UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

POLIMORFISMOS NO GENE *TFAM* E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

Denise Rocha Ayres
Zootecnista

JABOTICABAL - SP - BRASIL
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

POLIMORFISMOS NO GENE *TFAM* E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

Denise Rocha Ayres

Orientadora: **Prof[a]. Dr[a]. Lucia Galvão de Albuquerque**
Co-Orientadora: **Dr[a]. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal

JABOTICABAL – SP
Julho de 2008

Ayres, Denise Rocha
A689e Polimorfismos no gene Tfam e características de carcaça em novilhas da raça Nelore /Denise Rocha Ayres – Jaboticabal, 2008
x, 36 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Lucia Galvão de Albuquerque
Banca examinadora: Antonio Roberto Otaviano, Humberto Tonhati
Bibliografia

1. bovinos. 2.marcadores moleculares. 3. RFLP. 4. EGS. 5. AOL.
I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082.22:636.2

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

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POLIMORFISMOS NO GENE *TFAM* E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

AUTORA: **DENISE ROCHA AYRES**

ORIENTADORA: **Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE**

Co-Orientador(a): Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

Dr. HUMBERTO TONHATI

Dr. ANTONIO ROBERTO OTAVIANO

Data da realização: 29 de julho de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. LUCIA GALVAO DE ALBUQUERQUE

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DENISE ROCHA AYRES - nascida em 10 de novembro de 1982, na cidade de Ribeirão Preto – SP, filha de José Carlos Leite Ayres e Elizabeth das Graças Rocha Ayres (*in memorian*). Iniciou em março de 2002 o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, obtendo o título de Zootecnista em julho de 2006. Em agosto de 2006 ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, obtendo o grau de mestre em 29 de julho de 2008, sob orientação da Profª. Drª. Lucia Galvão de Albuquerque.

“ Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e esquecer pessoas inesquecíveis.

Já fiz coisas por impulso, já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar, mas também decepcionei alguém.

Já abracei pra proteger, já dei risada quando não podia, fiz amigos eternos, amei e fui amado, mas também já fui rejeitado, fui amado e não amei.

Já gritei e pulei de tanta felicidade, já vivi de amor e fiz juras eternas, "quebrei a cara muitas vezes"!

Já chorei ouvindo música e vendo fotos, já liguei só para escutar uma voz, me apaixonei por um sorriso, já pensei que fosse morrer de tanta saudade e tive medo de perder alguém especial *(e acabei perdendo).*

Mas vivi, e ainda vivo! Não passo pela vida…

E você também não deveria passar!

Viva! Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é "muito" pra ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

DEDICO

A minha mãe Elisabeth (in memorian) e minha avó Lourdes (in memorian)

Meus dois grandes exemplos, que não passaram em vão, mas que deixaram muito de si. Exemplos de uma vida íntegra, de bom caráter, de delicadezas, de carinhos infinitos e de um imenso amor incondicional. O tempo passa devagar sem vocês, mas todos os dias ao acordar ainda posso senti-las ao meu lado, e assim fica muito mais fácil.

Obrigada por me ensinarem a caminhar em mais esta vida!!!

Aos melhores irmãos do mundo, André, Carla e Thiago

"Eu agora sei bem que os melhores brinquedos são os irmãos. Brinquedos vivos, que dão e recebem, que nos fazem crescer e crescem também pelas nossas mãos. Que se transformam depois em grandes amigos para toda a vida, em companhia sempre presente de uma maneira ou de outra, em refúgio e estímulo. Em algo que fica quando se perde tudo aquilo a que nos conduziu a nossa loucura, quando se perde o que o tempo nos vai levando."

(Paulo Geraldo)

OFEREÇO

Ao meu namorado To, pelo respeito, carinho, paciência, alegria e amor.

Você deixou minha vida mais leve e muito feliz. Te amo.

“Se você sabe explicar o que sente, não ama, pois o amor foge de todas as explicações possíveis.”

(Carlos Drumond de Andrade)

Aos meus sobrinhos Isis, Manuela e Gabriel

Pimpolhos que deixam meus dias ILUMINADOS.

Agradecimentos

A Deus, por me iluminar todos os dias e me dar forças suficientes para caminhar, mesmo quando isso parecia impossível.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof ª Lucia, por toda a força, conselhos e principalmente por acreditar em mim. Pelo exemplo de profissionalismo e pela delicadeza que teve comigo em todos os momentos, muito obrigada.

Ao Prof. Humberto Tonhati, pelos conselhos valiosos e principalmente pela amizade.

Ao amigo Beto, por novamente me prestigiar na finalização do meu trabalho.

A Drª Maria Eugenia, pela paciência e prontidão com que sempre me atendeu.

A minha família, em especial a tia Rita, que me apoiou a todo instante e cuidou de mim em horas tão complicadas.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, pela amizade sempre presente.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular pelas aflições divididas, pelo companheirismo e principalmente por nossas conquistas.

Aos amigos da salinha da Genética e Melhoramento Animal pelas tantas horas de trabalho e muitas risadas.

Ao Grê, pela ajuda constante e tão valiosa! Você é um amigo muito especial.

Ao amigo André (Murote) por me ajudar de todas as formas possíveis em momentos difíceis. “Amigo não tem hora pra consolar! Benditos sejam os

amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade. Porque amigo é a direção. Amigo é a base quando falta o chão! (Machado de Assis)”

A Anninha, pela amizade tão sincera, por cuidar de mim e por me emprestar seu ombro tantas vezes...” Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente! (Machado de Assis)”

Aos amigos Emanuel, Débora, Renatha, Bruna, Natália, Isabela, Márcio, Arione, Monyka, Anna, Dora e **Fabi**, irmãos de coração.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 3

3. REVISÃO DE LITERATURA 4
3.1 Características de acabamento de carcaça (deposição de gordura subcutânea e área de olho de lombo) e sua obtenção através de ultra-som.. 4
3.2 Biogênese mitocondrial e metabolismo de lipídeos 6
3.3 Gene que codifica a proteína Tfam 8

4. MATERIAL E MÉTODOS 11
4.1 Animais 11
4.2 Dados das medidas da AOI e EGS 11
4.3 Colheita das amostras 12
4.4 Análises Laboratoriais 12
4.5 Freqüências gênica e genotípica 15
4.6 Análise de associação com características de carcaça 17

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO 18

6- CONCLUSÕES 28

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29

TÍTULO: POLIMORFISMO NO GENE TFAM E CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE

RESUMO - O fator de transcrição mitocondrial A (gene *Tfam*), uma proteína fundamental para a ocorrência do processo de transcrição mitocondrial e um participante na replicação do genoma dessa organela, atua indiretamente na biogênese e oxidação de lipídeos. O objetivo do presente estudo foi de caracterizar e verificar a relação entre polimorfismos na região promotora do gene *Tfam* com características de carcaça em novilhas Nelore. Foram analisadas 272 novilhas da raça Nelore pertencentes a três rebanhos experimentais da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho – (EEZS), unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, dois deles selecionados (NeS e NeT) para peso ao ano (machos) e ao sobreano (fêmeas) e um rebanho controle (NeC), em que os animais são selecionados para a média desses pesos. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue dos animais, seguindo-se a amplificação do fragmento analisado e posterior digestão com enzimas de restrição. As medidas de gordura de cobertura foram obtidas por ultra-sonografia entre 555 e 800 dias de idade. Pela análise de PCR-RFLP-*Hae* III foi observada a presença de três genótipos (AA, CA e CC) e, pela análise de PCR-RFLP-*Mbo* I foram observados apenas dois genótipos (CC e TC). Não houve associação significativa entre os polimorfismos observados no gene *Tfam,* com as enzimas *Hae* III e *Mbo* I, e a característica espessura de gordura de cobertura. Entretanto, os resultados sugerem uma associação entre o polimorfismo detectado pela enzima *Hae* III e a área do músculo *Longissimus dorsi.*

Palavras chave: bovinos, marcador molecular, RFLP, EGS e AOL

TITLE: POLYMORPHIS IN TFAM GENE AND THEIR ASSOCIATIONS WITH CARCASS TRAITS FROM NELORE HEIFERS.

ABSTRACT – The mitochondrial transcription factor A (*Tfam*) is an essential protein for the transcription and genome replication processes of this organelle which also has indirect effects on lipids biosynthesis and oxidation. This study was conducted on intent to verify the existence of polymorphisms on the promoter region of Tfam gene and verify their possible relationships with carcass traits from Nelore heifers (*Bos indicus*). Genomic DNA were extracted from blood samples of 272 animals followed by PCR isolation/amplification of Tfam gene and application of the RFLP with thr restriction enzymes *Hae* III and *Mbo* I. The carcass traits considered were rib eye and fat thickness and were obtained by ultrasound between the ages of 555 and 800 days. The analysis with PCR-RFLP *Hae* III and *Mbo* I showed the migration patterns AA, CA, CC and CC,TC, respectively. There was no significant association among the patterns obtained and the fat thickness. However, the results showed an associated effect among the patterns obtained with PCR-RFLP *Hae* III and rib eye, which indicates the possible use of Tfam as a candidate gene.

Keywords: bovines, molecular markers, RFLP, EGS, AOL

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com predominância de raças zebuínas, contando com mais de 180 milhões de cabeças (Anualpec, 2006). Dessa forma, a pecuária de corte tem fundamental importância para a economia brasileira, contribuindo, sobretudo, com a balança comercial do país.

Melhorar a qualidade da carcaça e da carne são objetivos de seleção para atender a demanda atual de carne bovina e conseguir cotas em mercados diferenciados. Músculos, gordura, ossos e tecido conectivo são os principais componentes da carcaça bovina. A indústria necessita de uma quantidade mínima de músculo para maximizar o processo de abate e determinada gordura de cobertura para preservar a qualidade da carne durante o processo de resfriamento. A seleção de animais com características desejáveis de maior deposição de músculos, aliada à deposição de gordura de cobertura subcutânea em sistemas de engorda que predominam no Brasil, irá aumentar a eficiência da seleção para produção de carne, atendendo às exigências do consumidor por um produto de melhor qualidade.

Para que se possa fazer uma seleção mais eficaz, faz-se necessário a identificação de características indicadoras da qualidade e produtividade de carcaça. De acordo com LI et al. (2006) uma das principais características que afetam a qualidade da carcaça é a espessura da gordura de cobertura e, a seleção para uma medida ótima de gordura é um dos maiores desafios para o melhor aproveitamento na indústria da carne. Segundo JEREMIAH (1996), carcaças bovinas podem ser classificadas usando somente a espessura de gordura subcutânea, ou em combinação com a gordura intramuscular.

Em relação à produtividade, LUCHIARI FILHO (2000) relata que o músculo dorsal (*Longissimus dorsi*), possui vários atributos positivos que o torna um bom

indicador da quantidade de músculo da carcaça, como por exemplo: maturidade tardia e fácil mensuração, correlação positiva com a porção comestível e com várias medidas de rendimento de carcaça.

A espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL) são características quantitativas que dependem da ação conjunta de vários genes. A aplicação dessas características em programas de melhoramento genético de bovinos de corte depende de informações fenotípicas consistentes de um grande número indivíduos. O fato da mensuração da EGS e da AOL ser feita após o abate dos animais torna a sua obtenção dificultosa, e sua avaliação exigiria a realização de um teste de progênie.

A técnica de ultra-sonografia possibilita a obtenção da EGS e da AOL no animal vivo, o que facilita a estimação de diferenças esperadas na progênie de um grande número de animais. Outra possibilidade de avaliação dessas características de carcaça, sem que seja necessário o abate dos animais, é a utilização de marcadores moleculares mediante a genotipagem dos indivíduos.

Dentre os possíveis genes que podem ser candidatos a marcadores moleculares da EGS e da AOL, está o fator de transcrição mitocondrial A (*Tfam*). Esse gene codifica uma proteína que regula o processo inicial da transcrição e da replicação do DNA mitocondrial (mtDNA), e está relacionado com a biogênese mitocondrial (JIANG et al., 2005).

Alguns estudos têm mostrado que muitos aspectos da adipogênese são acompanhados pela estimulação da biogênese mitocondrial (WILSON-FRITCH et al., 2003; JIANG et al., 2005) e, portanto, é possível que a variação genética do *Tfam* afete a deposição de gordura corporal e o metabolismo energético. Assim, se faz necessário verificar a relação do fator de transcrição mitocondrial A com características de carcaça como a área do músculo *Longissimus dorsi* e a deposição de gordura subcutânea em animais zebuínos, por meio de polimorfismos RFLPs, levando-se em consideração sua importância na biogênese mitocondrial.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de polimorfismos no gene *Tfam* e avaliar a relação entre estes polimorfismos e características de carcaça obtidas pela técnica de ultra-sonografia em bovinos da raça Nelore, no intuito de obter marcadores que possam ser úteis na seleção de animais precoces na deposição de músculo e de gordura.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Identificar polimorfismos do tipo PCR-RFLP (Polimorfismos no Comprimento do Fragmento de Restrição) no gene *Tfam*;

(2) Comparar as freqüências gênicas dos três rebanhos Nelore;

(3) Verificar associação desses polimorfismos com as características de carcaça (área do músculo *Longissimus dorsi* e espessura de gordura subcutânea) medidas por ultra-sonografia;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Características de carcaça (deposição de gordura subcutânea e área de olho de lombo) e sua obtenção por meio da ultra-sonografia

Características de acabamento de carcaça em bovinos são características de herança quantitativa, ou seja, apresentam variabilidade fenotípica decorrente de fatores genéticos (determinados por poligenes), fatores ambientais e da interação dos fatores genéticos com os fatores ambientais. A espessura de gordura subcutânea (EGS) medida a ¾ da borda medial sobre o músculo *Longissimus dorsi* é um eficiente indicador de acabamento de carcaça, (HENDRICK, 1983; SUGUISAWA, 2002; SILVA et al., 2003; FELÍCIO, 2004; SILVA et al., 2004).

A espessura da gordura de cobertura é uma das principais características quantitativas que afetam a qualidade da carcaça em gado de corte (MOORE et al., 2003). Não existe uma definição da EGS ideal que atenda todos os tipos de mercados consumidores, pois, em alguns mercados é uma característica muito desejável, enquanto que em outros, indesejável (SILVA, 2002). Do ponto de vista qualitativo há a necessidade de um nível mínimo de gordura de cobertura (2-3 mm) para proteger a carcaça durante o resfriamento, evitando assim a desvalorização do produto devido a penalização e a classificação pelo frigorífico (LUCHIARI FILHO, 2000).

Segundo CUNDIFF et al. (1993) uma carcaça de qualidade deve apresentar quantidade de gordura suficiente para garantir sua preservação e características desejáveis para o consumo.

A área de olho de lombo (AOL), medida entre a 12ª e a 13ª costela, também é amplamente aceita e utilizada como um indicador da composição de carcaça (PERKINS, 1992 e LUCHIARI FILHO, 2000). Segundo HENDRICK (1983) a AOL tem sido associada significativa e positivamente com medidas de

carne magra na carcaça, após o excesso de gordura ser retirado ou padronizado a uma espessura uniforme.

A AOL tem sido associada com musculosidade, porém sua importância não fica limitada a isso, pois, é um importante indicador do rendimento dos cortes de alto valor comercial (LUCHIARI FILHO, 2000).

Uma maneira de avaliar a qualidade da carcaça, ajudando a melhorar as características organolépticas da carne, sem a necessidade de abate dos animais e sem atribuir escores visuais, é por meio da ultra-sonografia (YOKOO et al., 2008). A ultra-sonografia é uma forma rápida de colheita de dados de carcaça, não invasiva e que não deixa resíduo nocivo na carne dos animais avaliados (PERKINS et al., 1992).

Segundo HENDRICK (1983) as relações entre espessura de gordura subcutânea e área do músculo *Longissimus dorsi*, obtidas por ultra-som no animal vivo são similares às relações entre as mesmas medidas na carcaça observadas após abate.

Em trabalho realizado por WILSON et al. (1998), medidas acuradas das características de carcaça avaliadas por ultra-som em animais vivos, foram utilizadas em programas de melhoramento genético de rebanhos, bem como ferramenta de manejo em confinamentos e em programas de produção de carcaça com características especificas.

Nos EUA, dados de características de carcaça, provenientes de programas de teste de progênie, são usados por associações de criadores para calcular a diferença esperada na progênie (DEP). Entretanto, muitas destas associações já usam a DEP destas características, obtidas por ultra-som, para complementar ou comparar com a DEP de medidas de carcaça (KEMP et al., 2002).

A raça Nelore apresenta grandes vantagens em relação às outras quanto à rusticidade e adaptabilidade às condições brasileiras. No entanto, é sabido que estes animais precisam de maior precocidade de acabamento, para que resultem em carcaças que tenham, além do peso desejado, cobertura de gordura suficiente para protegê-la do resfriamento *post mortem*. KIM et al. (2003) afirmam que, se

loci para características quantitativas (QTL's) que influenciam variações na qualidade de carcaça entre animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) puderem ser identificados e empregados em seleção assistida por marcadores, juntamente com esquema de acasalamento, logo crias superiores e animais marcados poderão ser identificados nos estágios iniciais da produção. Isto permitiria uma melhora na resposta à seleção e na implementação de práticas administrativas mais eficientes para acertar o alvo da produção final.

A criação de animais com maior capacidade de deposição de gordura de cobertura, em sistemas extensivos de pastagem, é de suma importância para produzir carcaças consistentes em termos de qualidade, o que, sabidamente tem sido um problema desta cadeia produtiva. O mapeamento de QTL's com efeitos significativos sobre características de carcaça, assim como a identificação de genes que afetam o metabolismo de lipídios, poderão auxiliar e aumentar a acurácia das avaliações genéticas dessas características.

3.2 Biogênese mitocondrial e metabolismo de lipídeos

É sabido que o tecido adiposo apresenta um importante papel na regulação e manipulação do metabolismo energético, uma vez que, depende do mesmo o armazenamento e a liberação dos triglicerídeos, bem como a secreção de fatores que afetam a saciedade e a utilização de energia. Porém, muitos produtos necessários para a síntese de triglicerídeos são provenientes da biogênese mitocondrial (WILSON-FRITCH et al., 2003).

Os ácidos graxos são degradados pelo processo da β-oxidação que ocorre na matriz mitocondrial. Tal processo ocorre em quatro etapas, onde o ácido graxo é degradado pela oxidação no β carbono (C3) em um grupo ceto (C=O) com a remoção sucessiva de fragmentos de dois carbonos na forma de acetil-CoA, posteriormente oxidada a CO_2, no ciclo do ácido cítrico. Em cada ciclo da β-oxidação forma-se 1 mol de acetil-CoA, 1FADH2 e um NADH (Figura 1). Porém, antes de serem oxidados, os ácidos graxos são ativados pela adição da

Coenzima A (CoA) para formar acil-CoA-graxo, esse por sua vez, é incapaz de atravessar a membrana mitocondrial tendo que se ligar à carnitina que o transportará para as mitocôndrias (MOTTA, 2004).

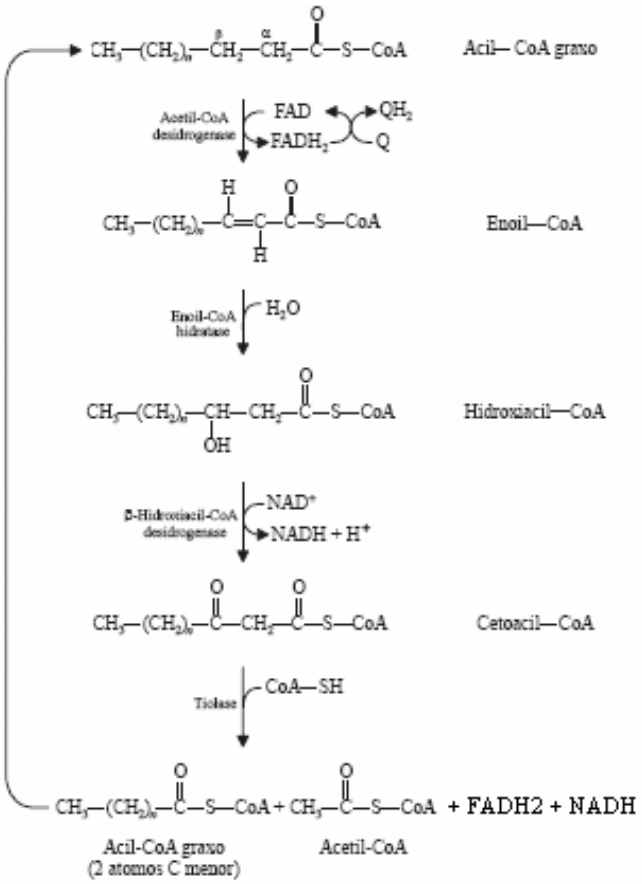

Figura 1. Reações da via de β - oxidação de ácidos graxos (MOTTA, 2004)

Grande parte da β-oxidação dos ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias, provendo assim fatores intermediários para a síntese de triglicerídeos pela ação da piruvato carboxilase (REICHER & NEUPERT, 2004). Além disso, é necessário um número muito grande de mitocôndrias para gerar acetil-CoA necessário para a ativação dos ácidos graxos antes da esterificação em trigliceríedos. Durante a biossíntese de triglicerídeos os ácidos graxos são formados a partir da acetil-CoA gerada nas mitocôndrias, que atravessam a membrana mitocondrial na forma de

citrato e chegam ao citosol, onde regenera-se a acetil-CoA, o mesmo processo transporta também o oxaloacetato. Esse processo é constituído por quatro etapas que terá como produto final a síntese de um ácido graxo de cadeia longa (MOTTA, 2004).

3.3. Gene que codifica a proteína Tfam

O fator de transcrição mitocondrial A (gene *Tfam*), também conhecido como TCF6, é uma proteina de 25KDa, pertencente ao grupo das proteínas de alta mobilidade, fundamental para a ocorrência do processo de transcrição mitocondrial (FISHER & CLAYTON, 1988; FISHER et al.,1987), bem como um participante na replicação do genoma mitocondrial (EKSTRAND et al., 2004). Em *Bos taurus* o gene *Tfam* encontra-se localizado no cromosomo 28, sendo codificado nuclearmente e importado para as mitocôndrias.

Assim como em humanos, camundongos, ratos e frangos o gene *Tfam* bovino é composto por 7 exons e 6 introns. O *Tfam*, agindo conjuntamente com fatores secundários no processo de transcrição mitocondrial, conhecidos como TFBM1 e TFBM2, interagem diretamente com a RNA polimerase mitocondrial com a qual se heterodimerizam e assim se unem ao DNA mitocondrial, semelhantemente às histonas (FALKENBERG et al., 2002; SHOUBRIDGE, 2002). JIANG et al. (2005) observaram que a região promotora do gene *Tfam*, contém naturalmente códons AUG em series, o que sugere um iniciador de transcrição. KAUFMAN et al. (2007) concluíram que o *Tfam* por si só é suficiente para organizar a cromatina mitocondrial e dar inicio aos mecanismos formadores do nucleóide. Segundo MC CULLOCH et al. (2002) e SEIDEL-ROGOL et al. (2003) as proteínas TFBM 1 e 2 possuem ainda uma atividade RNA metiltransferase, porém, cabe ao *Tfam* a maior responsabilidade por regular a biogênese mitocondrial em mamíferos (FISHER & CLAYTON, 1988).

TSHILUMBU (2003) afirmou que o *Tfam* reconhece e se une especificamente a seqüências de DNA mitocondrial localizadas acima dos pontos

de inicio da transcrição, Este gene codifica uma proteína que apresenta 246 aminoácidos dos quais 42 são aminoácidos N-terminais. Durante o processo de translocação mitocondrial, são efetuados os processos proteolíticos que resultam na forma final do *Tfam* de 25 KDa.

A região promotora do gene *Tfam* em *Bos Taurus,* apresenta um potencial fator respiratório nuclear 1 (NRF1) e uma proteína estimulante (SP1), no entanto não se observa o fator respiratório nuclear 2 (NRF2). Em humanos a região promotora do gene *Tfam* apresenta NRF1 e 2, em ratos e ratazanas é observado apenas NRF2, sendo comum a todas espécies até o momento analisadas, a presença da proteína estimulante (SP1) (SCARPULLA, 2002). Em bovinos todos esses fatores contém prováveis repressores da transcrição que conectam-se em locais correspondentes encontrados em genes que participam do metabolismo de lipídeos.

Polimorfismos no gene *Tfam* vem sendo amplamente estudado em humanos, sendo analisada hipóteses de sua relação com as doenças de Alzheimer (BELIN et al., 2007; ALVAREZ et al., 2008), Parkinson (BELIN et al., 2007) e também diabetes (CHOI et al., 2006).

Em animais, o estudo do gene *Tfam* e suas funções são recentes. Em pesquisas desenvolvidas com ratos foi possível observar as ações do gene *Tfam* com participação na espermatogênese (RANTANEN et al., 2001), problemas cardíacos em ratos diabéticos (NISHIO et al., 2004) e recuperação de lesões em músculos cardíacos (YOSHIDA et al., 2005). Em moscas foi relacionado com a biogênese mitocondrial (TAKATA et al., 2003).

MAY-PANLOUP et al. (2005) estudando ovócitos bovinos em várias fases da embriogênese, observaram a importância da atividade do *Tfam* na manutenção dos primeiros estágios da embriogênese bovina. Na pesquisa desenvolvida com uma população de animais cruzados (Wagiu x Limousin), JIANG et al. (2005) encontraram dois polimorfismos na região promotora do gene *Tfam* e associou-os com maior deposição de gordura subcutânea e marmoreio da carne.

Embora polimorfismos no gene *Tfam* já tenham sido associados com maior deposição de gordura subcutânea e marmoreio da carne em *Bos taurus*, ainda não existem trabalhos realizados com *Bos Indicus* que indiquem tal associação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para o presente estudo foram amostrados 272 animas, pertencentes a três rebanhos da raça Nelore da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho – (EEZS), unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizada ao norte do estado de São Paulo, Brasil. Estes animais fazem parte do Programa de Seleção das Raças Zebuínas iniciado em 1978 e desde 1980 estão separados em três rebanhos, Nelore Seleção (NeS), Nelore Tradicional (NeT) e Nelore Controle (NeC). Nos rebanhos NeS e NeT os animais são selecionados para maiores pesos a um ano de idade (machos) e ao sobreano (fêmeas), enquanto que no rebanho NeC são selecionados machos e fêmeas com peso ao ano e ao sobreano próximos da média. O NeT diferencia-se do NeS por ter recebido, eventualmente, touros de outros rebanhos, inclusive comerciais.

Das novilhas analisadas, nascidas entre 2003 e 2005, 93 são do rebanho NeS, 137 são do rebanho NeT e 42 do rebanho NeC. Após 24 anos (1981 a 2004) de seleção, a média dos valores genéticos do peso ao sobreano das novilhas é de 1,9 kg no NeC, 42,2 kg no NeS e 44,6 kg no NeT (RAZOOK & MERCADANTE, 2007).

4.2. Dados das medidas da espessura de gordura subcutânea e da área do músculo *Longissimus* dorsi

As medidas de EGS e da AOL foram obtidas em 272 novilhas, nascidas entre 2003 e 2005. A obtenção das medidas aos 18 e 26 meses de idade é justificada pela falta de informações sobre a melhor idade para identificar a precocidade de deposição de gordura em fêmeas Nelore, criadas em pastagens.

Foram obtidas imagens de ultra-som tomadas na região entre a 12º e a 13º costelas, transversalmente sobre o músculo *Longissimus dorsi,* nas quais são medidas a EGS e a AOL. Além disso, foram obtidas imagens tomadas na

intersecção dos músculos *Gluteus medius* e B*iceps femoris*, localizados entre o ílio e o ísquio, nas quais é medida a espessura de gordura subcutânea da garupa (EGSG). Foram utilizados dois tipos de equipamentos, dependendo da ocasião: Aloka 500V com sonda linear de 17,5cm de 3,5 MHz e Pie Medical 401347 com sonda linear de 18cm de 3,5 MHz. Para colheita das imagens, foi utilizado óleo vegetal e um acoplante (standoff) para garantir o contato acústico entre a sonda linear e o corpo do animal. As imagens foram gravadas e, posteriormente, interpretadas em *software* Echo Image Viewer 1.0 (Pie Medical Equipament B.V.,1996).

4.3. Colheita de amostras

Foram colhidos 5mL de sangue de cada animal, por punção da veia jugular, utilizando-se de tubos *vacutainer* contendo 7,5 mg de EDTA. Os tubos contendo as amostras foram mantidos sob refrigeração a –20°C até o momento da realização das análises laboratoriais.

4.4. Análises Laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética e Citogenética “Marcos Antonio Giannoni”, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

4.4.1. Extração de DNA

Das amostras de sangue, o DNA genômico foi extraído seguindo-se o protocolo de ZADWORNY & KUHNLEIN (1990), onde, após descongelar as amostras, foram aliquotados 1000 µL de sangue de cada amostra em tubos eppendorf de 2 mL. Foram adicionados 40 µL de Nonidet P-40 (12,5%) às amostras, completando-se em seguida o volume com TKM-1. Cada tubo foi vigorosamente agitado em vortex e centrifugado por 15 min a 10600 x g/ 28°C.

O sobrenadante de cada amostra foi então descartado, e adicionou-se 1000 µL de TKM-1[Tris-HCl (1M) pH 7,6; KCl (1M) e EDTA (0,1) pH 8,0], agitou-

se novamente em vortex até dissolver o “pellet”, completou-se novamente o volume e centrifugou-se por mais 10 min a 10600 x g / 28°C. Este procedimento foi repetido até se observar um pellet de coloração clara.

Novamente o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1000 µL de TKM2 [Tris-HCl(1M) pH 7,6; KCl (1M); EDTA (0,1) pH 8,0 e NaCl (1M)] + 100 µL de SDS10%, agitando-se em seguida as amostras vigorosamente em vortex até a dissolução total do “pellet”. As amostras foram então levadas as banho-maria a 55°C por uma hora. Após este período adicionou-se 400 µL de NaCl 6M por amostra, agitando-se vigorosamente em vortex e centrifugado a 14840 x g por 20 minutos /4°C.

Foram aliquotados 1000 µL do sobrenadante de cada amostra e transferido para novos tubos (2,0mL), adicionando-se então 1000 µL de etanol absoluto (gelado) e misturado cada amostra, vagarosamente, por inversão. As amostras foram centrifugadas a 14840 x g / 15 minutos / 4°C, descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 1000 µl de etanol 70% (gelado) seguido de nova centrifugação a 14840 x g 5 minutos / 4°C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram secadas por inversão sobre papel absorvente por aproximadamente 2 horas e o DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE [Tris-HCl (1M) pH 8,0 e EDTA (0,1M) pH 8,0] 10:1, sendo então levado ao agitador a 265 x g / 12 horas.

4.4.2. Eletroforese em gel de agarose

Visando analisar a qualidade e a quantidade do DNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se cerca de 3 µL de solução (DNA extraído, produto de PCR, ou produto de digestão), mais 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl 0,1mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%), em gel de agarose (1%) preparado com tampão TBE 1X (10mM Tris HCL pH 7,6, 1mM EDTA pH 8,0, e ácido bórico 89mM, pH 8,3) com brometo de etídeo (0,05 µg/mL), fotodocumentado em aparelho GEL-LOGIC, com transiluminador ultravioleta e analisados pelo software Image Analysis da Kodak.

4.4.3 Amplificação do DNA por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

As reações de PCR foram realizadas com 272 animais. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) para amplificação da região promotora do gene *Tfam* foram os mesmos utilizados por JIANG et al. (2005), os quais foram desenhados com base na seqüência do gene *Tfam* depositada no Genbank (AC: NM001034016).

As condições de amplificação dos fragmentos da região promotora do gene *Tfam* estão descritas na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Biometra, e a padronização da temperatura ideal de amplificação foi realizada em termociclador Gradiente Apollo.

Tabela 1. Condições de amplificação do gene *Tfam*.

GENE	*Tfam*
Referência	JIANG et al., 2005
Iniciadores	F: 5' tgtaaaacgacggccagtgttgttgcagaaaatcagctaaaatg 3' R: 5' caggaaacagctatgacccatccactgagactatcgctgacct 3'
Região Amplificada	Região promotora
Fragmento Gerado	801 pb
Programa de Amplificação	95°C- 5' 95°C- 45" 55,7°C-45" 72°C- 45" 72°C- 10' } 35 vezes
Reação de Amplificação	Volume final 25 µL 100ng DNA 2,0 pmol cada primer tampão PCR 1X 2,5 µL $MgCl_2$ 1,5 µL 100 µM dNTP 0,4 U Taq DNA polimerase

Na Figura 2 pode ser observada a análise virtual do gene *Tfam,* com a posição dos oligonucleotídeos iniciadores.

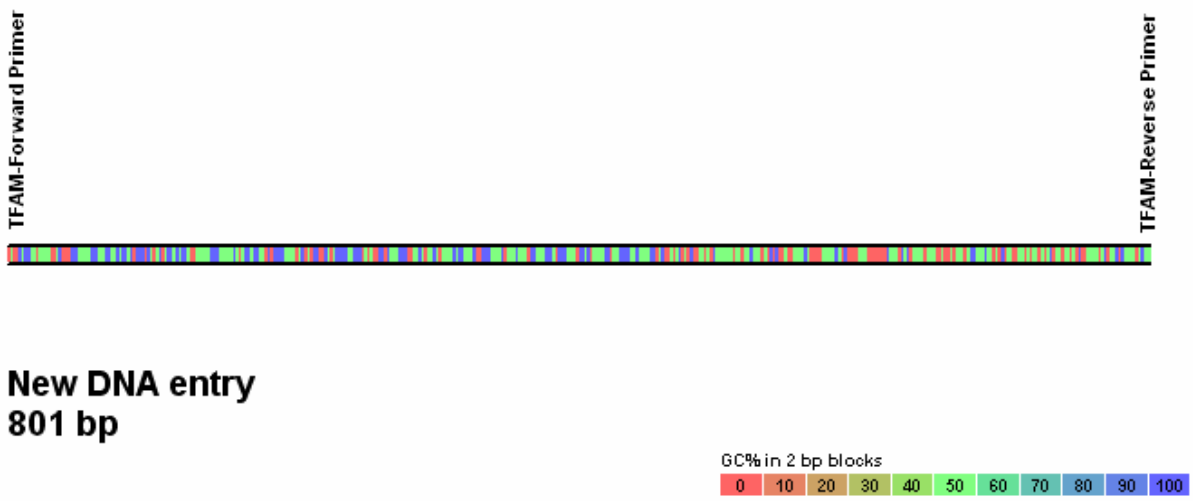

Figura 2. Organização do gene *Tfam* com as posições dos oligonucleotídeos iniciadores.

4.4.4. Digestão com as endonucleases de restrição

Para a detecção dos RFLPs no fragmento do gene *Tfam* foram empregadas as enzimas *Hae* III e *Mbo* I. Para tanto, foi utilizado 5 µL de amostra do fragmento amplificado por PCR (contendo aproximadamente 100 ng de DNA), 1,5 µL do volume de tampão de reação e 0,5 U de enzima, para volume final de reação de 15 µL. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese (100 V por 2 horas) em géis de agarose 4%, corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e

fotografados para identificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes, comparando-se com padrão de peso molecular de 1Kb plus DNA *ladder* (invitrogen®).

4.5 Freqüência Gênica e Genotípica

As freqüências gênicas e genotípicas dos PCR-RFLPs observados no gene do TFAM foram estimadas conforme o procedimento descrito por WEIR (1990), cujas equações são descritas a seguir:

a) Freqüência Gênica

$$p = \frac{2N_{AA} + N_{AB}}{2N}$$

$$q = \frac{2N_{BB} + N_{AB}}{2N}$$

b) Erro Padrão da Freqüência Alélica (EP):

$$EP_p = EP_q = \sqrt{\frac{pi(1 - pi)}{2N}}$$

c) Freqüência Genotípica

$$F(AA) = \frac{N_{AA}}{N}$$

$$F(AB) = \frac{N_{AB}}{N}$$

$$F(BB) = \frac{N_{BB}}{N}$$

Sendo que:

N_{AA} = Número de animais de genótipo AA

N_{BB} = Número de animais de genótipo BB

N_{AB} = Número de animais de genótipo AB

N = Número total de animais da amostra

p = Freqüência do alelo A

q = Freqüência do alelo B

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada enzima foi avaliado por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de $P < 0,05$. A diferenciação gênica e genotípica entre os rebanhos para cada polimorfismo estudado também foi avaliada por um teste exato de probabilidade, assumindo uma distribuição qui-quadrado e nível de significância de 0,05, utilizando o software GENEPOP (ROUSSET, 2007).

4.6. Análise de associação com características de carcaça

Foram utilizados modelos mistos com o procedimento “proc mixed” (SAS Inst. Inc., Cary, NC) incluindo o efeito de touro como aleatório e os efeitos fixos de GC (rebanho e ano de nascimento), mês de nascimento, genótipo observado e, como covariáveis, as idades da mãe ao parto e do animal no momento da medida.

Para estimar os efeitos aditivo e de dominância, foi utilizado o mesmo modelo, substituindo-se o efeito dos genótipos por duas covariáveis. Para o efeito aditivo fez-se uma regressão sobre 0, 1 e 2, correspondendo aos genótipos CC, AC e AA, respectivamente. Para o efeito de dominância, assumiu-se 0 para os genótipos homozigotos e 1 para o genótipo heterozigoto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fragmento analisado está localizado na região promotora do gene do fator de transcrição mitocondrial (*Tfam*).

5.1 Extração de DNA

O DNA extraído, visualizado por eletroforese em gel de agarose (0,8 %), mostrou-se íntegro, sem quaisquer sinais de contaminação e em boa quantidade, como pode ser observado na Figura 3.

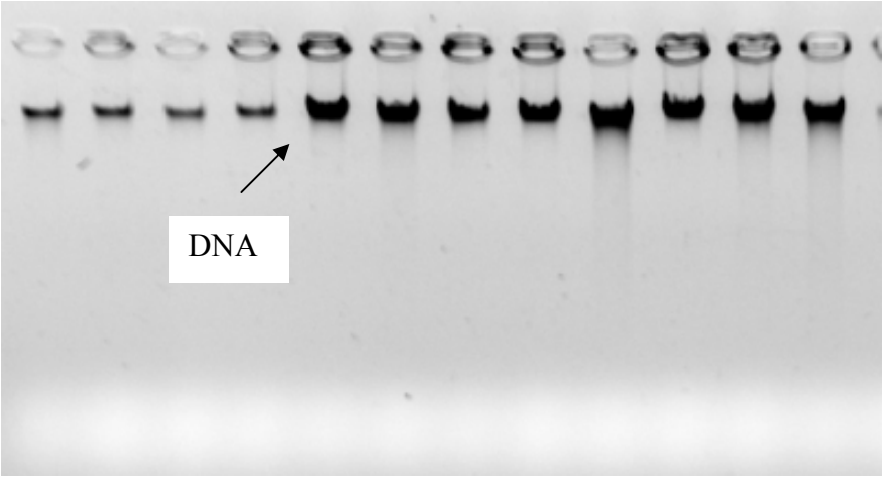

Figura 3. Eletroforograma evidenciando a integridade do DNA total das amostras de sangue das novilhas da raça Nelore extraído pelo método de Zadworny & Kuhnlein (1990)

5.2 Amplificação de DNA por PCR

O fragmento do gene *Tfam* foi amplificado e apresentou tamanho de aproximadamente 801 pb. A confirmação das amplificações das amostras foi observada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, após o término das reações de PCR, como pode ser observado na Figura 4.

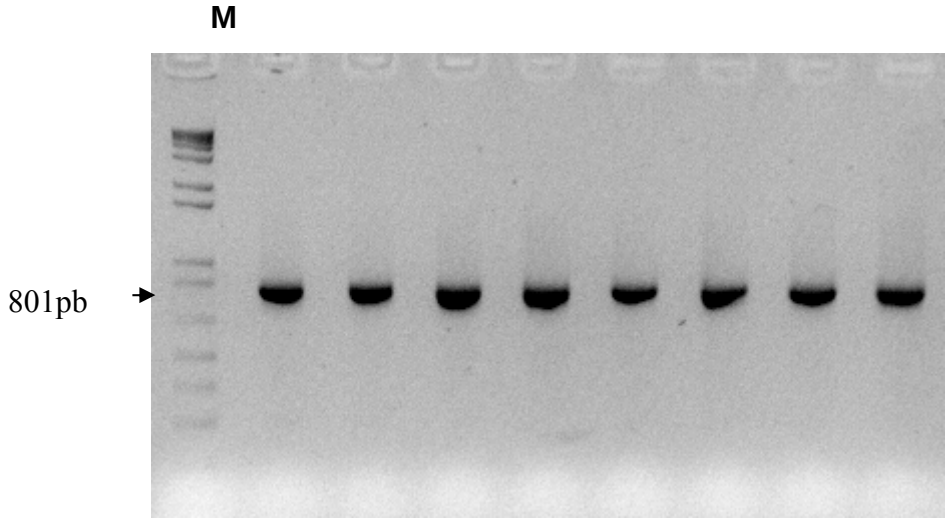

Figura 4. Eletroforograma de confirmação dos produtos amplificados do gene *Tfam*, mostrando o padrão de migração do fragmento de aproximadamente 801 pb em gel de agarose, com marcador (**M**) 1Kb plus DNA *Ladder*.

5.3 Análise de RFLP

O fragmento da região promotora do gene *Tfam* foi submetido à digestão pelas endonucleases de restrição *Hae* III e *Mbo* I. Na Figura 3 pode ser observada a análise virtual do gene *Tfam*, com as posições das endonucleases de restrição.

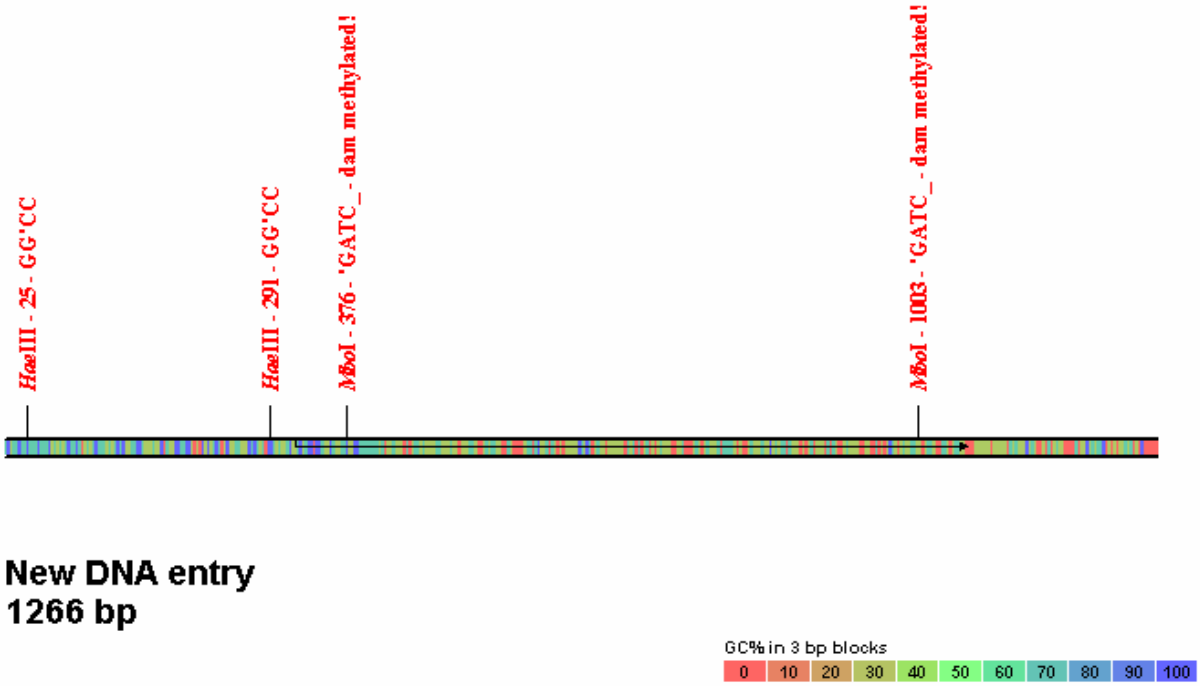

Figura 3. Organização do gene *Tfam* com as posições das endonucleases de restrição

Após a digestão pela endonuclease de restrição *Hae* III, foi observada a presença dos genótipos AA, AC e CC assim como descrito por JIANG et al. (2005) em estudos com animais *Bos taurus*. Todos os genótipos observados apresentaram sítios de corte para a endonuclease de restrição, sendo o genótipo AA representado por três fragmentos (152, 187 e 462 pb), o genótipo AC representado por cinco fragmentos (83, 104, 152, 187 e 462 pb) e o genótipo CC representado por quatro fragmentos (83, 104, 152 e 462 pb), como observado na Figura 5.

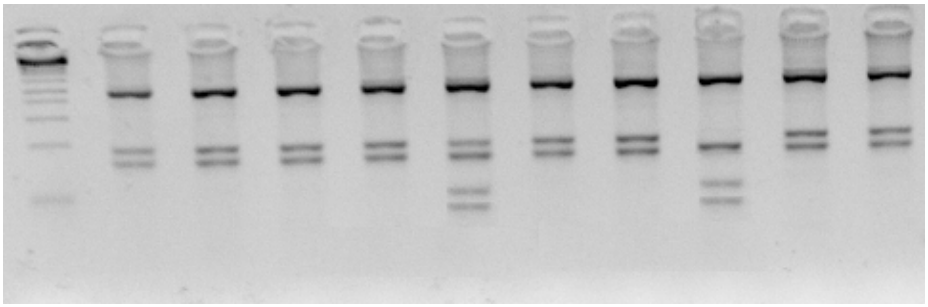

Figura 5. Eletroforograma da digestão do fragmento do gene *Tfam* pela endonuclease de restrição *Hae* III, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 4%. **M** corresponde ao marcador molecular 1 Kb.

Do total de animais estudados, 221 apresentaram o genótipo AA, 49 o genótipo AC e apenas 2 animais o genótipo CC. A distribuição dos genótipos podem ser observadas na Figura 6.

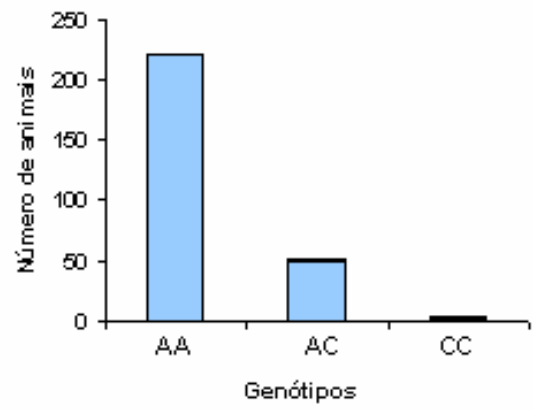

Figura 6. Distribuição dos genótipos apresentados para reação de PCR-RFLP com a enzima de restrição *Hae* III.

Na amostra estudada, o homozigoto AA foi o genótipo mais freqüente. O número observado de cada genótipo e as freqüências genotípicas observadas podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2- Freqüências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene Tfam em novilhas da raça Nelore com utilização da enzima *Hae* III

Genótipos	N° de animais	Freqüência genotípica
AA	221	0,81
CA	49	0,18
CC	2	0,01
	Freqüência alélica	
	A = 0,9	
	C = 0,1	
	X^2 = 0,34	

O valor do χ^2 foi de 0,34, bem abaixo do valor para o teste com 1 grau de liberdade e p≤ 0,05 (3,84). Este resultado mostra que as freqüências observadas não diferem significativamente das freqüências esperadas e que o loco *Tfam* analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra.

Nos três rebanhos (NeC, NeS e NeT) a freqüência genotípica do AA foi superior, assim como a freqüência alélica de A. O genótipo CC, que em *Bos taurus* foi associado a maior deposição de gordura e marmoreio da carne, foi observado com uma freqüência de 0,02 apenas no grupo NeS. O número de animais analisados, a freqüência alélica e a freqüência genotípica observada dos genótipos em cada rebanho pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Freqüências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *Tfam* nos grupos de novilhas da raça Nelore.

Enzima	N	Animais	Freqüência alélica		Freqüência genotípica		
Hae III			A	C	AA	AC	CC
	42	NeC	0,90	0,10	0,79	0,21	0
	93	NeS	0,84	0,16	0,72	0,26	0,02
	137	NeT	0,94	0,06	0,88	0,12	0

N: número de animais. NeC: Nelore, NeS: Nelore Seleção, NeT: Nelore Tradicional.

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores do X^2 de 0,05; 0,43 e 1,07 para NeC, NeS e NeT, respectivamente, revela que o loco *Tfam* avaliado está em equilíbrio nos três rebanhos estudados. A freqüência do alelo A foi superior ao alelo C, mas não diferiu estatisticamente entre os três rebanhos.

As amostras foram submetidas à nova análise de PCR-RFLP com a enzima *Mbo* I e após a digestão foi detectado a presença dos genótipos CC e CT, sendo que o o genótipo TT não foi observado. O alelo C apresentou padrão de migração com 4 fragmentos de aproximadamente 543, 135, 68 e 55 pb e o alelo T apresentou 6 fragmentos de aproximadamente 302, 241, 68 e 55 pb, como mostrado na Figura 7.

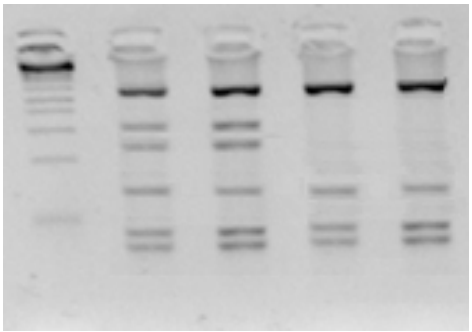

Figura 7. Eletroforograma da digestão do fragmento do gene *Tfam* pela endonuclease de restrição *Mbo* I, mostrando o padrão de migração dos fragmentos em gel de agarose 4%. **M** corresponde ao marcador molecular 1Kb.

Com a enzima de restrição *MboI*, foi verificado que 259 animais apresentaram o genótipo CC e apenas 13 animais apresentaram o genótipo TC. A distribuição dos genótipos após a reação com a enzima *MboI* pode ser observada no gráfico abaixo (Figura 8).

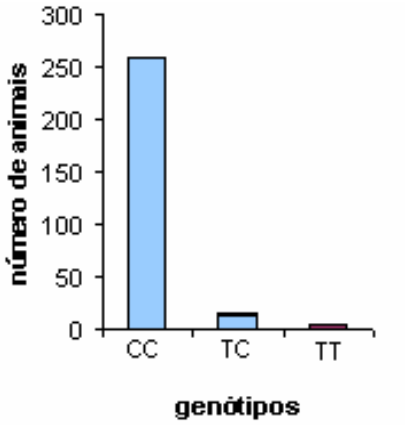

Figura 8. Distribuição dos genótipos apresentados para reação de PCR-RFLP com a enzima de restrição *MboI*.

O número de animais analisados no total e as freqüências genotípicas observadas podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Freqüências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *Tfam* em novilhas da raça Nelore com utilização da enzima *MboI*

Genótipos	N° de animais	Freqüência genotípica
CC	259	0,95
CT	13	0,05
	Freqüência alélica	
	C = 0,97	
	T = 0,03	
	X^2 = 0,59	

O valor do χ^2 para o número total de animais amostrados foi de 0,59, bem abaixo do valor para o teste com 1 grau de liberdade e p≤ 0,05 (3,84), mostra que as freqüências observadas não diferem significativamente das freqüências esperadas e que o loco *Tfam* analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra.

Em todos os rebanhos (NeC, NeS e NeT), a freqüência do genótipo CC foi superior, sendo o único genótipo observado no rebanho NeC. O número de animais analisados, a freqüência alélica e a freqüência genotípica observada dos genótipos em cada rebanho pode ser visualizado na Tabela 5.

Tabela 5 - Freqüências alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *Tfam* em novilhas da raça Nelore.

Enzima	N	Animais	Freqüência alélica		Freqüência genotípica		
MboI			C	T	CC	CT	TT
	42	NeC	1,00	0	1,00	0	0
	93	NeS	0,96	0,04	0,93	0,07	0
	137	NeT	0,98	0,02	0,95	0,05	0

N: número de animais. NeC: Nelore, NeS: Nelore Seleção, NeT: Nelore Tradicional.

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores de X^2 para os rebanhos NeS e NeT foram 1,18 e 1,8, respectivamente sendo que o rebanho controle (NeC) apresentou fixação do alelo C. Estes resultados indicam que o loco *Tfam* estudado está em equilíbrio nos rebanhos analisados. Em todos os rebanhos estudados a freqüência do alelo C foi superior e estatisticamente diferente do alelo T, porém sem diferença significativa para as freqüências alélicas entre eles.

Diferentemente do observado no presente trabalho, JIANG et al. (2005), em um estudo com os RFLPs (*Hae* III *e Mbo* I) no gene *Tfam* em animais F2 (Wagyu x Limousin), encontraram três genótipos AA, CA e CC de freqüências 0,18; 0,49 e 0,32 com a utilização da enzima *Hae* III e três genótipos CC, TC e TT de freqüências 0,35; 0,51 e 0,14 para a restrição com a enzima *Mbo* I.

A maior ocorrência do alelo A nesse estudo com *Bos indicus* é contrária à observada no estudo realizado em *Bos taurus*, onde o alelo C foi o mais freqüente. Este fato pode sugerir que este alelo seja característico de animais zebuínos. Além disso, a presença do alelo polimórfico C (enzima de restrição *Hae* III) em baixa freqüência nos animais *Bos indicus* analisados pode ser um indicativo da participação do genoma do *Bos taurus* na formação dos rebanhos Nelore (RIPAMONTE, 2001). Outros estudos, com diferentes genes (DGAT1 e Leptina), também demonstraram a presença de genótipos específicos de animais europeus e de animais zebuínos (MILAZZOTTO, 2001, MARSON et al., 2004, CARVALHO et al., 2004), confirmando a importância de novas pesquisas envolvendo a genotipagem para esses genes em populações de zebuínos.

A predominância dos genótipos AA e CC na região promotora do gene *Tfam* observada nesse estudo pela análise de PCR-RFLP, também pode estar associada ao fato desta população estar sendo selecionada a mais de 25 anos para características de crescimento. Levando em conta que o efeito primário do processo de seleção é aumentar a freqüência de alelos favoráveis, conseqüentemente haverá redução na freqüência de genes desfavoráveis. Dessa forma, é possível que a seleção que está sendo aplicada nessa população esteja promovendo uma diminuição da freqüência gênica do alelo C (enzima *Hae* III) e T (enzima *Mbo* I), provavelmente pelo fato desse alelo ter efeito negativo nas características selecionadas, predominando os alelos A (*Hae* III) e C (*Mbo* I) que devem estar relacionados positivamente com as características selecionadas.

Além disso, a identificação de um genótipo ou de um alelo de um gene não explica a total expressão de uma característica, pois esta está sendo influenciada pela expressão de outros genes, o que configura um possível QTL's (LAUREANO, 2006).

A partir dos resultados obtidos na análise de RFLP-*Hae* III e RFLP-*Mbo* I foram estimadas as médias dos quadrados mínimos e o erros padrão das características de carcaça analisadas para cada genótipo identificado pelas enzimas utilizadas *Hae* III e *Mbo* I (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativa das médias de quadrados mínimos e erros padrão associado aos efeitos dos genótipos dos marcadores.

	GENE *Tfam*						
	HaeIII				***MBoI***		
	AA	**AC**	**CC**	**P**	**CC**	**TC**	**P**
EGS±EP	1,9±0,1	2,0±0,2	1,4±0,8	0,67	2,0±0,1	2,2±0,4	0,58
EGSG±EP	3,8±0,1	3,9±0,2	2,4±1,0	0,32	3,9±0,2	4,1±0,5	0,59
AOL±EP	46,6±0,6[a]	46,4±0,9[a]	38,5±3,7[b]	0,09	46,5±0,6	48,27±1,7	0,31

[a,b] Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P < 0,05), EGS: espessura de gordura subcutânea, EGSG: espessura de gordura subcutânea na garupa, AOL: área de olho de lombo.

Os genótipos estudados não influenciaram significativamente as espessuras de gordura de cobertura medidas no lombo e na garupa. A área do *Longissimus dorsi* foi influenciada apenas pelo polimorfismo do gene *Tfam* identificado pela enzima *Hae* III. A menor média de AOL foi observada para o genótipo CC. Tanto os efeitos aditivos como de dominância afetaram significativamente esta característica. O efeito aditivo indicou que a presença do alelo A leva a um aumento de 4,1 $\pm$ 1,9 cm^2 (P=0,03) na AOL. O efeito de dominância do alelo A foi de 3,9 $\pm$ 2,0 (P=0,06). Entretanto, devido ao pequeno número de animais com genótipo CC na população, estas estimativas são de baixa acurácia.

Em *Bos taurus*, JIANG et al. (2005) conseguiram associar o polimorfismo observado C/A (*Hae* III) e C/T (*Mbo* I) com as características de marmoreio e deposição de gordura subcutânea na população estudada, sendo que, a maior deposição de gordura foi associada com a presença do alelo C dos dois polimorfismos encontrados e o haplótipo CC CC o mais favorável à deposição de gordura. CASAS et al. (2005), estudando polimorfismos para deposição de

gordura subcutânea e intramuscular no gene *DGAT1* em uma população de 479 animais Nelore, não encontraram associação com as características propostas e anteriormente associadas em *Bos taurus*, afirmando que devem ser desenvolvido marcadores moleculares específicos para *Bos indicus*.

6. CONCLUSÕES

Pela técnica de PCR-RFLP, com a utilização das enzimas *Hae* III e *Mbo* I, foi observada a presença de polimorfismo para o fragmento do gene *Tfam* analisado.

As freqüências gênicas comparadas entre os três rebanhos (NeS, NeT e NeC) não apresentaram diferenças significativas com a utilização da enzima *Hae* III. Com a utilização da enzima *Mbo* I, não foram observadas diferenças significativas nos rebanhos NeS e NeT, sendo que o rebanho NeC apresentou fixação do alelo C.

Não houve relação entre os polimorfismos estudados no gene *Tfam* e a espessura de gordura de cobertura. Entretanto, os resultados sugerem uma associação entre o polimorfismo detectado pela enzima *Hae* III e a área do músculo *Longissimus dorsi*, como possível gene candidato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, V., CORAO, A. I., ALONSO-MONTES,C., SÁNCHEZ-FERRERO,E., MENA, L.D., MORALES, B., GARCÍA-CASTRO, M., COTO, E. Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) Gene Variation and Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease, **Journal of Alzheimer's Disease**, volume 13, n°3, 2008.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2006.

BELIN, A. C., et al. Association study of two genetic variants in mitochondrial transcription factor a (TFAM) in Alzheimer's and Parkinson's disease, **Neuroscience letters**, vol. 420, n°3, p. 257-262, 2007.

CARVALHO, M. E.; FIGUEIREDO, L. G. G.; MARSON, E. P.; RIPANTE, P.; MEIRELLES, F. V.; FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Caracterização da heterozigose no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) em animais da raça Nelore. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, Pirassununga. **Anais**.: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

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

CHOY, Y.S., HONG, J.M., LIM, S., KO,K.S., PAK, Y.K. Impaired coactivator activity of the Gly 482 variant of peroxisome proliferator receptor gamma coativator -1malpha (PGC-1alpha)on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 344 p. 708-712, 2006.

CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M.; GREGORI, K.E.; CROUSE, J.D.; DIKEMAN, M.E. Characteristics of diverse breeds in cycle IV of the cattle germplasm evalution. **Beef research progress report.** v. 71 p.57-60, 1993.

EKSTRAND, M.I., FALKENBERG, M., RANTANEN, A., PARK, C.B., GASPARI, M., HULTENBY, K., RUSTIN, P., GUSTAFSSON, C.M., LARSSON, N.G. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. **Hum. Mol. Genet.** v.13 p.935–944, 2004.

FALKENBERG, M., M. GASPARI, ET AL. "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." **Nat Genet** v.31(3): p. 289-94, 2002.

FELÍCIO, P. E. Normas brasileiras de classificação de carcaças. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp - Campinas SP. Os novos desafios da pecuária brasileira – Simpósio. **Anais**. 2004.

FIGUEIREDO, L. G. G. **Estimativas de parâmetros genéticos de características de carcaça feitas por ultra-sonografia em bovinos Nelore**. 67f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001

FISHER, R. P. & CLAYTON, D. A. "A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at

the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro." **J Biol Chem** 260(20):p. 11330-8, 1985.

FISHER, R. P., J. N. TOPPER, ET AL. (1987). "Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements." **Mol Cell Biol** 50(2): 247-58, 1987.

FISHER, R. P. & CLAYTON, D. A. "Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1." **Mol Cell Biol** 8(8): 3496-509, 1988.

HENDRICK, H. B. Methods of estimatings live animal and carcass compoition. **J.Anim.Sci**. v.57, n. 5, p.1316-26, 1983.

JEREMIAH, L. E. The influence of subcutaneous fat thickness and marbling on beef palatabibity and consumer acceptability. **Food Research**, v.29, p.513-520, 1996.

JIANG, Z., KUNEJ, T., MICHAIL, J.J., GASKINS, C.T., REEVES, J.J., BUSBOOM, J.R., DOVE, P., WRIGTH, R.W. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Biochemical and biophysical research communications**. V.334 p. 516-523, 2005

KAUFMAN ET AL., 2007. The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. **Molecular Biology of the cell.** V.18, p. 3225-3236, 2007.

KEMP, D.J.; HERRING, W.O.; KAISER, C.J. Genetic and environmental parameters for steer ultrasound and carcass traits. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1489-1496, 2002

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, p.1933-1942, 2003.

LAUREANO,M.M.M. **Polimorfismos nos genes da prolactina e do IGF-I em bovinos da raça Nelore**. Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 68 p. Dissertação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2006.

LI, C.B.; CHEN, Y.J.; XU, X.L. et al. Effects of low-voltage electrical stimulation and rapid chilling on meat quality characteristics of Chinese Yellow crossbred bulls. **Meat Science**, v.72, n.1, p.9-17, 2006.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. 1. Ed. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000.134p.

MARSON, E. P., FERRAZ, J. B. S., MEIRELLES, F. V., BALIEIRO, J. C. C., ELER, J. P, MOURÃO, G. B., FIGUEIREDO, L. G. G. Efeito do polimorfismo dos genes do LHR e FSHR sobre a precocidade sexual de novilhas de corte de diferentes composições raciais. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. **Anais**: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2004.

MAY-PANLOUP, P.; VIGNON, X.; CHRETEIN, M.F.; HEYMAN, Y.; TAMASSIA, M.; MALTHIERY,Y.; REYNIER, P. Increase of mitochondrial DNA content

and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors**Reproductive biology and endocrinilogy** v.3 p. 65-72, 2005.

MC CULLOCH, V., SEIDEL-ROGOL, B. L. (2002). "A Human Mitochondrial Transcription Factor Is Related to RNA Adenine Methyltransferases and Binds S-Adenosylmethionine." **Mol. Cell. Biol**. 22(4): 1116-1125, 2002.

MILLAZZOTO, M. P. **Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com a precocidade sexual em fêmeas Bos primigenius indicus (Nelore).** 2001. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

MOORE, S.S.; LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W.M.; KNEELAND, J.; MURDOCH, B.; HANSEN,C.; BENKEL, B. Fine mapping of quantitative trayt loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromospme 14 in a commercial line of Bos taurus. **Journal of Animal Science**, V.81, p.1919-1925, 2003.

MOTTA, V.T. **Metabolismo dos lipídeos**. Bioquímica básica. Capítulo 10,p. 264-308, 2004.

NISHIO, Y., KANAZAWA, A., NAGA,I Y., INAGAKI, H., KASHIWAGI, A.“Regulation and role of the mitochondrial transcription factor in the diabetic rat heart.” **Ann N Y Sci**, v. 10011. p. 78-85, 2004.

PERKINS, T.L.; GREEN, R.P.; MILLER, M.F. Evalution of the alternative ultrasound measurement sites as estimators of yield grade factors in beef

cattle. Proceidings, western section, **American Society of Animal Science**, v. 43, p. 294-297, 1992.

RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Ganhos de produtividade com o uso de touros provados. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. Requisitos de qualidade na bovinocultura de corte. Piracicaba: FEALQ, 2007. p. 93 -114.

RANTANEN, A., JANSSON, M., OLDFORS, A., LARSSON, N. G. “Dowregulation of Tfam and mtDNA copy number durig mammalian spermatogenesis.” v. 12 p. 787-792, 2001.

REICHERT, A. S. & NEUPERT, W. Mitochondriomics or what makes us breathe. **Trends in genetics**. V. 20, p. 555-562, 2004.

RIPAMONTE, P**. Estimativa da participação do genoma de *Bos taurus* no rebanho Nelore**. 57f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo , Pirassununga, 2001.

ROUSSET, F. GENEPOP´007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Notes** (in press), 2007.

SEIDEL-ROGOL, B. L., MC CULLOCH, V. "Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop." **Nat Genet** v.33(1) p.23-4, 2003.

SCARPULLA, R.C. “Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis”. **Biochim. Biophys**. Acta 1576, p. 1–14, 2002.

SHOUBRIDGE, E. A. (2002). "The Shoubridge, E. A. (2002). "The ABCs of mitochondrial transcription." **Nat Genet** v. 31(3) p. 227-8, 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.** Dissertação de mestrado, USP- Pirassununga, 2002.

SILVA, S.L., LEME, P. R., PUTRINO S. M., MARTELLO L. S., LIMA C. G., LANNA, D. P. D. 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., LEME, P. R., PUTRINO S. M., MARTELLO L. S., LIMA C. G., LANNA, D. P. D. Estimativa de gordura de cobertura ao abate, por ultra-som, em tourinhos Brangus e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa ,v.33, n.2, p.511-517, 2004.

SUGUISAWA, L. **Ultra-sonografia das características e compsicnao de carcaça de bovinos.** 2002. 70f. Dissertação (mestrado) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2002.

TAKATA K, YOSHIDA H, HIROSE F, YAMAGUCHI M, KAI M, OSHIGE M, SAKIMOTO I, KOIWAI O, SAKAGUCHI K.”Drosophila mitochondrial transcription factor A: characterization of its cDNA and expression pattern during development.”**J. Biol. Chem**., Vol.278, p. 31149-31158, 2003.

TSHILUMBU, J.P.K. **Caracterización del promotor del factor de transcripción mitocondrial tfam. Regulación por receptores nucleares y factores de crecimiento**. 111f. Tese (doutorado) – Universidad Complutense de

Madrid FACULTAD DE FARMACIA. Depto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, 2003.

WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Massachusetts: **Sinauer Associates**, 1990, 377p.

WILSON, D.E.; ROUSE, G.H.; GRASER, G.H.; AMIM,V. Pediction of carcass traits using live animal ultrasound. In: Beef Research Report. Ames: **Iowa State University**, 7p, 1998.

WILSON-FRITCH, L. et al., Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone, **Mol. Cell. Biol.** v. 23 p.1085–1094, 2003.

YOKOO, M.J., ALBUQUERQUE, L.G., LÔBO, R.B., BEZERRA, L.A.F., ARAUJO, F.R.C., SILVA, J.A.V., SAINZ, R.D. Genetic and environmental factors affecting ultrasound measures of.longissimus muscle area and backfat thickness in Nelore cattle**. Livestock Science**. v.116 p.00640, 2008.

YOSHIDA, T., AZUMA, H., AIHARA, K., FUJIMURA, M., AKAIKE, M., MITSUI, T., MATSUMOTO, T.“Vascular smooth muscle cell proliferation is dependent upon upregulation of mitochondrial transcription factor A (mtTFA) expression in injured rat carotid artery.” **Artherioscerosis**, vol 178(1), p. 39-47, 2005.

ZADWORNY, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. T**heoroly Applied Genetics,** v. 80, p. 631-634, 1990.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo