houve diversas forças evolucionárias de mutação, cruzamentos seletivos, adaptação, isolamento e deriva genética, esses fenômenos se somaram resultando em uma grande diversidade de populações (GROENEVELD et al, 2010).

O Brasil é o principal exportador de carne bovina mundial, dono do 2º maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2014), além de ser um dos principais países consumidores da carne, com um consumo médio de 37kg por habitante, por ano (MAPA, 2014). Quantidade esta muito superior a média de consumo reportada em países da União Europeia, de 16kg por habitante (HOCQUETTE; CHATELLIER, 2011). Esses dados demonstram a importância que foi, e ainda é dada, a criação e seleção na bovinocultura. O entendimento das origens das raças e espécies bovinas também é de extrema importância no estudo e análise da hereditariedade de características de interesse.

Diversos programas de cruzamentos seletivos estão sendo desenvolvidos para que se perpetuem características de interesse zootécnico em bovinos, como a qualidade da carne, eficiência reprodutiva, produção leiteira, peso, entre outros (NIETO; MARTINS, 2003). Esses programas foram determinantes na geração de raças que perpetuaram essas características zootécnicas bem definidas, de acordo com as necessidades do criador.

Embora as técnicas de melhoramento através de cruzamentos direcionados sejam muito importantes na seleção de características de interesse, esse sistema vem sendo substituído por novos métodos envolvendo a biologia molecular, como a utilização de marcadores moleculares para características específicas (LENSTRA et al, 2012). Como definição, marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a *locus* que determinam características de interesse (ALZATE-MARIN et al, 2005)

O sequenciamento do genoma bovino, realizado em 2009 pelo Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium foi de extrema importância para que houvesse a impulsão das pesquisas que visam melhorar a qualidade de seleção e produção destes animais (ELSIK et al, 2009). Pois com as informações geradas foi possível entender com mais discernimento a composição genômica desses animais, bem como alterações genéticas entre espécies e raças, estas variações são de extrema importância na maioria dos estudos com utilização de marcadores moleculares para identificar características de interesse.

Atualmente o maior foco das pesquisas é na elucidação de *loci* que possuem marcadores que podem estar envolvidos em variações fenotípicas de interesse e com essas pesquisas desenvolver melhores técnicas de seleção e criação nas principais raças bovinas de produção. Estudos de associação ampla do genoma trazem a todo o momento novas informações genéticas que podem ser associadas a características fenotípicas de interesse da bovinocultura, como a maior produtividade em alimentos (SNELLING et al, 2010; BOLORMAA et al, 2011). Sendo reportadas algumas principais categorias de marcadores moleculares, como: marcadores autossômicos, marcadores ligados ao cromossomo Y, mtDNA (DNA mitocondrial) (LENSTRA et al, 2012), e microRNAs. Cada tipo de marcador pode ser associado com um diferente tipo de análise, dependendo do objetivo.

1.1 Objetivo

Este trabalho de conclusão de curso tem como objetivo revisar as principais ferramentas moleculares utilizadas na genotipagem bovina, as maiores inovações na área da genômica e especular as perspectivas futuras no uso destas tecnologias na bovinocultura. Durante o desenvolvimento do trabalho, diversos estudos foram selecionados em diferentes linhas de conhecimento, como: biotecnologia, pecuária, zootecnia e genômica, conferindo um perfil multidisciplinar e explorando as possibilidades de entendimento e aplicação do trabalho.

2 Revisão de Literatura

Marcadores moleculares são ferramentas de extrema importância no direcionamento genético para melhor produção e seleção. Com a descrição das enzimas de restrição, por Alber, Smith e Nathans em 1970, foi possível desenvolver técnicas onde é possível diferir indivíduos a partir de características genéticas específicas. Já em 1997, os marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) foram descritos por P. Ajmone-Marsan, para genotipagem em bovinos, descoberta muito importante em análises de paternidade e relações entre espécies.

Uma das vantagens da utilização destes marcadores em relação à seleção clássica é poder identificar regiões no DNA que estão associados a uma determinada característica, ao passo que a seleção clássica tem como base a seleção somente através de características fenotípicas (MOHAN et al, 1997). E também devido ao fato de não haver a necessidade de esperar o animal a expressar seu fenótipo, possibilitando a seleção, portanto, de terneiros e embriões, conseqüentemente diminuindo o intervalo entre gerações, o que acelera o ganho genético. Dentre esses marcadores os mais utilizados são: Marcadores Autossômicos, Marcadores Ligados ao Cromossomo Y e o mtDNA. Estes serão descritos nos tópicos a seguir.

2.1 Marcadores Autossômicos

Marcadores autossômicos são variações no DNA genômico, ou seja, alterações presente no DNA de cromossomos autossômicos, que podem ser associadas a determinadas características. Existem diversos tipos de marcadores que podem ser utilizados para diferentes análises genômicas, a seguir serão listados os mais utilizados e com as maiores perspectivas de uso na bovinocultura.

2.1.1 Marcadores Polimórficos Identificados por AFLP

Os Marcadores Polimórficos Amplificados por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) são ferramentas biotecnológicas que facilitam a análise de variações no genoma (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009). A técnica de AFLP se baseia na digestão de regiões do DNA utilizando enzimas de restrição específicas, seguida pela ligação de adaptadores sintéticos específicos a essas regiões, e então realização da reação de PCR (VOS et al, 1995). A figura 1 demonstra o esquema de AFLP:

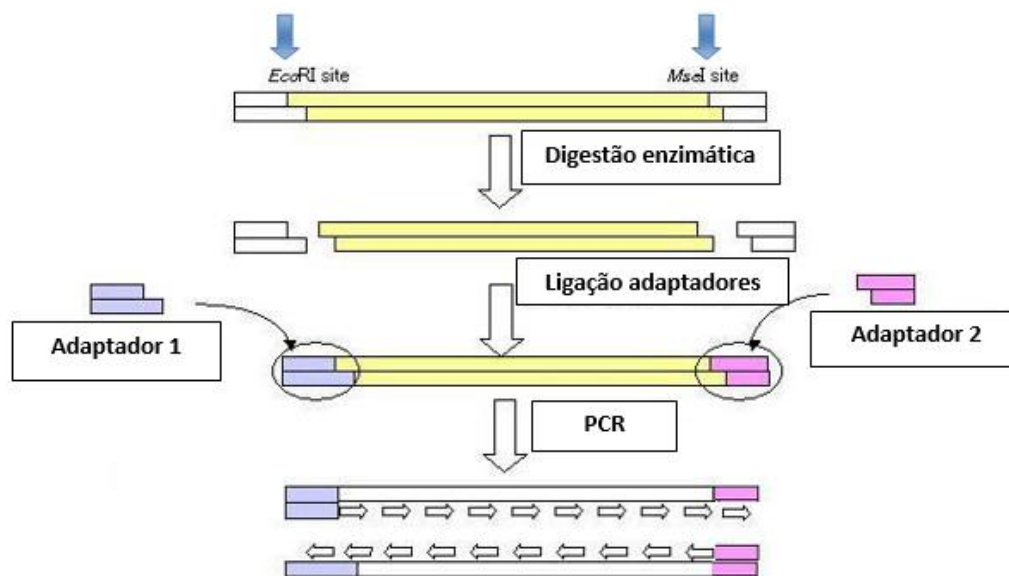


Figura 1 – Esquema ilustrativo da técnica molecular de PCR-AFLP (*Polymerase Chain Reaction - Amplified Fragment Length Polymorphism*). Enzimas de restrição *MseI* (*Micrococcus species I*) e *EcoRI* (*Escherichia coli R*) clivando o DNA em locais específicos e posterior ligação de adaptadores específicos a essas regiões. Setas azuis indicam o local da clivagem.

Os marcadores AFLP são bialélicos e dominantes, fornecendo uma forma simples de avaliação de variações no genoma sem que haja o conhecimento prévio deste (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009). Em bovinos, a maioria dos estudos se concentra na área de filogenia e diversidade de espécies e raças.

Em um estudo de Buntjer e colaboradores (2002) foi utilizada a técnica de AFLP para detectar variações no genoma de diversas raças, entre espécies diferentes de bovinos: *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos banteng*, *Bos gaurus*, *Bison bison*, *Bison bonasus*, *Syncerus caffer*, *Bubalus bubalis*, *Taurotragus eurycerus*. Com as informações obtidas destas análises foi possível gerar uma árvore filogenética onde foram demonstradas as similaridades entre espécies, regiões comuns de origem, proximidade genética e ancestralidade.

Em estudo de Negrini e colaboradores (2007) utilizando os marcadores AFLP, foi realizada a diferenciação genética do gado europeu de diversas raças, e foi possível não só caracterizar o padrão genético destes animais, mas também verificar a distância genética entre as raças e rastrear a origem de seus ancestrais. Isso é importante para detectar regiões gênicas que possam ter sido conservadas entre espécies distintas e se alguma dessas regiões estão associadas a características de interesse produtivo.

A técnica de AFLP demonstra ser útil em análises e estudos, porém possui algumas desvantagens como: dificuldades na detecção de variabilidade dentro de uma raça devido ao modo dominante de hereditariedade e também há problemas em relação à homoplasia de fragmentos. A homoplasia se refere à *loci* diferentes com fragmentos de DNA de igual tamanho que contribuirão para a mesma banda, isso pode atrapalhar a análise de resultados, se não for corrigido (VEKEMANS et al, 2002).

2.1.2 Marcadores Polimórficos Identificados por RFLP

Os Marcadores Polimórficos Amplificados por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) são diferenças em sequências homólogas do DNA que podem ser detectadas pela presença de fragmentos de diferentes tamanhos após a digestão do DNA em questão, com enzimas de restrição. A figura 2 demonstra a técnica de RFLP.

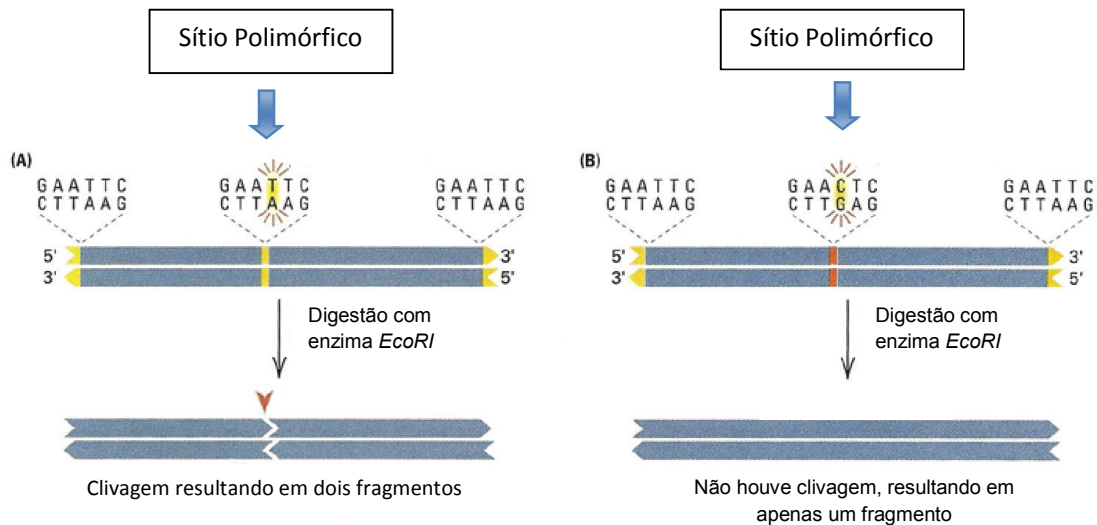


Figura 2 – Princípio da técnica de RFLP. Em (A) a clivagem do DNA foi realizada, a enzima de restrição reconheceu seu sítio específico, isso resultou em dois fragmentos na análise. Em (B) não há o sítio de ligação específico para a enzima, portanto, não haverá clivagem do DNA, assim havendo apenas um fragmento.

Fonte: adaptado de <http://www.discoveryandinnovation.com>

As principais formas de utilização dos marcadores RFLP são em análises de variação (genotipagem, forense, teste de paternidade, diagnóstico de doenças hereditárias, etc.) (NCBI). Diversos estudos já foram realizados utilizando esses marcadores, em vários tipos de pesquisas de grande interesse pecuário.

Em estudo realizado por Sabour e colaboradores (1997) através da técnica de RFLP, o DNA de 100 touros da raça Holstein foi analisado para estimar a frequência alélica de variantes genéticas do hormônio de crescimento (GH) a fim de avaliar a influência paterna na produção leiteira, e características de composição do leite (proteína e gordura). Esse trabalho foi muito importante para identificar genótipos que

favorecessem uma melhor produção, e com essa identificação diminuir a necessidade de administrações deste hormônio na forma recombinante.

A técnica de RFLP também já foi utilizada para identificar variações genéticas em diversas moléculas e proteínas importantes tanto metabolismo animal, quanto na produção, como: GH, receptor de lipoproteína de baixa densidade, subunidade alfa de hormônios glicoproteicos e no *loci* da tiroglobulina. A análise e constatação de variações nas regiões do DNA correspondente a essas moléculas, foi feita por Hilbert et al (1989), na raça Belgian Blue e foi de extrema importância para revelar novos marcadores para seleção de características de interesse.

Através dos marcadores RFLP também já foi possível a identificação de haplotipos do gene *Wnt7a*, este gene regula uma grande variedade de células e vias de desenvolvimento que diretamente influenciam o crescimento pré-natal do trato reprodutivo da fêmea e na manutenção correta da função uterina nos adultos (MILLER; SASSOON, 1998). Os haplotipos foram identificados por Xue e colaboradores (2013), em 448 fêmeas bovinas da raça chinesa Quinchuan. O estudo gerou novas opções de seleção genética dos haplotipos que possuem maior associação com características de crescimento nos animais.

O PCR-RFLP, por ser uma técnica que detecta polimorfismos no DNA, através da utilização de enzimas de restrição, também já foi utilizado para determinação do sexo através do gene da amelogenina, que é muito expressa em dentes durante seu desenvolvimento (Ennis; Gallagher, 1994). A utilização deste método de detecção se baseia na diferença de tamanho de fragmentos, gerados pela digestão utilizando enzimas de restrição como, por exemplo, a enzima *EcoRI* (*Escherichia coli* R), e também utilizando a enzima *DraI* (*Deinococcus radiophilus*) da amelogenina nos cromossomos X e Y. No cromossomo Y são gerados dois fragmentos, um de 280 pares de bases (pb) e outro de 217 pb, quando utilizado a enzima *DraI*, enquanto que no cromossomo feminino apenas um fragmento de 280 é gerado, quando utilizado a enzima *EcoRI* (Ennis; Gallagher, 1994).

Esta técnica já foi utilizada também para caracterizar geneticamente o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) bovina, em 179 animais de duas raças latinoamericanas: 113 animais eram da raça Bolivian Yacumeño e 66 animais eram da raça Colombian Hartón Del Valle. Este trabalho, realizado por Giovambattista

Os marcadores microssatélites são os mais utilizados em análises de diversidade genética bovina e em relações de paternidade (CARNEIRO et al, 2007). Para análises de paternidade o ISAG (*International Society for Animal Genetics*) preconiza a utilização de 12-14 microssatélites, entre eles existem 9 que são definidos pelo próprio ISAG e são reconhecidos como o “conjunto de marcadores internacionais”: BM1824, BM2113, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ETH10, ETH225. Estes microssatélites foram escolhidos pelo fato de que são bastante polimórficos e cada microssatélite selecionado pode possuir diversos alelos, facilitando assim a comparação e diferenciação entre indivíduos. Os microssatélites adicionais (três a cinco) necessários para a análise ficarão a cargo de cada laboratório.

Existem diversos estudos de caracterização molecular utilizando esses marcadores. Em 2007, Carneiro e colaboradores, realizaram um estudo de diversidade genética em animais da raça Nelore no Brasil, utilizando um painel de 11 microssatélites. Os marcadores apresentaram um alto número de polimorfismos, com média de 8,2 alelos por *locus*. Tambasco e colaboradores (2000) também identificaram uma heterozigidade observada menor do que a esperada quando realizaram estudo similar com animais da raça Nelore.

Esses resultados indicam que houve e ainda há um processo intensificado de seleção genética através de cruzamentos seletivos de animais. Isso acaba gerando o “efeito de gargalo” na população, diminuindo drasticamente a variabilidade genética na raça. Fator que futuramente pode atrapalhar o melhoramento animal em vista da baixa diversidade genotípica atual (HUNDERTMARK; VAN DAELE, 2010).

Um estudo de variabilidade genética também foi realizado por Vasconcellos e colaboradores (2003), onde se desejava caracterizar molecularmente a raça Aberdeen Angus, para isso foram utilizados marcadores microssatélites e marcadores RFLP. Nesse estudo foi constatado que o padrão genético da raça foi mantido na região, quando comparado com outras raças de diferentes localidades geográficas, principalmente devido ao modo de cruzamento fechado. Isso nos traz informações muito relevantes no entendimento da conservação genética de algumas espécies, bem como o método de cruzamento na manutenção desse padrão genético.

Os microssatélites ainda hoje são extremamente utilizados em uma grande variedade de experimentos, como também em testes laboratoriais de rotina. A confiabilidade desta ferramenta genômica, bem como seu custo relativamente baixo, permitiu a ampliação de sua utilização, fornecendo uma alternativa de grande interesse ao criador que deseja registrar e ter o controle do genótipo dos animais do seu rebanho.

2.1.4 Variação no Número de Cópias de Segmentos Genômicos

A variação no número de cópias de segmentos genômicos, do inglês *copy number variation (CNV)*, é descrita como um segmento de DNA, maior ou igual a uma quilobase (kb) que tem um número de cópias variável no genoma, quando comparado com um genoma de referência (FREUK; CARSON; SCHERER, 2006). A Imagem 4 a seguir demonstra uma duplicação genômica, gerando assim uma CNV:

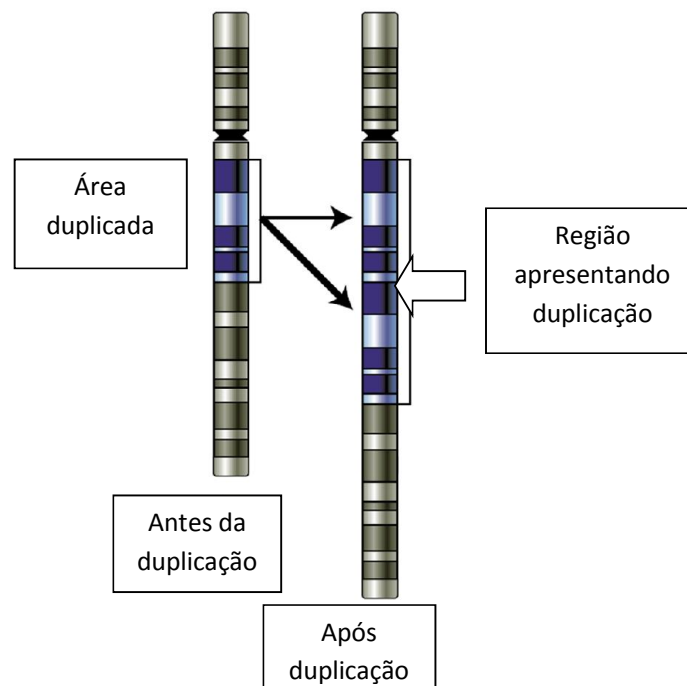


Figura 4 – Fenômeno de duplicação cromossômica gerando uma variação no número de cópias de segmentos genômicos.

Fonte: adaptado de <http://www.genome.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/duplication>

As CNVs já foram descritas ao longo de todos os cromossomos do genoma bovino (LIU GE et al, 2010) e como será demonstrado, algumas regiões destes marcadores também já foram estudadas. Em um trabalho desenvolvido por Fadista e colaboradores (2010) ele avaliou 304 regiões onde CNVs já foram descritos e para isso ele utilizou animais de diversas raças (14 Holsteins, 2 RedDanish, 3 Simmental e 1 Hereford). A análise gerou um painel cromossômico, onde estão demonstradas as principais regiões cromossômicas, demonstrando perda ou ganho de material genético, conforme apresentado na figura 5. O mesmo estudo demonstrou que a maioria dos CNVs possui tamanho de 10-50 kb, e poucos demonstram tamanho maior que uma megabase (mb).

Este trabalho foi de importância principalmente para estudos posteriores que visam entender quais as implicações dessas alterações genéticas. Quais seriam as características fenotípicas de animais que apresentam essas variações (duplicações, deleções, translocações e inversões)? Alguns estudos estão sendo realizados para associar essas características ao fenótipo.

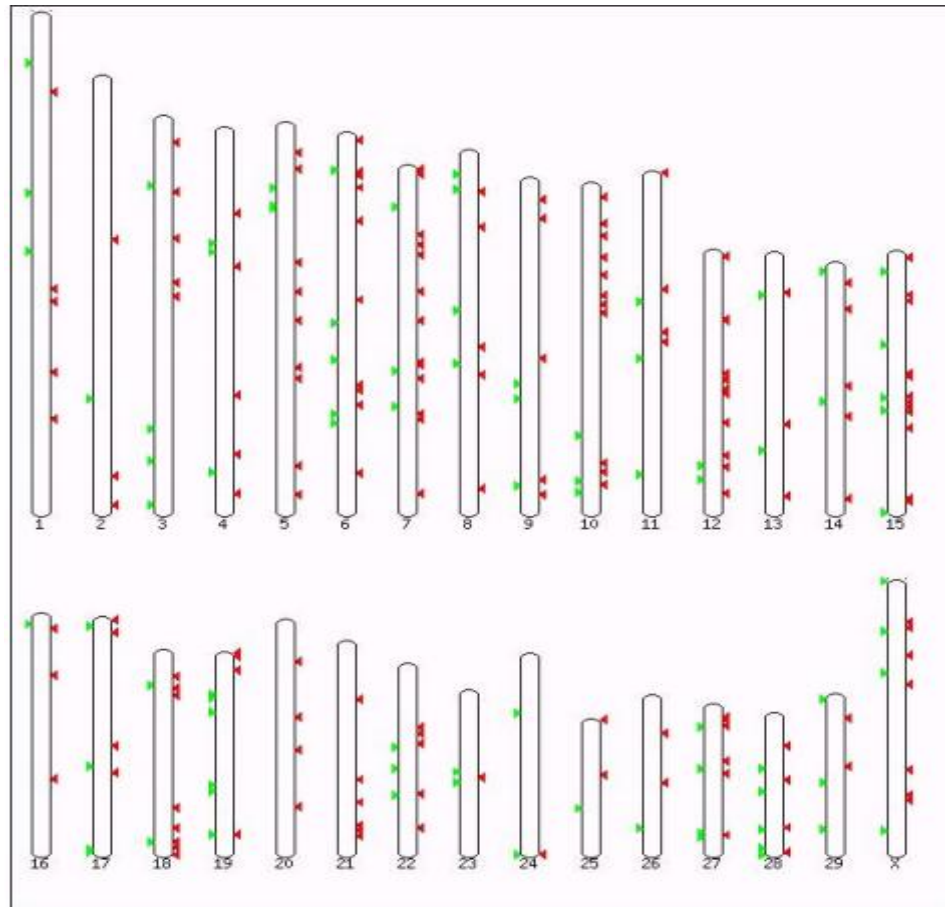


Figura 5 – Cariótipo bovino onde está demonstrado as regiões com CNVs. As setas verdes se referem a ganho de material genético, as vermelhas demonstram perda de material genético.

Fonte: Fadista et al, 2010.

Para tentar identificar uma maior quantidade de CNVs, Stothard e colaboradores (2011) sequenciaram dois animais, um touro da raça Black Angus e outro da raça Holstein. Este estudo, através do sequenciamento destes animais e detecção destes CNVs, conforme apresentado na figura 6, demonstrou que as regiões onde houve essas variações estão intimamente associadas com genes que regulam o sistema imune e outros que contribuem na capacidade de lactação de vacas. Além dessas associações de extrema importância na criação e seleção bovina foi possível, através deste estudo, associar essas regiões onde existem CNVs a diversas outras características importantes como a locomoção, processo de desenvolvimento, processos metabólicos, entre outros.

Estas informações contribuem para que estudos posteriores sejam realizados onde se avalie, de forma mais específica, quais destes CNVs vão alterar fenotipicamente esses animais, quais seriam importantes marcadores de genótipos superiores nos animais, e quais seriam associados a características negativas.

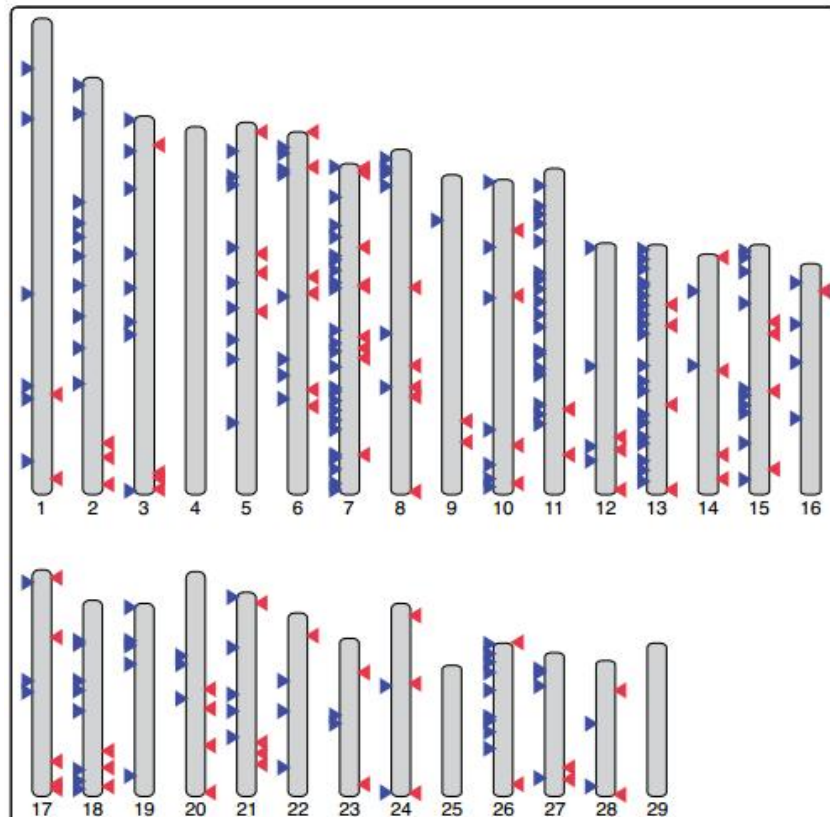


Figura 6 – Distribuição genômica dos CNVs. As setas localizadas na parte esquerda dos cromossomos representam CNVs com um maior número de cópias (ganhos de CNVs) no genoma sequenciado do touro Holstein. As setas localizadas na parte direita dos cromossomos demonstram CNVs com um maior número de cópias (ganhos de CNVs) no genoma sequenciado do touro da raça Black Angus.

Fonte: Stothard et al, 2011

Para demonstrar a grande importância dos CNVs na genômica bovina Hou e colaboradores (2012) realizaram um estudo onde o objetivo era identificar regiões no genoma onde houvesse CNVs e associar esses marcadores a suscetibilidade ou resistência a infecções por nematódeos gastrointestinais. Os pesquisadores realizaram uma análise de CNVs, em larga escala, em 472 animais da raça Angus. A

pesquisa demonstrou que dos CNVs analisados, 297 se encontravam em genes associados com o sistema imune e conferiam resistência a parasitas, um destes genes era o WC1 que é expresso nas células T bovinas. Em contraste, outros 282 CNVs foram associados com suscetibilidade a infecções por nematódeos, e se encontravam em genes associados com resposta inflamatória, ciclo celular, organização celular entre outros. A pesquisa revelou que essas variações genéticas podem influenciar de modo significativo as características metabólicas do animal, como o sistema imunológico, demonstrando que os CNVs também podem ser de grande utilidade ao criador que deseja selecionar animais mais resistentes a infecções e outras enfermidades.

Também já foi identificado regiões no genoma bovino que possuem CNVs que influenciam a produção leiteira em vacas da raça Holstein. Na pesquisa realizada por Xu e colaboradores (2014), um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) em 26.362 animais da raça Holstein foi realizado visando identificar CNVs que influenciavam características no leite como a quantidade gordura e proteína. Foram identificados 34 CNVs em 22 cromossomos que eram significativamente associados com uma das características de interesse (gordura ou proteína).

Essas informações são de muito interesse, principalmente na seleção e manutenção de animais de grande nível produtivo e de melhor qualidade nutricional deste alimento. Os CNVs, aliados a outras ferramentas moleculares são de grande importância na análise genotípica de características de importância na bovinocultura, por isso, sua utilização na melhoria da seleção bovina deve ser considerada.

2.1.5 Polimorfismo de Nucleotídeo único

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são mutações pontuais no genoma, predominantemente bialélicos e extremamente abundantes ao longo do genoma (TORO; FERNÁNDEZ; CABALLERO, 2009). Esses marcadores estão sendo extensamente utilizados na comunidade acadêmica, para pesquisas, e melhoramento bovino, pelos criadores (G. REN et al, 2010; HAYES; LEWIN; GODDAR, 2013).

Os SNPs podem se localizar em regiões de DNA não codificantes, ou seja, regiões não gênicas, portanto, teoricamente, não irão alterar nenhuma função biológica. Entretanto, SNPs localizados em regiões de DNA codificante, podem muitas vezes causar uma variação nesse gene e afetar a sua função (RAMENSKY; BORK; SUNYAEV, 2002). Os SNPs podem ser classificados em mutações de transição, ou seja, mutação de uma purina para outra purina, ou de uma pirimidina para outra pirimidina, estes marcadores também podem ser classificados como mutação de transversão, ou seja, uma purina para pirimidina, ou pirimidina por uma purina (CHENG et al, 2004). Estas modificações podem ser não-codificantes, ou seja, não se encontram em regiões que codificam para uma proteína, ou codificantes, que se encontram em regiões que codificam para uma proteína (KUMAR et al, 2009). Ainda em relação à classificação das mutações destes SNPs, estas podem ser chamadas de mutações sinônimas ou não sinônimas. As mutações sinônimas se localizam em regiões codificadoras no DNA, entretanto não alteram a sequência de aminoácidos da proteína. Já as mutações não sinônimas se localizam em regiões codificadoras no DNA e alteram a sequência de aminoácidos da proteína (RAMENSKY; BORK; SUNYAEV, 2002). A figura 7 a seguir, demonstra um exemplo de alteração nucleotídica gerada por um SNP:

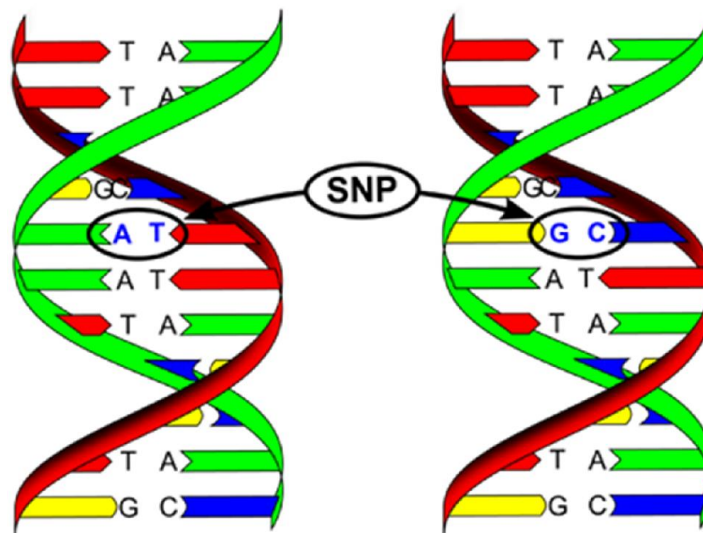


Figura 7 – Exemplo de alteração causada por um SNP. Enquanto que no primeiro indivíduo, em uma dada região genômica, temos o nucleotídeo adenina pareado com uma timina, enquanto que no segundo indivíduo, na mesma região genômica, temos o nucleotídeo guanina pareado com uma citosina.

Fonte: <http://www.viagenefertility.com/Available-PGD-Technologies.php>

O sequenciamento do genoma bovino realizado pelo, *Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*, liderado por Gibbs e colaboradores (2009), alavancou as pesquisas e identificação em SNPs. Com essas informações, mais de 2 milhões de SNPs (BovineGenome.org) já foram descritos na espécie bovina, algo que vem encorajando diversos estudos na área.

Existem diversas possibilidades de estudos genéticos utilizando SNPs, desde estudos de variações gênicas que afetam características de interesse, a análises de parentesco e atribuição de indivíduos a determinadas raças.

Em 2009, Gibbs e colaboradores realizaram uma análise demonstrando que raças taurinas possuem uma menor diversidade de SNPs no genoma quando comparado com raças zebuínas, isso, sugere que na região da Índia houve um grande local de domesticação bovina, e de grande diversidade na pré-domesticação. Também foi demonstrado que nas últimas décadas houve uma diminuição na diversidade devido a seleção de animais que vem sendo realizada.

Negrini e colaboradores (2008) analisaram 90 SNPs para relacionar 24 animais a suas raças de origem. As análises obtiveram 96% de sucesso na associação dos animais a raça, demonstrando que essas ferramentas moleculares são de muita utilidade nesse tipo de detecção, podendo futuramente substituir os microssatélites que são os mais utilizados atualmente. É necessário, porém, selecionar SNPs com uma grande capacidade de diferenciação entre espécies e raças bovinas e que sejam validados corretamente.

Existem SNPs que também foram associados em características de muito interesse zootécnico, como o comprimento e peso da carcaça. Esse trabalho foi realizado por G. Ren e colaboradores (2010), 822 animais de raças chinesas de corte foram analisados e foi revelado que um SNP (G>A) presente no gene LHX4 que regula outros genes envolvidos no crescimento, reprodução, sistema endócrino entre outros. Esse SNP conferia um maior peso aos animais, ao nascimento e após 24 meses de idade. Esses dados indicam que futuramente esse SNP, se comprovado para outras raças, pode ser de grande valia na seleção genética de animais para um melhor peso e tamanho da carcaça, agregando um maior valor a esses animais (G. REN et al, 2010).

Na mesma linha de pesquisa, outros estudos também foram realizados envolvendo SNPs em genes candidatos para qualidade da carne e da carcaça. O estudo realizado por Haegeman e colaboradores (2003) em animais das raças Red Holstein, Red Pied, Montbe´liard, Charolais, Piedmonte, Belgian Blue, Blonde d’Aquitaine revelaram 13 SNPs em 4 genes diferentes: *carboxypeptidase E (CPE)* – gene associado a características da carcaça; *uncoupling protein 2 (UCP2)* – gene envolvido na homeostase energética; *single-minded (Drosophila) homolog 1 (SIM1)* – gene envolvido em características da carcaça; *methallothionein Ila (MT2A)* – envolvidos em características da carcaça.

Estudos em relação a características qualitativas da carne são bastante explorados utilizando SNPs, como o trabalho realizado em raças de gado coreano realizado por Shin e Chung (2007), visavam associar SNPs no gene da tiroglobulina a qualidades na carne e na carcaça. Esse gene foi escolhido devido ao papel da tiroglobulina no metabolismo. Essa proteína serve de depósito para os hormônios da tireóide T3 e T4, esses hormônios afetam diretamente o crescimento da célula adiposa

e sua diferenciação (SHIN; CHUNG, 2007). Variantes deste gene também já foram associados ao escore de marmoreio da carne, (BARENDSE, 2001) demonstrando o grande potencial deste marcador no mercado da carne.

A análise de Shin e Chung demonstrou que o SNP C422T estava associado positivamente com o escore de marmoreio da carne. Animais que possuíam o genótipo CC e CT tinham o escore de marmoreio maior que animais com genótipo TT. O trabalho gerou informações extremamente úteis que podem ser implementadas na análise genômica de animais de corte. Determinar a influência de SNPs no fenótipo dos animais é o principal objetivo no cenário de pesquisa atual.

Na produção de leite existem características nutricionais de extrema importância como a produção proteica e de gordura. Essas características são de extremo interesse ao criador, principalmente pelo fato de que a indústria paga mais por alimentos com melhor conteúdo nutricional, e onde o rendimento final é maior, portanto, animais estão sendo selecionados para que produzam alimentos nutricionalmente mais ricos.

Nesse contexto um trabalho realizado por Weikard e colaboradores (2005) visava caracterizar molecularmente o gene *peroxysome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α* (PPARGC1A), e associando SNPs nesse gene a variações na síntese de gordura. O gene PPARGC1A possui um papel crucial em diversos sistemas do metabolismo, gordura, energia e coordena diversos outros processos intrínsecos do organismo (WEIKARD et al 2005). No trabalho, 60 animais de raças diversas tiveram seu gene PPARGC1A sequenciado, e um SNP (T>C) no íntron 9 deste gene foi associado a indivíduos que produziam leite com um nível de gordura significativamente aumentado, quando comparado com outros genótipos analisados.

É impossível negar que os SNPs são os marcadores moleculares que mais se destacam em relação às pesquisas realizadas e também com o potencial de sua utilização. Como foi visto, a alteração de apenas um nucleotídeo pode alterar desde a característica qualitativa na carne, leite, por exemplo, como também pode alterar totalmente o metabolismo do animal, acarretando diversos problemas a este. É de extrema importância que criadores de bovinos que desejam um alto padrão genético ao seu plantel, recorram a tecnologias atuais de genotipagem utilizando os SNPs, como será comentado a seguir.

2.1.5.1 Plataformas de Genotipagem de SNPs

BovineSNP50 Genotyping BeadChip

Desenvolvido pela Illumina, empresa norte americana sediada em San Diego, Califórnia, em colaboração com o USDA ARS (*United States Department of Agriculture Agricultural Research Service*), Universidade de Missouri e a Universidade de Alberta, o desenvolvimento do *BovineSNP50 Genotyping BeadChip* foi uma revolução tecnológica na genômica bovina.

O *beadchip* permite identificar mais de 54.000 SNPs existentes ao longo do genoma bovino de diversas raças (Angus, Beefmaster, Bos indicus Gir, Bos indicus Nelore, Brahman, Brown Swiss, Charolais, Guernsey, Hereford, Holstein, Jersey, Limousin, N'Dama, Norwegian Red, Piedmontese, Red Angus, Romagnola, Santa Gertrudis e Sheko), alavancando os estudos de associação ampla do genoma, identificação de genótipos de interesse e estudos genéticos de comparação.

Os marcadores são derivados de fontes públicas de pesquisa como o genoma de referência bovina, *Illumina's Genome Analyzer*, *Btau assembly SNPs* e o *Bovine HapMap Consortium*. O *beadchip* cobre os principais SNPs validados para importantes raças de gado de corte e leiteiro. A realização do teste não utiliza a reação de PCR e minimiza a manipulação do pesquisador, diminuindo erros de técnica. É possível analisar até 24 amostras ao mesmo tempo.

Com a utilização dessa nova tecnologia diversas pesquisas já foram realizadas, e então foi possível a associação destes SNPs e outros a características de interesse ao criador e com a possibilidade de novas associações. A grande dificuldade atual é acesso à utilização dessas novas tecnologias por parte de todos os produtores, pois ainda é algo inviável financeiramente por boa parte destes. Outro fator importante que dificulta a utilização dessa ferramenta de seleção, é que muitos produtores possuem certa resistência à utilização dessa nova tecnologia, não a julgando tão importantes por ser um investimento relativamente alto e que não trariam os resultados prontamente ao criador.

Embora haja essa resistência por parte de alguns criadores, a grande tendência atualmente é a criação de empresas que realizem essas análises e que esclareçam ao produtor a grande utilidade deste método de seleção para geração de animais com características produtivas de interesse financeiro. A figura 8 demonstra o BovineSNP50 Genotyping BeadChip:



Figura 8 - BovineSNP50 Genotyping BeadChip, possui capacidade de avaliação de mais de 54.000 SNPs, suporta até 24 amostras simultâneas.

Fonte: <http://www.illumina.com>

BovineHD Genotyping BeadChip

A última geração em análise de alta densidade de SNPs é o *BovineHD Genotyping BeadChip*, da empresa Illumina, com a incrível possibilidade de análise de mais de 770.000 SNPs validados, extremamente útil para estudos de associação, comparação genômica, avaliação de mérito genético e caracterização da raça para avaliação da biodiversidade.

O *beadchip* foi desenvolvido em uma parceria da empresa Illumina com grandes líderes em pesquisa pecuária como o USDA ARS (*United States Department*

of Agriculture Agricultural Research Service), UNCEIA – INRA (*l'Union Nationale des Coopératives agricoles d'Élevage et d'Insémination Animale, Institute for Agricultural Research*) Pfizer Animal Genetics e a Universidade de Missouri.

Além de todos os SNPs detectados com a utilização do chip é possível detectar e mensurar CNVs no genoma avaliado. O método de utilização do chip é similar ao BovineSNP50 Genotyping BeadChip, não sendo necessário a utilização de PCR, diminuindo erros de manipulação. A plataforma permite analisar até 8 amostras ao mesmo tempo.

Como no BovineSNP50, o BovineHD Genotyping BeadChip possui SNPs validados para características de importância no gado de corte e leiteiro. O chip cobre todo o genoma autossômico, mitocondrial e nos cromossomos sexuais além de detectar CNVs. Na figura 9 está demonstrado o BovineHD Genotyping BeadChip.

Uma maior quantidade de raças foi utilizada para desenvolver o chip, quando comparado com o BovineSNP50. As raças utilizadas eram das espécies *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, e raças híbridas. As raças utilizadas para gerar o chip foram: Angus, Blonde d'Aquitaine, Brown Swiss, Charolais, Guernsey, Hereford, Holstein, Jersey, Lagunaire, Limousin, Montbeliard, N'Dama, Normande, Norwegian Red, Piedmontese, Red Angus, Romagnola, Senepol, Simmental, Wagyu, Brahman, Gir, Nelore, Beefmaster, Brangus, Santa Gertrudis e Sheko.



Figura 9 - BovineHD Genotyping BeadChip, possui capacidade de avaliação de mais de 770.000 SNPs, sendo possível analisar até 8 amostras simultaneamente.

Fonte: <http://www.illumina.com>

Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate

O Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate, da empresa norte americana Affymetrix, sediada em Santa Clara, Califórnia, é outra opção que pesquisadores possuem em análises e pesquisas genômicas bovinas. A placa de análises foi desenvolvida com a junção de SNPs oriundos do *Bovine HapMap* consortium e do *Affymetrix Bovine Consortium*, resultando em mais de 648.000, sendo 618.345 SNPs validados.

No desenvolvimento da ferramenta foram avaliados animais das espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, das raças: Holstein, Angus, Nelore, Jersey, Fleckvieh, Hereford, Limousin, Romagnola, Brahman, Gir. Com essas informações os SNPs validados para importantes características do gado leiteiro e de corte foram selecionados. Em uma mesma reação é possível analisar até 96 amostras ao mesmo tempo. A reação se baseia na ligação de sondas específicas a regiões do DNA onde existem SNPs, essas ligações serão detectadas durante a análise. Após isso esse padrão de ligações poderá ser avaliado em um *software*, para definir e associar algumas características

ao animal. A figura 10 demonstra a placa de análises Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate.



Figura 10 – Placa de análises Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array Plate, com a utilização da placa é possível a identificação de mais de 618.000 SNPs, sendo possível analisar até 96 amostras simultaneamente.

Fonte: <http://www.affymetrix.com>

As plataformas apresentadas só trazem benefícios na formação de um rebanho de alta genética. Atualmente, estas plataformas de genotipagem são utilizadas em programas de melhoramento genético altamente tecnificados que visam selecionar animais através de SNPs específicos, que conferem características de interesse ao criador.

Estas tecnologias ainda não são tão exploradas por criadores menores, principalmente devido ao custo, limitando o acesso a estes pecuaristas. Isto se deve ao fato de que são necessários aparelhos (*scanners*) de alto custo que façam a “leitura” e análise destes *chips* e placas e, portanto, aumentam o preço do serviço fornecido pelas empresas que realizam estes testes. Entretanto, com o desenvolvimento de um maior número destas plataformas e empresas que realizem este tipo de serviço, a tendência é que o preço diminua cada vez mais, facilitando o acesso à utilização destas ferramentas para criadores.

2.1.6 Loci de Características Quantitativas

Loci de Características Quantitativas, do inglês *Quantitative Trait Loci (QTL)*, são ferramentas extensamente utilizadas na genômica bovina. Os QTLs são locais nos cromossomos que afetam a expressão de uma determinada característica. Quanto maiores os efeitos do QTL sobre uma característica no tamanho da população maior sua herdabilidade. E quanto mais próximo o marcador estiver do QTL, mais fácil será a sua detecção (KEARSEY, 1998).

Em relação aos QTLs diversos estudos já foram realizados particularmente relacionados à produção e composição do leite, alguns falam sobre o crescimento e composição da carcaça em gado de corte, reprodução e também saúde do animal (BLOTT et al, 2003; KIM et al, 2003; GRISART et al 2002).

Em um estudo realizado por Grisart e colaboradores (2002) o genótipo de mais de 2000 animais da raça Holstein-Friesian foi analisado e identificado uma mutação no gene *acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1)* que gera uma modificação (lisina -> alanina) na proteína e está envolvido na lactação e síntese dos triglicerídeos do leite. Os haplótipos mutados (K232A) de alguma forma ainda não elucidada, carregam QTLs que aumentam a produção de gordura no leite, favorecendo a composição leiteira do animal.

Outro trabalho, realizado por Ashwell e colaboradores (2004) tinha como objetivo identificar QTLs que afetavam características da produção leiteira. Na realização do estudo, o sêmen de 1415 touros da raça Holstein foi analisado, e foram identificados variações nos cromossomos 14, 3, 6 e 20. No cromossomo 14, foi identificado um QTL associado a uma mutação no gene *DGAT1* envolvido na síntese de triglicerídeos. No cromossomo 20 também foi identificado QTL associado a uma mutação no gene *Growth Hormone Receptor (GHR)* que está envolvido na produção proteica no leite (BLOTT et al, 2003). O estudo também demonstrou que variações nos cromossomos 3 e 6 também estão envolvidos na produção de gordura e proteína embora ainda não se saiba como eles afetam essas características.

Estes 2 estudos (BLOTT et al, 2003; ASHWELL et al, 2004) demonstram a importância dos QTLs na identificação de genes que influenciam características que tem grande impacto financeiro, como a produção e composição leiteira.

Em relação a características da carcaça alguns estudos também já foram realizados trazendo informações de extrema importância aos pesquisadores e criadores. Um estudo realizado por Casas e colaboradores (2003), visava identificar QTLs que estivessem associados a características da carcaça como o crescimento e composição dessas. O desenvolvimento do estudo se deu a partir da análise da progênie (n = 547) um touro híbrido (Brahman x Hereford) que foi cruzado com vacas da espécie *Bos taurus*, de diversas raças.

Além das análises genéticas da progênie, foram avaliadas características de peso da carcaça, escore de marmoreio, tamanho da carcaça, espessura da gordura na carcaça entre outras características. Casas e colaboradores identificaram QTLs significativos para as características de peso ao nascimento, comprimento da carcaça no cromossomo 5, no cromossomo 6 também houve QTL associados ao comprimento da carcaça, no cromossomo 9 houve QTL associados ao rendimento total de produção animal, no cromossomo 21 houve QTL associado ao peso ao nascimento dos animais, e no cromossomo 23 foram identificados QTLs associados ao escore de marmoreio da carne. Casas e colaboradores concluíram que houve QTLs associados significativamente, com características da carcaça, nos cromossomos 5, 6, 9, 21 e 23. Estas informações são de extrema importância na incorporação dessas informações em programas de melhoramento voltados para o gado de corte, onde se visa máxima produtividade, qualidade da carne e rendimento total da carcaça.

Também em relação a características da carcaça, Kim e colaboradores (2003) visavam identificar QTLs, em 602 animais de raças híbridas (Angus x Brahman). Um QTL foi associado com maior peso ao sobreano, no cromossomo 1. No cromossomo 2, quatro QTLs foram identificados e estavam associados ao crescimento do animal e no cromossomo 6 havia um QTL associado com peso ao nascimento. Kim e colaboradores também identificaram QTLs nos cromossomos 5 e 23, e estavam associados ao peso ao sobreano e ao peso de carcaça quente, respectivamente. A figura 11 demonstra os principais QTLs apresentados, as características que podem influenciar e os autores que os descreveram.

Localização	Característica afetada	Referência
Cromossomo 1	Peso ao sobreano (+)	Kim et al, 2003
Cromossomo 2	Crescimento animal (+)	Kim et al, 2003
Cromossomo 3	Proteínas do leite (+) Gorduras do leite (+)	Ashwell et al, 2004
Cromossomo 5	Peso ao nascimento (+) Comprimento da carcaça (+)	Casas et al, 2003
Cromossomo 6	Proteínas do leite (+) Gorduras do leite (+) Peso da carcaça (+)	Ashwell et al, 2004 Casas et al, 2003
Cromossomo 14	Gorduras do leite (+)	Grisart et al, 2001; Ashwell et al, 2004
Cromossomo 21	Peso ao nascimento (+)	Casas et al, 2003
Cromossomo 23	Pontuação de Marmoreio da carne (+)	Casas et al, 2003

Figura 11 - Apresentação de Loci de Características Quantitativas com influência positiva em características zootécnicas de interesse econômico

Estes trabalhos demonstram a grande importância na utilização de QTLs como marcadores genéticos que podem ser implementados em programas modernos de melhoramento e seleção animal. Entretanto, é necessária a realização de estudos para que se saiba de forma clara suas influências no organismo, e possíveis QTLs que afetem características de alto impacto comercial e que possam ser utilizados para a seleção de uma grande variedade de raças.

2.1.7 MicroRNA

Os MicroRNAs são pequenas moléculas (18 ~ 25 nucleotídeos) regulatórias, não codificantes, envolvidas em muitos processos biológicos incluindo o desenvolvimento, diferenciação celular, apoptose e metabolismo (ALVAREZ-GARCIA; MISKA, 2005). Em mamíferos, os microRNAs (miR) maduros interagem, na maioria das vezes, com a região 3' não traduzida do RNA mensageiro (mRNA) modulando assim sua expressão (Ambros V, 2001). Essa interação se dá em uma forma imprecisa de complementaridade aos mRNAs alvos e então inibem a síntese proteica (Ambros V, 2004).

A figura 11 demonstra o processo de regulação gênica através da inibição da síntese protéica pelo miR.

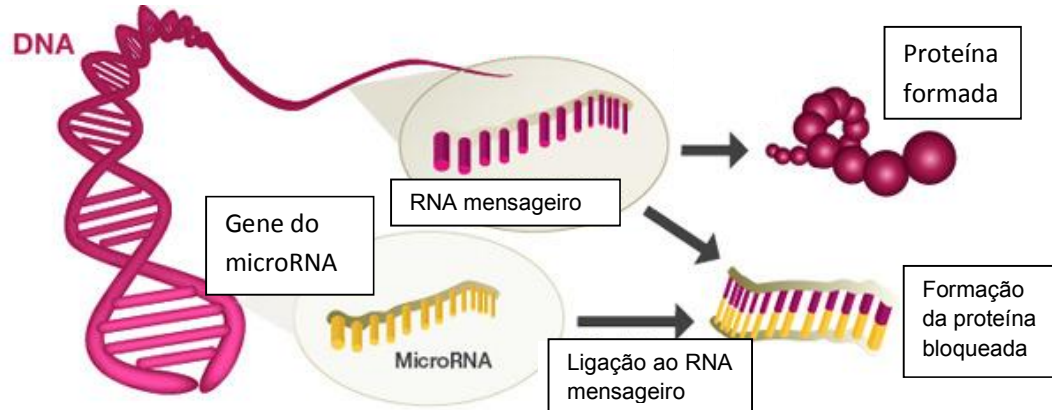


Figura 12 – Processo de regulação gênica através do microRNA. Os microRNAs podem inibir a formação de uma proteína se sua sequência nucleotídica for complementar ao RNA mensageiro referente a esta proteína. Não havendo complementaridade específica entre as bases, a proteína será formada normalmente.

Fonte: adaptado de <http://www.longevinex.com/>

Em bovinos alguns estudos em microRNAs já foram relatados principalmente em relação a modulação do desenvolvimento do tecido adiposo e a deposição lipídica

na carcaça. Em 2010, Jin e colaboradores, desenvolveram um estudo que visava identificar microRNAs que poderiam contribuir no desenvolvimento do tecido adiposo em novilhos. Para isso foi analisado o padrão de expressão de 89 miRs, incluindo quatro miRs específicos dos tecidos adiposos subcutâneos, de três grupos de animais híbridos que possuíam diferentes espessuras de gordura no dorso. O primeiro grupo era de animais resultantes do cruzamento entre Hereford x Aberdeen Angus (HEAN), o segundo grupo Charolais x Red Angus (CHAR), e o terceiro Charolais x Maine Anjou (CHAM). Dentre os 89 miRs analisados, 42 diferiam entre os grupos de forma significativa e 15 miRs eram expressos diferencialmente entre os tecidos com maior e menor gordura dorsal. O microRNA que foi expresso de forma mais diferenciada e mais associado com o ganho de gordura dorsal foi o miR-378.

Esse microRNA está localizado no intron 1 do gene *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta* (PGC-1 β). A expressão deste gene já foi descrita durante a diferenciação dos adipócitos marrons (LIN J et al, 2002), também já foi descrito como indutor da lipogênese e do transporte lipoproteico no fígado (WOLFRUM, STOFFEL, 2006), o que indica que a expressão deste gene, em conjunto com o miR-378, possam estar de alguma forma regulando a deposição subcutânea de gordura.

No mesmo estudo de Jin, foi identificado a possível interação deste microRNA com 816 genes, e um destes que atraiu bastante a atenção dos pesquisadores, foi o gene *mitogen-activated protein kinase 1* (MAPK1). Esse gene pode mediar a fosforilação do gene do fator de transcrição *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), envolvido no metabolismo de lipídios, e reduzir a sua atividade transcricional (HU et al, 1996).

Portanto, especula-se que o miR-378 possa promover a adipogênese no tecido adiposo branco através da regulação dos genes MAPK1 e PPAR γ . A figura 12 demonstra a possível interação miR-378 e MAPK1, e a via de regulação do miR-378 na adipogênese.

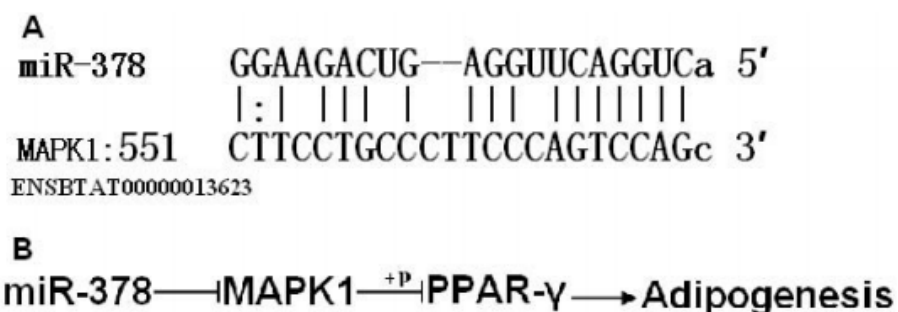


Figura 13 – Em (A) é demonstrada a região alvo do miR-378 interagindo e inibindo a expressão do gene MAPK1, portanto, induzindo adipogênese. Em (B) está representado a possível via de sinalização do miR-378 na adipogênese, através da regulação gênica.

Fonte : Jin et al, 2010.

Como foi visto, o miR-378 também pode ter associação a muitos outros genes, e essa interação pode ser de extrema importância em relação ao desenvolvimento do tecido adiposo em bovinos e a deposição de gordura na carcaça.

Um estudo realizado por Coutinho e colaboradores (2007), foi realizado um perfil de microRNAs expressos em tecidos imune-relacionados de embriões bovinos com 30 dias, e em outros tecidos de animais com 8 meses. O trabalho gerou um painel com diversos microRNAs que foram comparados com o padrão de expressão em outras espécies, como humanos. A análise do estudo demonstrou que alguns microRNAs são expressos em tecidos específicos, enquanto que, existem outros que possuem um padrão de expressão em todos os tecidos de modo igualitário. Estas informações sugerem que essas moléculas possuem um grande potencial de regulação dependendo da região no organismo (COUTINHO, et al 2007).

Os microRNAs também já foram utilizados para desenvolver animais com características nutricionais de interesse para alguns tipos de consumidores. Como por exemplo, em um estudo realizado por Javed e colaboradores (2012) se visava desenvolver uma vaca leiteira que produzisse leite com o nível de β -lactoglobulina mais baixo possível, esta molécula é um dos principais alérgenos no leite bovino e causa problemas gastrointestinais a milhares de consumidores no mundo.

Os pesquisadores primeiramente transfectaram fibroblastos bovinos através de uma construção gênica contendo diversos miRNAs. Dois clones foram selecionados, após a realização de um cariótipo dessas células, e foi constatado que o número de cromossomos estava normal. As construções com miRNAs foram detectadas nesses clones através da técnica de *Southern Blot*. Após várias transferências nucleares e abortos, uma vaca obteve sucesso na gestação e foi gerada então uma bezerra. Após a indução da lactação no animal, foi realizada uma análise de eletroforese em gel SDS para avaliação dos níveis de β -lactoglobulina. E foi constatado que não havia níveis detectáveis de β -lactoglobulina no leite do animal, garantindo o sucesso do trabalho (JABED et al, 2012)

Esta pesquisa demonstra o grande potencial que essa ferramenta possui para a geração de animais que tenham características de interesse tanto ao criador quanto as pessoas que irão consumir os seus produtos. As técnicas estão cada vez mais sendo aperfeiçoadas para que seja alcançada uma eficiência satisfatória tanto na implementação destas, quanto na possibilidade econômica de utilização, para geração de um plantel bovino superior. Os microRNAs são marcadores relativamente novos, que estão surgindo para somar as condições atuais de genotipagem. As possibilidades de estudos utilizando estes marcadores são diversas, a identificação destas moléculas é imprescindível no entendimento da regulação gênica nos bovinos, e na influência fenotípica que os microRNAs terão no animal.

2.2 Marcadores do cromossomo Y

Em mamíferos existem variações no cromossomo Y que podem ser utilizadas para estudos onde será feito o rastreio da origem e linhagem paterna (LENSTRA et al, 2012). Em comparação com o DNA autossômico o material genético do cromossomo Y possui uma maior quantidade de *motifs* de repetição, que são sequências curtas e recorrentes de DNA, que se presume ter uma função biológica (HELLBORG; ELLEGREN, 2004). O DNA do cromossomo Y também possui um baixo nível polimórfico (BRANDLI et al, 2005). Estes fatores são problemas que têm dificultado a utilização destes marcadores em análises genotípicas.

Edwards e colaboradores (2011) avaliaram 2038 animais de 138 raças europeias, e identificaram uma variação em relação aos haplótipos dos animais e suas regiões geográficas de origem. Enquanto que Ginja, Da Gama e Penedo (2009) avaliaram animais de raças portuguesas nativas, de raças exóticas de Portugal e da raça Brahman, foram testados quanto a SNPs no cromossomo Y, a fim de determinar um padrão miscigenação entre essas e raças estrangeiras. E a partir destas análises foi possível identificar a influência do gado africano em oito raças nativas portuguesas. Também foi identificada uma grande variação genética entre as raças.

Através destes relatos percebe-se o quão importante são as análises do cromossomo Y, possibilitando a realização de estudos que relacionam espécies, origens geográficas e parentesco. Isso devido principalmente ao baixo nível polimórfico do material genético deste cromossomo, portanto, pequenas alterações no DNA presente em raças de uma determinada região podem ser analisadas e comparadas com animais de locais, raças e espécies distintas e verificar as variações que aconteceram no material genético destes animais.

2.3 DNA Mitochondrial

As mitocôndrias são o centro da produção de energia dentro da célula, elas possuem um material genético específico, o chamado DNA mitocondrial (mtDNA). Em mamíferos, normalmente as mitocôndrias são exclusivamente herdadas da mãe, embora já tenha sido descrita transmissão paterna destas organelas (BROMHAM et al, 2003) e são excelentes ferramentas de estudos de ancestralidade através das fêmeas (IBORRA; KIMURA; COOK, 2004).

Existem diversas possibilidades de utilização do mtDNA em estudos, as principais utilizadas no contexto da genômica bovina são: estudos de ancestralidade de espécie, locais de domesticação, origem materna, variação da população entre continentes (LENSTRA et al, 2012).

A maioria dos estudos envolvendo o DNA mitocondrial está concentrada na região bastante polimórfica do *displacement loop* (D-loop) no material genético da organela. Ainda não se sabe ao certo a função desta região na mitocôndria, porém, devido à variação genética deste segmento, ela é bastante analisada em estudos de ancestralidade e evolução de espécies (ACHILLI et al, 2008).

Em um estudo realizado por Troy e colaboradores (2001), foi analisado o mtDNA de raças europeias bovinas e foi constatado que as origens da maioria destas raças provem de regiões do oriente próximo. Em outro estudo realizado por Loftus e colaboradores (1994), foi feita uma análise do mtDNA da raça de Zebu Africana e foi detectado mtDNA de raças taurinas, indicando que após a importação de rebanhos zebuínos para a Europa, houve o cruzamento entre essas espécies, afetando o padrão das características de raças bovinas.

O mtDNA também já foi utilizado como marcador de características da carcaça. Mannen e colaboradores (1998) analisaram a região D-loop de animais da raça Japanese Black, e foi constatado que variações nessa região do mtDNA afetavam características como: peso da carcaça, espessura da costela, espessura da gordura subcutânea e pontuação de marmoreio da carne. O trabalho demonstrou que essa ferramenta tem um grande potencial de utilização, pois as características da carne são de extrema importância tanto para o criador quanto para o consumidor. A carne

certificada com um “registro genômico de qualidade” terá um maior valor agregado e a garantia da manutenção destas características de interesse.

O mtDNA, portanto, é uma ferramenta que futuramente será mais extensamente utilizada entre os pesquisadores e empresas de melhoramento genético tendo em vista o grande potencial de utilização. Porém, ainda é necessário que se realizem estudos onde se possa associar, de modo mais concreto, variações nesse material genético a características que irão impactar a seleção e valor associado ao animal.

3 Perspectivas na Área

A pecuária mundial vem crescendo exponencialmente, novos mercados, animais superiores e novas tecnologias precisam ser desenvolvidas. As tendências mundiais demonstram que é necessário aumentar a produtividade utilizando uma menor área de criação, neste contexto a genômica se destaca como uma ferramenta de grande utilidade para seleção e melhoramento deste genótipo de elite.

Os aumentos observados na utilização de novas biotecnologias na seleção destes animais somente geram benefícios ao plantel do criador, como diminuição de custos, identificação de animais mais resistentes, melhor eficiência reprodutiva, melhor ganho de carcaça, melhor qualidade nutricional agregada a carne e ao leite, por exemplo. Estes fatores tem encorajado uma grande variedade de pecuaristas a investirem nesse setor.

Em relação ao Brasil, tudo aponta para uma crescente utilização da genômica, principalmente para que mantenhamos a liderança na exportação de carne bovina mundial. Eficiência e produtividade são as palavras chave quando a pecuária está sendo debatida, por isso, não podemos deixar de ampliar os investimentos na área e também na capacitação de mão de obra para que se possa utilizar essa tecnologia e aplicá-la ao campo.

4 Conclusão e Considerações Finais

É notável a existência de tecnologias genômicas desenvolvidas a favor dos bovinos, porém o acesso de criadores brasileiros, principalmente, é prejudicado pela falta de estabelecimentos especializados que utilizem técnicas biotecnológicas a um custo razoável, em favor do produtor.

As ferramentas moleculares devem ser implementadas para otimização do plantel animal, portanto devemos encorajar o criador a não limitar sua seleção genética a partir de métodos clássicos, mas sim utilizar programas de melhoramento que una o “velho” com o “novo”, sempre buscando o melhor padrão.

Por fim, nunca podemos deixar de buscar novos conhecimentos na área, pois pesquisas estão em andamento e futuramente podem vir a auxiliar na criação, reprodução e manutenção de uma qualidade genética superior destes animais.

5 Referências

ACHILLI, Alessandro; OLIVIERI, Anna; PELLECCIA, Marco; UBOLDI, Cristina; COLLI, Licia; AL-ZAHERY, Nadia; ACCETTURO, Matteo; PALA, Maria, KASHANI, Baharak Hooshiar; PEREGO, Ugo A. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. **Current Biology**, v. 18, n. 4, p. R157-R158. 2008.

ALVAREZ-GARCIA; INES; MISKA, ERIC A. MicroRNA functions in animal development and human disease. **Development**, v. 132, n. 21, p. 4653-4662. 2005.

ALZATE-MARIN; ANA LILIA, CERVIGNI, GERARDO DL, MOREIRA, MAURILIO A.; BARROS, Everaldo G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342. 2005

AMBROS, Victor. microRNAs: tiny regulators with great potential. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 823-826. 2001.

AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355. 2004.

ASHWELL, M. S; HEYEN, D. W; SONSTEGARD, T. S; VAN TASSELL, C. P. DA, Y; VANRADEN, P. M., RON, M; WELLER, J. I; LEWIN, H. A. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 2, p. 468-475. 2004.

BLOTT, Sarah; KIM, Jong Joo; MOISIO, Sirja; SCHMIDT-KÜNTZEL; ANNE, Cornet; ANNE, Berzi; PAULETTE, Cambisano; NADINE, Ford; CHRISTINE, Grisart; BERNARD; JOHNSON, Dave. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 253-266. 2003.

BOLORMAA, Sunduimijid; HAYES, B. J; SAVIN, Keith; HAWKEN, Rachel; BARENDSE, W; ARTHUR, P. F; HERD, R. M; GODDARD, M. E. Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 6, p. 1684-1697. 2011.

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

BRÄNDLI, Laura; HANDLEY, Lori-Jayne, Lawson; VOGEL, Peter; PERRIN, Nicolas. Evolutionary history of the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) inferred from analysis of mtDNA, Y, and X chromosome markers. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 3, p. 832-844. 2005.

BROMHAM, Lindell; EYRE-WALKER, Adam; SMITH, Noel H; SMITH Maynard, John. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondria in humans. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 1, p. 2-4. 2003.

BUNTJER, J. B; OTSEN, M; NIJMAN; I. J; KUIPER, M. T. R; LENSTRA, J. A. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. **Heredity**, v. 88, n. 1, p. 46-51. 2002.

Carneiro, T. X; Gonçalves, E. C; Schneider, M. P. C; Silva, A. Genetic diversity and efficiency of DNA microsatellites for genealogic control in Nelore breed. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1257-1262. 2007.

CASAS, Eduardo; SHACKELFORD, S. D; KEELE, J. W; KOOHMARAIE, Mohammad; SMITH, T. P. L; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 2976-2983. 2003.

CHENG, Ting Cai; XIA, Qing You; QIAN, Ji Feng; LIU, Chun; LIN, Ying; ZHA, Xing Fu; XIANG, Zhong Huai. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm, *Bombyx mori*, inbred strain *Dazao*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 6, p. 523-530. 2004.

COUTINHO, Luiz L; MATUKUMALLI, Lakshmi K; SONSTEGARD, Tad S; VAN TASSELL, Curtis P; GASBARRE, Louis C; CAPUCO, Anthony V; SMITH, Timothy PL. Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. **Physiological Genomics**, v. 29, n. 1, p. 35-43. 2007.

EDWARDS, Ceiridwen J; GINJA, Catarina; KANTANEN, Juha; PÉREZ-PARDAL, Lucía; TRESSET, Anne; STOCK, Frauke; GAMA, Luis; T PENEDO, M. Cecilia; BRADLEY, Daniel G; LENSTRA, Johannes A. Dual origins of dairy cattle farming: evidence from a comprehensive survey of European Y-chromosomal variation. **PLoS one**, v. 6, n. 1, p. e15922. 2011.

ELSIK, Christine G; TELLAM, Ross L; WORLEY, Kim C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522-528. 2009.

ENNIS, S; GALLAGHER, T. F. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetics**, v. 25, n. 6, p. 425-427. 1994.

FADISTA, João; THOMSEN, Bo; HOLM, Lars Erik; BENDIXEN, Christian. Copy number variation in the bovine genome. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 284. 2010.

FEUK, Lars; CARSON, Andrew R; SCHERER, Stephen W. Structural variation in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 2, p. 85-97. 2006.

GARZA, J. C; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 305-318. 2001.

GINJA, Catarina; DA GAMA, Luís Telo; PENEDO, Maria Cecilia. Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 2, p. 148-157. 2009.

GIOVAMBATTISTA, Guillermo; TAKESHIMA, Shin nosuke; RIPOLI, Maria Veronica; MATSUMOTO, Yuki; FRANCO, Luz Angela Alvarez; SAITO, Hideki, Onuma; MISAO; AIDA, Yoko. Characterization of bovine MHC *DRB3* diversity in LATIN American Creole cattle breeds. **Gene**, v. 519, n. 1, p. 150-158. 2013.

GRISART, Bernard; COPPIETERS, Wouter; FARNIR, Frédéric; KARIM, Latifa; FORD, Christine; BERZI, Paulette; CAMBISANO, Nadine; MNI, Myriam; REID, Suzanne; SIMON, Patricia. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome research**, v. 12, n. 2, p. 222-231. 2002.

GROENEVELD, L. F., LENSTRA, J. A., EDING, H., TORO, M. A., SCHERF, B., PILLING, D., NEGRINI, R., FINLAY, E. K., JIANLIN, H., AND GROENEVELD, E. Genetic diversity in farm animals - a review. **Animal Genetics**, v. 41, n. s1, p. 6-31. 2010.

HAEGEMAN, A., WILLIAMS, J. L., LAW, A., VAN ZEVEREN, ALEX, AND PEELMAN, L. J. Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. **Animal Genetics**, v. 34, n. 5, p. 349-353. 2003.

HAYES, Ben J; LEWIN, Harris A; GODDARD, Michael E. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 206-214. 2013.

HELLBORG, Linda; ELLEGREN, Hans. Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 158-163. 2004.

HILBERT, P; MARCOTTE, Anne; SCHWERS, A; HANSET, R; VASSART, Gilbert; GEORGES, Michel. Analysis of genetic variation in the Belgian Blue Cattle breed using DNA sequence polymorphism at the growth hormone, low density lipoprotein receptor, α -subunit of glycoprotein hormones and thyroglobulin loci. **Animal Genetics**, v. 20, n. s1, p. 383-394. 1989.

HOCQUETTE, Jean François; CHATELLIER, Vincent. Prospects for the European beef sector over the next 30 years. **Animal Frontiers**, v. 1, n. 2, p. 20-28. 2011.

HOU, Yali; LIU, George E; BICKHART, Derek M; MATUKUMALLI, Lakshmi K; LI, Congjun; SONG, Jiuzhou; GASBARRE, Louis C; VAN TASSELL, Curtis P; SONSTEGARD, Tad S. Genomic regions showing copy number variations associate with resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes in Angus cattle. **Functional & integrative genomics**, v. 12, n. 1, p. 81-92. 2012.

HU, Erding; KIM, Jae Bum; SARRAF, Pasha; SPIEGELMAN, Bruce M. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2100-2103. 1996.

HUNDERTMARK, Kris J; VAN DAELE, Larry J. Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. **Conservation genetics**, v. 11, n. 1, p. 139-147. 2010.

IBORRA, Francisco J; KIMURA, Hiroshi; COOK, Peter R. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. **BMC biology**, v. 2, n. 1, p. 9. 2004.

JABED, Anower; WAGNER, Stefan; MCCRACKEN, Judi; WELLS, David N; LAIBLE, Goetz. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 16811-16816. 2012.

JIN, Weiwu; DODSON, Michael V; MOORE, Stephen S; BASARAB, John A. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. **BMC molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 29. 2010.

KEARSEY, M. J; FARQUHAR, A. G. L. QTL analysis in plants; where are we now? **Heredity**, v. 80, n. 2, p. 137-142. 1998.

KIM, J. J; FARNIR, F; SAVELL, J; TAYLOR, J. F. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 8, p. 1933-1942. 2003.

KUMAR, Prateek; HENIKOFF, Steven; NG, Pauline C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073-1081. 2009.

LENSTRA, J. A., GROENEVELD, L. F; EDING, H; KANTANEN, JUHA, WILLIAMS, J. L; TABERLET, P; NICOLAZZI, E. L; SÖLKNER, J; SIMIANER, H., AND CIANI, E. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. **Animal Genetics**, v. 43, n. 5, p. 483-502. 2012.

LIN, Ji; ARNOLD, Heather B; DELLA-FERA, Mary Anne; AZAIN, Michael J; HARTZELL, Diane L; BAILE, Clifton A. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 291, n. 3, p. 701-706. 2002.

LIU, George E; HOU, Yali; ZHU, Bin; CARDONE, Maria Francesca; JIANG, Lu; CELLAMARE, Angelo; MITRA, Apratim; ALEXANDER, Leeson J; COUTINHO, Luiz L; DELL'AQUILA, Maria Elena. Analysis of copy number variations among diverse cattle breeds. **Genome research**, v. 20, n. 5, p. 693-703. 2010.

LOFTUS, R. T., MAC HUGH, D. E., NGERE, L. O., BALAIN, D. S., BADI, A. M., BRADLEY, D. G., AND CUNNINGHAM, E. P. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. **Animal Genetics**, v. 25, n. 4, p. 265-271. 1994.

MANNEN, H; TSUJI, S; LOFTUS, R. T; BRADLEY, D. G. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (*Bos taurus*). **Genetics**, v. 150, n. 3, p. 1169-1175. 1998.

Marbling Symposium 2001, Coffs Harbour, 2001 p.52

MILLER, Cary; SASSOON, David A. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. **Development**, v. 125, n. 16, p. 3201-3211. 1998.

MOHAN, Madan; NAIR, Suresh; BHAGWAT, A; KRISHNA, T. G; YANO, Masahiro; BHATIA, C. R; SASAKI, Takuji. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular breeding**, v. 3, n. 2, p. 87-103. 1997.

NEGRINI, R; NIJMAN, I. J; MILANESI, E; MOAZAMI-GOUDARZI, K., WILLIAMS, J. L; ERHARDT, G; DUNNER, S; RODELLAR, C; VALENTINI, A; BRADLEY, D. G. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 60-66. 2007.

NEGRINI, R. I. C. C; NICOLOSO, L. E. T. I; CREPALDI, P. A. O. L; MILANESI, E. L. I. S; COLLI, L. I. C. I; CHEGDANI, F. A. T. I; PARISSET, L; DUNNER, S; LEVEZIEL, H; WILLIAMS, J. L. Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. **Animal Genetics**, v. 40, n. 1, p. 18-26. 2009.

NIETO, Leonardo Martin; MARTINS, Elias Nunes. Fatores genéticos que influenciam a qualidade da carne bovina - revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** v. 6, n. 1, p. 77-84. 2003.

RAMENSKY, Vasily; BORK, Peer; SUNYAEV, Shamil. Human non-synonymous SNPs: server and survey. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 17, p. 3894-3900. 2002.

REN, G; CHEN, H; ZHANG, L. Z; LAN, X. Y; WEI, T. B; LI, M. J; JING, Y. J; LEI, C. Z; WANG, J. Q. A coding SNP of LHX4 gene is associated with body weight and body length in bovine. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 1, p. 417-422. 2010.

SABOUR, M. P; LIN, C. Y; SMITH, C. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 114, n. 1, p. 435-442. 1997.

SNELLING, W. M; ALLAN, M. F; KEELE, J. W; KUEHN, L. A; MCDANELD, Tara; SMITH, T. P. L; SONSTEGARD, T. S; THALLMAN, R. M; BENNETT, G. L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 837-848. 2010.

SHIN, S. C; CHUNG, E. R. Association of SNP marker in the leptin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. **ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES**, v. 20, n. 1, p. 1. 2007.

STOTHARD, Paul; CHOI, Jung Woo; BASU, Urmila; SUMNER-THOMSON, Jennifer M; MENG, Yan; LIAO, Xiaoping; MOORE, Stephen S. Whole genome resequencing of black Angus and Holstein cattle for SNP and CNV discovery. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 559. 2011.

TAMBASCO, Daniella Debenedetti; ALENCAR, Maurício Mello de; COUTINHO, Luiz Lehmann; TAMBASCO, Antonio Junqueira; TAMBASCO, Marina Debenedetti; REGITANO, Luciana Correia de Almeida. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1044-1049. 2000.

TORO, Miguel A; FERNÁNDEZ, Jesús; CABALLERO, Armando. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 174-195. 2009.

TROY, Christopher S; MACHUGH, David E; BAILEY, Jillian F; MAGEE, David A; LOFTUS, Ronan T; CUNNINGHAM, Patrick; CHAMBERLAIN, Andrew T; SYKES, Bryan C; BRADLEY, Daniel G. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1088-1091. 2001.

VASCONCELLOS, Luciana Pimentel de Mello Klocker; TAMBASCO-TALHARI, Daniella; PEREIRA, Andréa Pozzi; COUTINHO, Luiz Lehmann; REGITANO, Luciana Correia de Almeida. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 133-137. 2003.

VEKEMANS, X; BEAUWENS, T; LEMAIRE, M; ROLDÁN-RUIZ, I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 139-151. 2002.

VOS, Pieter; HOGERS, Rene; BLEEKER, Marjo; REIJANS, Martin; VAN DE LEE, Theo; HORNES, Miranda; FRITERS, Adrie; POT, Jerina; PALEMAN, Johan; KUIPER, Martin. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414. 1995.

WEIKARD, Rosemarie; KÜHN, Christa; GOLDAMMER, Tom; FREYER, Gertraude; SCHWERIN, Manfred. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-13. 2005.

WOLFRUM, Christian; STOFFEL, Markus. Coactivation of Foxa2 through Pgc-1 β promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. **Cell metabolism**, v. 3, n. 2, p. 99-110. 2006.

XU, Lingyang; COLE, John B; BICKHART, Derek M; HOU, Yali; SONG, Jiuzhou; VANRADEN, Paul M; SONSTEGARD, Tad S; VAN TASSELL, Curtis P; LIU, George E. Genome wide CNV analysis reveals additional variants associated with milk production traits in Holsteins. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 683. 2014.