

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

JOÃO PAULO MONTEIRO DA SILVEIRA

**USO DE PCR-RFLP NO GENE DA TIREOGLOBULINA EM
BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

FLORIANÓPOLIS - SC

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

JOÃO PAULO MONTEIRO DA SILVEIRA

**USO DE PCR-RFLP NO GENE DA TIREOGLOBULINA EM
BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência para
obtenção do Diploma de Graduação
em Zootecnia da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André Luís
Ferreira Lima.

FLORIANÓPOLIS - SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silveira, João Paulo Monteiro da
Uso de PCR-RFLP no gene da Tireoglobulina em bovinos da
raça Crioula Lageana / João Paulo Monteiro da Silveira ;
orientador, André Luis Ferreira Lima, 2019.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Genética. 3. Marcadores Moleculares.
4. Melhoramento Animal. 5. Crioulo Lageano. I. Ferreira
Lima, André Luis . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Zootecnia. III. Título.

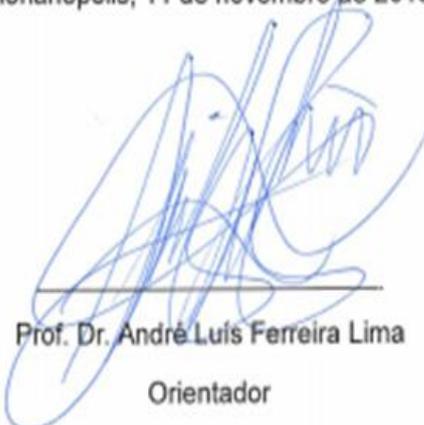
João Paulo Monteiro da Silveira

USO DE PCR-RFLP NO GENE DA TIREOGLOBULINA EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 11 de novembro de 2019.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira

Universidade Federal de Santa Catarina



Profª. Drª. Sandra Regina de Souza Teixeira Carvalho

Universidade Federal de Santa Catarina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me incentivaram e/ou contribuíram para minha formação, minha família, meus amigos e aos meus mestres.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ana Paula Martins Monteiro e Márcio da Silveira por todo carinho, amor e apoio proporcionado ao longo desta caminhada. Estes, sendo meu porto seguro apesar da distância durante os anos de graduação. Obrigado do fundo do meu coração, por nunca deixarem de acreditar em mim, obrigado pelos não's que eu ouvi, obrigado por todos exemplos, dedicação e esforço direcionado para minha criação.

Aos meus avós, Paulo Monteiro, Maria de Lurdes e Waldemar Silveira que me criaram quando criança e fizeram eu ter/sentir esse amor pelos animais desde muito cedo. Se hoje estou me formando nesse curso, devo tudo a eles por ter escolhido este caminho. Não esquecendo da minha avó Laura Maria da Silveira, hoje não se encontra entre nós, mas sabe da importância que teve em toda minha criação e educação.

Às minhas irmãs Aniele Monteiro e Maria Laura, por serem minhas melhores amigas desde quando nasci e, por me incentivarem a ser uma pessoa melhor me proporcionando o melhor presente que já recebi, sendo eles, meus afilhados Helena e Heitor.

Aos meus amigos de infância Bárbara Sulzbacher, Camila Pinho, Stéfani Krás, João Pedro Coelho, Marcelo Leffa, Thais Aloy e Iasmin Duarte, agradeço por tudo que passamos no tempo de escola, pois muito do que sou hoje, devo à esta etapa da vida e a vocês que estavam presentes.

Aos amigos que fiz ao entrar na faculdade e tornaram estes anos de graduação ainda mais agradáveis, dividindo alegrias, tristezas, apreensões e momentos únicos de diversão e descontração. Obrigado: Alexandra Pamato, Aline de Melo, Amanda Sofie, Bianka Roxana, Daniel Goetten, Emilaine Ferreira, Kamilla Santos, Redson Joaquim Júnior e todos os demais colegas que conheci no decorrer desta jornada.

Aos amigos que fiz ao chegar em Florianópolis e fizeram com que eu não me sentisse sozinho longe de toda a minha família e, acabaram se tornando uma segunda família. Obrigado: Evandro Machado Nunes, Ruy Bento Nunes, Nelzi Terezinha Machado Nunes, Henrique Machado Nunes e Eduardo Machado Nunes, obrigado de verdade,

pela amizade, carinho e acolhimento como se eu fosse um membro da família de vocês.

Aos professores que tive a oportunidade de conhecer ao longo desta jornada, em especial aos professores André Luís Ferreira Lima, Márcio Cinachi Pereira, Milene Puntel Osmari, Sandra Carvalho, Lucélia Hauptli, Daniele Kazama e Fabiano Dahlke por despertarem o meu interesse e vontade de aprender cada vez mais sobre diversas áreas relacionadas ao nosso curso e também por me inspirarem a ser uma pessoa muito melhor assim como eles são. Meu muito obrigado a estes mestres que carregarei para sempre em meus pensamentos, com tamanha admiração e afeto.

Aproveito também para agradecer ao pessoal do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal, obrigado André Righetto, Sara Citadin, Pedro Carvalho, Milena Lemes e principalmente à Aline, por toda a ajuda que me deu durante o desenvolvimento do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, pelo fomento ao projeto que viabilizou este trabalho.

Obrigado DEUS, por tudo que és e por tudo que possibilitas para mim. Obrigado!

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o intuito de identificar polimorfismos no gene da Tireoglobulina (TG), relacionado com a marmorização da gordura em bovinos da Raça Crioula Lageana, utilizando-se PCR-RFLP. O DNA genômico foi previamente extraído de amostras de folículos pilosos coletadas de 60 animais distribuídos na região de Lages-SC. Para isolar e amplificar a região correspondente ao éxon V do gene TG foram utilizados os iniciadores TGFWD 5' TCCCAGAGTTAGCCTCCAAG 3' e TGREV 5' TGAATGAGAGGTGGTGAGGTC 3'. Os amplicons obtidos de aproximadamente 700pb foram submetidos à digestão utilizando-se a endonuclease *Hinf-I*. Os resultados obtidos após a RFLP mostraram a existência de polimorfismo na região estudada, caracterizado por três padrões diferentes de migração de bandas observáveis em 57 amostras e correspondentes aos genótipos MM, Mm e mm. Pela contagem direta destes padrões polimórficos, as frequências genotípicas foram iguais a 0,561, 0,334 e 0,105 para MM, Mm e mm, respectivamente e as frequências alélicas foram iguais a 0,728 e 0,212, respectivamente. A aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada com teste de Qui-quadrado ao nível de 5% de significância, indicando que as frequências obtidas não estão em equilíbrio. Isto pode ser atribuído à existência de seleção natural / artificial nos animais avaliados. Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que foi possível identificar a existência de polimorfismos genéticos para o éxon V do gene TG em animais da raça Crioula Lageana utilizando-se a técnica de PCR-RFLP com a enzima *Hinf-I*.

Palavras-chave: *Bos taurus*, maciez da carne, marcadores moleculares, marmoreio, seleção.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da quantidade de bovinos por região brasileira.....	17
Figura 2 - O Uro europeu ou Auroque (<i>Bos taurus primigenius</i>).	19
Figura 3 - Touro Crioulo Lageano de pelagem africana preta. Variedade mocha. ...	20
Figura 4 - Vaca Crioula Lageana de pelagem africana vermelha. Variedade aspada.	20
Figura 5 - Escalas de marmoreio.....	23
Figura 6 - Exemplo de amostras de DNA extraído. Eletroforese em gel de agarose 0,5%.	30
Figura 7 - Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores TG, FWD e REV. Gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).....	31
Figura 8 - Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease <i>Hinf-I</i> . Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Maiores rebanhos bovinos do mundo.....	16
Tabela 2 - Condições da reação de PCR para amplificação do fragmento do gene da TG.....	27
Tabela 3 - Etapas da digestão da enzima <i>Hinf-I</i>	28
Tabela 4 - Frequências genóticas e alélicas observadas com padrões polimórficos de migração para o gene TG digeridos com a enzima <i>Hinf-I</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
BTA14	Cromossomo 14 de Bovinos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LEPGA	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal
MAS	Seleção Assistida por Marcador
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
QTL	Loci para Características Quantitativas
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TG	Tireoglobulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
	2.1 Objetivo geral.....	15
	2.2 Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
	3.1 Panorama da Bovinocultura Mundial e Brasileira.....	16
	3.2 Introdução da Raça Crioula no Brasil.....	18
	3.3 Origem da Raça Crioula.....	18
	3.4 Qualidade de Carne	21
	3.4.1 Marmoreio	22
	3.4.2 Melhoramento Genético e suas Tecnologias	23
	3.4.3 Tireoglobulina.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO.....	34
7	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que a população mundial encontra-se em constante crescimento e, para atender a alta demanda, faz-se necessário o aumento das produções alimentícias. Isto posto, a produção de bovinos mundial e nacional seguiram este crescimento. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) em 2018, o rebanho bovino mundial estava em torno de 1 bilhão de animais. Já no cenário nacional, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2018, o número de bovinos era maior que a população brasileira, sendo 232 milhões de bovinos e 210 milhões de pessoas.

Pode-se encontrar bovinos distribuídos por todos os continentes, sendo que os cinco maiores rebanhos são encontrados respectivamente, na Índia, Brasil, China, Estados Unidos e União Europeia, detendo mais de 70% dos animais ao redor do mundo (FARMNEWS, 2018). Já em relação à produção de carne bovina, o Brasil continua na segunda colocação, entretanto, o Estados Unidos torna-se o maior produtor. Com estas informações, pode-se ver que a bovinocultura de corte tem um papel muito relevante no cenário econômico do país, sendo o maior exportador de carne bovina *in natura* do mundo, tornando-se uma das principais atividades da economia brasileira, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2016).

Os bovinos chegaram ao Brasil na época do descobrimento, trazidos por colonizadores, inicialmente raças taurinas (*Bos taurus*) e após, raças zebuínas indianas (*Bos indicus*) (PEIXOTO, 2010). Atualmente, do número total de bovinos distribuídos pelo Brasil, 34% estão localizados na Região Centro Oeste, 22% na Região Norte, 17% no Sudeste, 12,5% no Nordeste e 12% na Região Sul (IBGE, 2018). Destes, mais de 80% do rebanho total são formados por raças zebuínas, devido a sua rusticidade e adaptação ao clima tropical do país.

Na região Sul, as características edafoclimáticas são diferentes da grande maioria do país, encontram-se temperaturas mais baixas e qualidades de pastagens com maiores valores nutricionais, permitindo então, a melhor adaptação de raças taurinas (EUCLIDES FILHO e EUCLIDES, 2010). O Crioulo Lageano é uma raça taurina, natural do Planalto Catarinense, especificamente do município de Lages, localizado no estado de Santa Catarina. São resultado da descendência de bovinos ibéricos, introduzidos no Rio Grande do Sul pelos países latinos, no processo de

colonização das Missões Jesuítas. Por volta de 1640, ocorreram invasões dos Bandeirantes e esses povos migraram para a região de Franca, no estado de São Paulo, porém, alguns animais acabaram se separando do grupo e ficaram pelas matas do Planalto Serrano. Anos depois, com o início da colonização da Serra Catarinense, vieram para a região o gado de Franca, cruzando com os bovinos que já estavam ali, dando origem à raça Crioula Lageana (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000). Estes animais passaram por um longo processo de seleção natural, adaptando-se às condições ecológicas da região, com invernos rigorosos, solos pedregosos, topografia acidentada e vegetação pobre (RIBEIRO *et al.*, 2003).

As raças taurinas, quando comparadas com raças zebuínas têm uma melhor qualidade de carne (FELÍCIO *et al.*, 1988). Dentre vários parâmetros relacionados à carnes de boa qualidade, a marmorização da gordura intramuscular ou marmoreio é uma característica bastante almejada nos cortes bovinos pelo mercado consumidor. Para auxiliar na caracterização da qualidade de carnes, diversas tecnologias já estão disponíveis, entre elas, a genotipagem dos animais com o uso de marcadores moleculares. A identificação de alelos que possam ser associados às características de interesse mostra-se como uma importante ferramenta auxiliar ao melhoramento genético animal.

Dentre os genes que podem exercer influência no marmoreio da carne está o gene do hormônio Tireoglobulina (TG), produzido na tireoide e que age como precursor dos hormônios T3 e T4 que, por sua vez, têm papel essencial no metabolismo lipídico dos animais (SHIN e CHUNG, 2007; CARVALHO *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Fornecer subsídios para programas de melhoramento genético que desejam identificar animais com potencial para produtos cárneos de qualidade.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar o fragmento correspondente ao éxon V do gene da TG, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos da PCR, utilizando a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);
- Verificar as frequências do gene.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama da Bovinocultura Mundial e Brasileira

A bovinocultura de corte é uma atividade de suma importância econômica e cultural para diversos países ao redor do mundo. De acordo com a FAO, em 2018 existiam aproximadamente 1 bilhão de bovinos distribuídos pelo mundo, destes, os maiores rebanhos são encontrados, respectivamente, na Índia, Brasil, China, Estados Unidos e União Europeia (Tabela 1). Já em relação à produção de carne, o Estados Unidos torna-se o maior produtor e o Brasil continua na segunda na colocação (FARMNEWS, 2018; ABIEC, 2016).

Tabela 1 - Maiores rebanhos bovinos do mundo.

País	Número de bovinos
Índia	305 milhões
Brasil	232 milhões
China	96 milhões
Estados Unidos	95 milhões
União Europeia	88 milhões
Argentina	53 milhões
Austrália	25 milhões
Rússia	18 milhões
México	16 milhões
Turquia	15 milhões

Fonte: Farmnews (2018).

No Brasil, o agronegócio é uma área que alavanca a economia do país, tendo em vista que o Produto Interno Bruto (PIB) seja R\$6,8 trilhões, o agronegócio representa sozinho, cerca de 22% deste valor, tendo um crescimento de 1,8% no ano de 2018, com tendência de continuar em ascensão nos próximos anos (IBGE, 2018). Isso deve-se, ao país ter boas condições climáticas e uma enorme área de terra com recursos hídricos e relevos favoráveis às práticas agrícolas.

Atualmente, o agronegócio representa mais da metade das exportações realizadas no Brasil. No ramo da bovinocultura de corte, o país é o maior exportador

de carne *in natura* do mundo, onde o número de bovinos no país ultrapassa a população humana, sendo respectivamente, 232 milhões de bovinos contra 210 milhões de pessoas (IBGE, 2018), tornando-se então, uma das principais atividades da economia brasileira (ABIEC, 2016).

A produção de bovinos destinados ao corte estende-se por todas as regiões do Brasil. Do número total de bovinos no país, 34% estão localizados na região Centro Oeste, 22% na região Norte, 17% na região Sudeste, 12,5% no Nordeste e 12% no Sul (IBGE, 2018) (Figura 1). Destaca-se Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), como os estados que tem maior representatividade na atividade de corte no país.

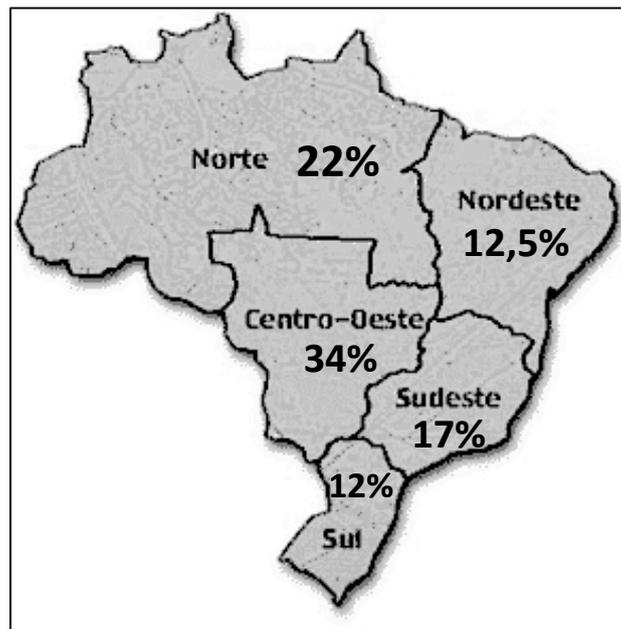


Figura 1 - Mapa da quantidade de bovinos por região brasileira.

Fonte: IBGE (2018).

Mais de 80% do rebanho nacional é formado por raças zebuínas (*Bos indicus*), raça de origem indiana, mais rústica e que se adaptam melhor ao clima tropical do Brasil. As principais raças existentes no Brasil são: Nelore, Gir e Guzerá (ABIEC, 2016). Já no sul do Brasil, as condições edafoclimáticas se distinguem das outras regiões do país, onde há temperaturas mais amenas e qualidades de pastagens com melhores valores nutricionais, permitindo então, a melhor adaptação de raças taurinas (*Bos taurus*), (EUCLIDES FILHO e EUCLIDES, 2010). Os bovinos taurinos que foram introduzidos no Brasil após o descobrimento podem ser divididos em três categorias,

sendo elas: raças Britânicas, Continentais e Crioulas. As raças crioulas foram as primeiras a serem introduzidas nas Américas durante o século XVI (MATEUS *et al.*, 2004).

3.2 Introdução da Raça Crioula no Brasil

Os primeiros lotes de bovinos chegaram ao Brasil em meados da terceira década do século XVI, acompanhando o início da colonização do país (PRIMO, 1993). Não se sabe ao certo, mas acredita-se que os primeiros exemplares vieram entre 1533 e 1534, por obra de Ana Pimentel, esposa de Martim Afonso de Souza, na região de São Vicente, no estado de São Paulo.

Já a introdução desse gado no sul brasileiro foi realizada por missionários jesuítas, acredita-se que entre os anos de 1620 a 1630, com a finalidade de suprir às demandas de alimento dos povos das Missões (ARAÚJO, 1990). No ano de 1636, as missões foram invadidas pelos bandeirantes e os povos jesuítas migraram para a região de Franca, no estado de São Paulo. Acredita-se que no decorrer desse trajeto, alguns exemplares se perderam da tropa e formaram rebanhos nas matas do Planalto Catarinense. Anos depois, com o início da colonização da Serra Catarinense, vieram para a região o gado Franqueiro, cruzando com os bovinos que na região estavam, assim, dando origem à raça Crioula Lageana (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000).

3.3 Origem da Raça Crioula

O gado Crioulo Lageano foi reconhecido pela portaria 1048 em 31 de outubro de 2008, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio dos esforços da Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), criadores da região e de instituições parceiras. Com este feito, foi possível registrar oficialmente a raça no Livro de Registro Genealógico.

Acredita-se que a raça Crioula seja descendente do Uro europeu (*Bos taurus primigenius*), denominado também como Auroque, no qual foi domesticado após o paleolítico (ROUSE, 1977). Os Auroques apresentavam características fenotípicas semelhantes à raça Crioula Lageana, com faces largas, cabeça grande, perfil reto e cornos enormes, com mais de um metro de comprimento (Ver figura 2). Segundo Alves (2004), a última fêmea dessa raça morreu na Polônia, em uma floresta no ano de 1627.

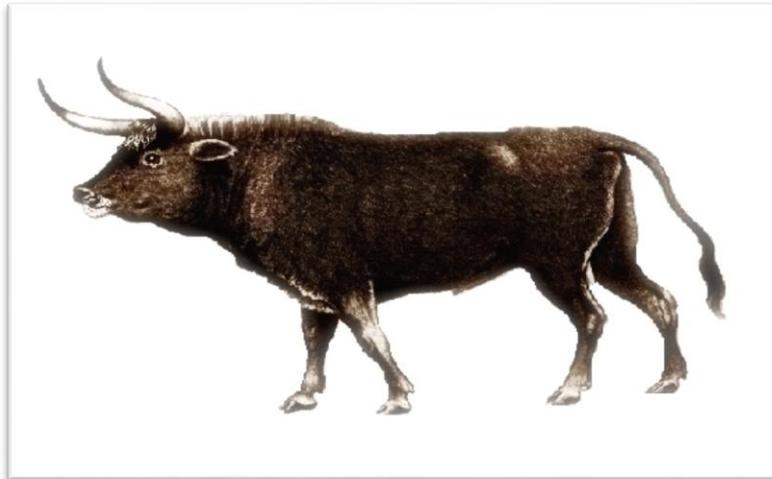


Figura 2 - O Uro europeu ou Auroque (*Bos taurus primigenius*).

Fonte: MARFigura 2 - O Uro

O gado crioulo do sul do Brasil, provavelmente tem como origem o tronco Ibérico (GOULART, 1965). Primo (2000), percebeu uma enorme semelhança entre o gado Crioulo Lageano com a raça Berrenda da Andaluzia, por suas aspás e pelagens semelhantes. De acordo com Athanassof (1957) e Goulart (1965), as raças crioulas brasileiras descendem de diversas raças portuguesas, como a Minhota, Arouquesa, Alentejana, e diversas outras. Mariante e Cavalcante (2006) reforçam a citação desses antigos autores, demonstrando que as raças crioulas brasileiras atribuem semelhanças com os bovinos baios de Portugal.

Os bovinos da raça Crioula Lageana apresentam perfil de cabeça retilíneo ou subconcavilíneo, mucosas pigmentadas escuras na maioria das vezes, orelhas redondas, pequenas e leves. Apresentam pele grossa e pigmentada, coberta de pelos que variam do branco até o preto (CAMARGO e MARTINS, 2005). Segundo Payne (1970), a raça apresenta mais de quarenta tipos de pelagens, podendo ser: africana vermelha e preta, sendo estas, as mais comuns (Ver figuras 3 e 4); baio ou preto; jaguané; oveiro vermelho, baio ou osco; brasino; baio; entre outras tonalidades de pelagens. Corroborando a estes resultados Carvalho (2019) descreveu 39 tipos de pelagens em Crioulos Lageanos, detectando uma pelagem até então desconhecida pela literatura, nomeada como berrenda.

Existem duas variedades da raça, a aspada e a mocha (Figuras 3 e 4). A primeira variedade apresenta longos chifres, sendo mais utilizada para turismo rural, exploração das tradições e culturas da região. A variedade mocha tem uma maior

finalidade comercial, pela facilidade do transporte e manejo (CAMARGO e MARTINS, 2005).



Figura 3 - Vaca Crioula
 marmoreio vermelha Variedade
 Fonte: MARTINS *et al.*, (2009).
 ostras
 de DNA extraído. Eletroforese em gel de
 agarose 0,5%.

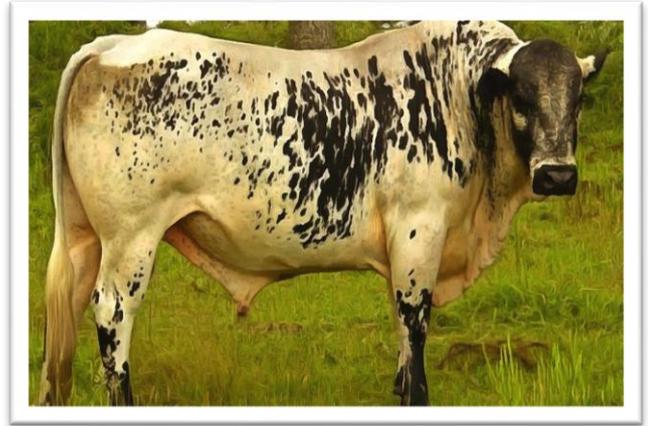


Figura 4 - Touro Crioulo Lageano de pelagem
 africana preta. Variedade mocha.
 Fonte: MARTINS *et al.*, (2009).

Seu corpo é de tamanho mediano, cilíndrico, com tórax medianamente profundo e costelas levemente arqueadas para trás. A conformação de garupa é boa, com inserção de cauda alta, expondo a região pélvica, tal característica que facilita na hora do parto. A massa muscular desses animais não é muito desenvolvida, devido à falta de seleção para esta característica (CAMARGO e MARTINS, 2005).

É denominada uma raça Crioula local, pois são indivíduos que evoluíram séculos por seleção natural, adaptando-se às condições climáticas, sanitárias e nutricionais da região onde se encontram (EGITO *et al.*, 2002), no caso desta raça, situam-se no Planalto Serrano, especificamente, no município de Lages - SC.

A raça é pouco explorada no setor agropecuário, mas apresentam características produtivas e reprodutivas interessantes para uma estratégia de avanço genético da raça, com a finalidade de melhorar seus índices zootécnicos (LUCHIARI FILHO *et al.*, 2006). São animais rústicos, com boa fertilidade, pouca dificuldade ao parto, boa produção leiteira e uma excelente habilidade materna. Tais características que são de extrema importância e interesse para programas de melhoramento (VEIGA *et al.*, 2009).

Giacomini (2006) pesquisou a idade à puberdade desta raça. Quando alimentadas com pastagem de inverno atingiram a puberdade aos 14 meses com

300kg e, quando foram mantidas apenas em campos naturais, atingiram esta característica aos 24 meses, com o mesmo peso vivo. Assim como Rosa (2016), no qual avaliou o crescimento e precocidade desses animais, uma característica de relevante interesse econômico, identificando o polimorfismo no gene de interesse. O desempenho reprodutivo desses animais é um fator muito importante que determina a eficiência total da produção de um rebanho (FORNI *et al.*, 2003).

Quando obtiveram respostas concretas dessas características, muitos destes animais foram cruzados com raças exóticas, ocasionando em uma grande queda da população de bovinos Crioulos Lageanos (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000). Atualmente, encontram-se em média 3000 exemplares dessa raça na região serrana de Santa Catarina. Tal quantidade já foi mais reduzida, fato este, que a FAO os colocou na lista de animais que corriam risco de extinção (CAMARGO e MARTINS, 2005).

3.4 Qualidade de Carne

Após a Revolução Industrial em meados do século XVIII e o aumento constante da população mundial (FAO, 2018), surgiu a necessidade de selecionar animais mais produtivos para que fossem atendidas às necessidades da população. A demanda por produtos de origem animal seguiu este crescimento. Um produto bastante procurado é a carne bovina e, esta carne necessita ter qualidade, tal requisito que até hoje está na mente do mercado consumidor (CHAVES *et al.*, 2017).

Com a necessidade de elevar seu padrão de vida, a pressão da população fez com que aumentassem as produções de carne e juntamente com isto, a qualidade da mesma (LAWRIE, 2005). Outro motivo gira em torno de algumas doenças que surgiram, como Encefalopatia Espongiforme Bovina, popularmente, a “doença da vaca louca”, febre aftosa e brucelose. Sabendo da preocupação em relação à estas doenças, o mercado consumidor passou a exigir um maior controle sanitário nas produções e uma carne de ótima qualidade (REZENDE e LOPES, 2004).

Felicio *et al.* (1988), relataram que bovinos de raças taurinas têm uma superioridade em relação às raças zebuínas quando se trata de qualidade de carne, principalmente no aspecto de maciez. Para selecionar os melhores animais, não basta apenas olhar o fenótipo e escolher aqueles que acredita-se que estão relacionados com uma carcaça de melhor qualidade, torna-se necessário muito estudo e medir diversas características da carcaça animal para chegar no resultado final e assim,

saber quais raças ou animais apresentam superioridade na característica almejada (ARAÚJO, 2002).

Ávila (2016) pesquisou e descreveu que o principal fator na tomada de decisão dos consumidores ao escolher o produto é o preço deste, sua aparência física e odor. Sabe-se que em muitos casos, produtos de baixo valor comercial não são de qualidades satisfatórias, porém, o conceito de qualidade de carne abrange diversas características, sendo elas: maciez, sabor, marmoreio, pH, capacidade de retenção de água, cor, textura, firmeza e distribuição e quantidade de gordura (EQUIPE BEEFPOINT, 2016).

3.4.1 Marmoreio

A deposição de gordura na carcaça bovina é classificada da seguinte maneira: gordura externa (subcutânea); interna (envolve órgãos e vísceras); intermuscular (envolve os músculos) e intramuscular (entremeada às fibras musculares). A ordem de deposição desta característica é realizada também nesta respectiva ordem.

A última gordura depositada, esta, não podendo ser separada da carne é denominada o marmoreio. É uma gordura que o consumidor sempre está buscando, pois está relacionada com características sensoriais da carne, proporcionando ao consumidor uma sensação de suculência no processo de mastigação (RAMALHO, 2016).

O marmoreio alcançou uma demanda muito forte pelo mercado consumidor. O que acontece é que se uma carne tem marmoreio, ela provavelmente tem uma boa procedência, podendo ser macia antes mesmo desse último acúmulo de gordura. Esses maiores níveis de marmoreio tem como consequência uma elevação no preço do produto final e os consumidores acabam pagando por este melhor produto (EQUIPE BEEFPOINT, 2013).

A gordura intramuscular pode ser mensurada no músculo *Longissimus dorsi* da carcaça dos animais, em uma escala de pontuação que vai do escore 1 até o 12 (Figura 5). O número 1 apresenta nível de marmoreio ruim; o número 2 apresenta marmoreio razoável; 3 e 4 são bons; de 5 a 7 o marmoreio está muito bom e do número 8 até o 12 os níveis de marmoreio são excelentes. Esta característica apresenta valores de herdabilidade médios a elevados, o que torna bastante positiva para os programas de seleção (SUGISAWA *et al.*, 2006).

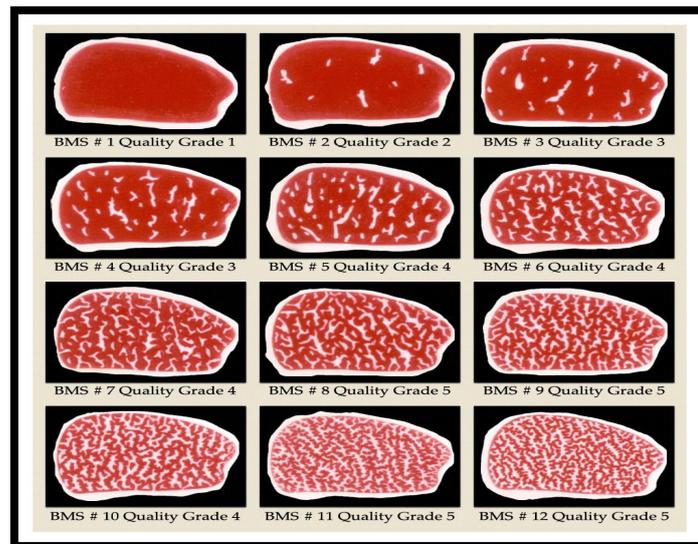


Figura 5 - Escalas de

Fonte: The Steak Guide.

Além das análises *post mortem*, ou seja, diretamente na carcaça dos animais recém-abatidos, é possível obter estimativas fenotípicas para marmoreio em análises *in vivo*, utilizando-se um algoritmo matemático que permita a regressão dos valores obtidos com imagens de ultrassonografia no espaço intercostal entre a 12^a e a 13^a costela dos animais (NUNES *et.al*, 2015).

3.4.2 Melhoramento Genético e suas Tecnologias

A descoberta da estrutura da molécula de DNA, realizada por James Watson e Francis Crick, no ano de 1953, possibilitou a abertura de diversos estudos e avanços tecnológicos relacionados ao melhoramento genético animal, assim, ocorrendo a descoberta da ciência genômica (EMBRAPA, 2016).

Diferentes técnicas foram criadas em todos estes anos de avanço da pesquisa, como por exemplo, tecnologias de análises moleculares da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referências nos cromossomos, estes, tecnicamente chamados de marcadores moleculares (GENÉTICA VIRTUAL, 2011).

A identificação dos animais ou raças podem ser realizadas via avaliações moleculares, no qual, os marcadores genéticos irão identificar os polimorfismos em genes específicos relacionados às características quantitativas, por exemplo, o marmoreio. A Seleção Assistida por Marcador (Marker Assisted Selection - MAS) é uma tecnologia aplicada em programas de seleção animal, no qual são detectados

loci para características quantitativas (QTL), podendo possuir efeitos positivos ou negativos para a característica de interesse (LÔBO *et al.*, 2007).

Geralmente, os marcadores usados nos programas MAS, estão associados aos QTL, sendo que a localização desses genes específicos torna-se mais fácil, pois sua ausência ou presença está associada à informação do marcador. Os estudos sobre a detecção de QTL via marcadores são baseados na segregação de indivíduos heterozigotos (DAVIS e DENISE, 1998).

Nos últimos anos estas tecnologias de sequenciamento e genotipagem em larga escala obtiveram crescimento de forma exponencial, gerando grandes impactos em pesquisa com diferentes rebanhos animais (KIJAS *et al.*, 2012). O método mais básico para genotipagem é baseado na técnica de PCR-RFLP (MAEDA *et al.*, 1989).

A técnica de PCR consiste em amplificar a região de interesse do DNA, ou seja, utiliza-se esta técnica para fazer milhares de cópias de um único pedaço de DNA. Para realizar esta técnica torna-se necessário o uso de DNAs iniciadores, estes conhecidos como *primers* e a utilização de uma enzima polimerase para que seja feita a replicação do DNA (CAETANO, 2009).

Posteriormente à PCR, torna-se possível a técnica de RFLP, descoberta por Botstein *et al.* (1980), sendo esta, uma das técnicas mais utilizadas com marcadores moleculares. Consiste no polimorfismo de tamanhos de fragmentos de restrições, tornando possível diferenciar indivíduos através de mutações pontuais que originam os SNPs (single nucleotide polymorphisms). Para que esta técnica seja realizada, são utilizadas enzimas de restrições que tem a função de clivar o DNA em diferentes pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são digeridos pela enzima, separados e visualizados em formas de bandas (RASMUSSEN, 2012)..

3.4.3 Tireoglobulina

A tireoglobulina (TG) é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelas células tireoidianas dentro do lúmen folicular (PARMA *et al.*, 1987). Este gene está localizado no cromossomo 14 em bovinos (BTA14), agindo como precursor dos hormônios T3 e T4, influenciando no metabolismo de lipídios, interferindo na diferenciação de adipócitos e também na deposição de gordura nos músculos (SHIN e CHUNG, 2007; CARVALHO *et al.*, 2012).

Em programas de melhoramento genético, a associação entre marcadores moleculares e a característica de produção a qual está sendo pesquisada, deve ser

avaliada na população a ser selecionada. Em alguns bovinos a região centromérica do BTA14 foi associada com deposição de gordura. O gene da TG encontra-se à 4,46 Mb no BTA14. Relatos contraditórios mostram que pode ocorrer a influência de um polimorfismo na sequência 5' desse gene sobre o marmoreio (EMBRAPA, 2006).

Barendse (1999) relatou que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene da TG estaria associado com o marmoreio em bovinos. Para confirmar esse estudo já realizado pelo mesmo, Barendse *et al.* (2004), novamente testaram esse polimorfismo na região 5' UTR do gene da TG e confirmaram que animais que apresentavam este polimorfismo teriam potencial para produção de carne com melhor qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 animais da raça Crioula Lageana pertencentes a diferentes propriedades de criadores do estado de Santa Catarina. As coletas ocorreram nos anos de 2015 e 2016, sendo possível realizar este projeto a partir da aprovação do Comitê de Ética com o Uso de Animais (CEUA / UFSC). Assim, foram coletadas manualmente 50 amostras de pelos da vassoura da cauda de cada animal contido previamente no brete. Após a coleta, o excesso de pelos foi cortado com tesoura em fios de aproximadamente 5 centímetros contendo os folículos pilosos. As amostras foram acondicionadas em pacotes plásticos vedados e identificados de acordo com a numeração do animal e fazenda onde viviam. Após a etapa de coleta, foi realizada a transferência do material para tubos de microcentrifuga (1,5mL), também identificados e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

A extração do DNA e análises posteriores foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, no município de Florianópolis – SC. Para a extração do DNA genômico utilizou-se a metodologia PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) adaptado de Lima (2003). Em cada microtubo contendo os folículos pilosos foram adicionados 500 μL de solução TE-TWEEN (Tris 50mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20), seguido de incubação em banho-maria a 65°C por 1,5 horas com agitação manual periódica. Após esta etapa, foram adicionados 15 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e as amostras foram incubadas novamente a 55°C por 6 horas, agitando-as por inversão a cada 30 minutos. Após este período de incubação foi realizado um overnight a 37°C .

Realizada a primeira etapa da extração, em seguida foi adicionado 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos passaram por agitação vigorosa durante 10 segundos em agitador automático tipo vórtex. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C , sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, este também identificado, gerando assim, um volume final de aproximadamente 300 μL .

A precipitação do DNA ocorreu com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 μL) e etanol absoluto gelado (1000 μL), realizando então a mistura por imersão, seguida de repouso durante 1,5 horas a -20°C , com uma

nova centrifugação a 12.000 rpm por 60 minutos a 4°C. O DNA remanescente após a precipitação foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido com 100 µL de água ultrapura e armazenado a 4°C até o momento das análises posteriores.

Com o intuito de verificar a eficácia da metodologia da extração, as amostras foram misturadas a 3 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%) com brometo de etídio, em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 50V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização da análise foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia), as imagens dos géis foram capturadas com software L-Pix Imagem Ex®.

O par de *primers* utilizado nas PCR'S foi desenhado de acordo com as informações disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), possuindo as seguintes sequências de nucleotídeos, respectivamente:

TG – Forward 5' – TCCCAGAGTTAGCCTCCAAG – 3'

TG – Reverse 5' – TGAATGAGAGGTGGTGAGGTC – 3'

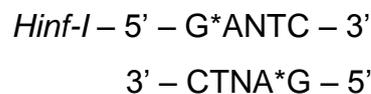
As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL por amostra, 100 ng de DNA, 0.5 mM de cada primer, 1 X PCR “buffer” [(10 mM Tris-HCl) (pH 9.0)], 1.5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 mM de dNTPS, 0,5 U da enzima EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, e seguiram as seguintes programações (Tabela 2):

Tabela 2 - Condições da reação de PCR para amplificação do fragmento do gene da TG.

Etapas	Reação de PCR (<i>Touchdown</i>)			
	1ª Etapa (10 ciclos)		2ª etapa (25 ciclos)	
	T °C	Tempo	T °C	Tempo
Desnaturação	96	5'	95	1'
Anelamento	66,1 (↓ 1°C/ciclo)	1'	56,1	1'
Extensão	72	1'	72	1'
Conservação			4	

T= Temperatura

Para verificar o resultado da amplificação, uma alíquota de 4 µL de cada amostra foi misturada a 4 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com brometo de etídio (0,05 µG/ml), utilizando tampão TBE 1X a 65V por aproximadamente 50 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix Ex® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram capturadas por meio do software L-Pix Imagem Ex®. Após o isolamento e amplificação da região de interesse do gene da TG pela PCR, as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. A enzima de restrição escolhida foi a *Hinf-I*, possuindo os seguintes sítios de corte:



A digestão foi realizada em um volume final de 20 µL por amostra, contendo 10µL do produto da PCR, 5 µL de tampão para a enzima de restrição, 0,5 µL da enzima *Hinf-I* e 4,5 µL de H₂O para completar o volume final de cada amostra. O procedimento foi realizado em termociclador Bimetra®. A digestão da enzima *Hinf-I* foi feita a 37°C por 60 minutos, posteriormente a 80°C por 20 minutos para inativação da enzima e, por último a 4°C para conservação das amostras até a próxima etapa (Tabela 3).

Tabela 3 - Etapas da digestão da enzima *Hinf-I*.

Etapas	T °C	Tempo
1ª etapa	37	60'
2ª etapa	80	20'
Conservação	4	

T= Temperatura

Para visualização do resultado, 8 µL de cada amostra foi misturada à 4µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) para realização da eletroforese em gel de agarose (2,5%) com brometo de etídio (0,05 µG/ml), em tampão TBE 1X a 80V por 1 hora. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix Ex® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas novamente com o auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

Após a detecção de polimorfismos nas amostras analisadas, foram realizados os cálculos das frequências genotípicas e alélicas e, posteriormente, realizado o teste

de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genóticas (X_{ii} , X_{ij} e X_{jj}) e alélicas (X_i e X_j) foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados e estabelecidas com as seguintes equações:

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \quad x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n}$$

$$x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n} \quad x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n}$$

Onde: n_{ii} , n_{jj} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos i e j , respectivamente; n corresponde ao número de indivíduos analisados.

A aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada pelo χ^2 , ao nível de 5% de significância a partir da expansão do binômio descrito por Falconer e Mckay (1996):

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que: x_i^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i ; $2x_i x_j$ = frequência esperada para heterozigotos ij ; x_j^2 = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico dos folículos pilosos mostrou-se eficiente (Figura 6), demonstrando que as amostras apresentam uma quantidade satisfatória de DNA genômico extraído. Porém, a maior parte das amostras apresentaram bandas arrastadas, isto indica, que provavelmente sejam sinais de degradação do DNA. A banda mais forte indicada no fim do padrão indica RNA (SALMAM e LAUREANO, 2006). Contudo, as presenças destes dois fatores não afetaram as análises posteriores de PCR e RFLP.

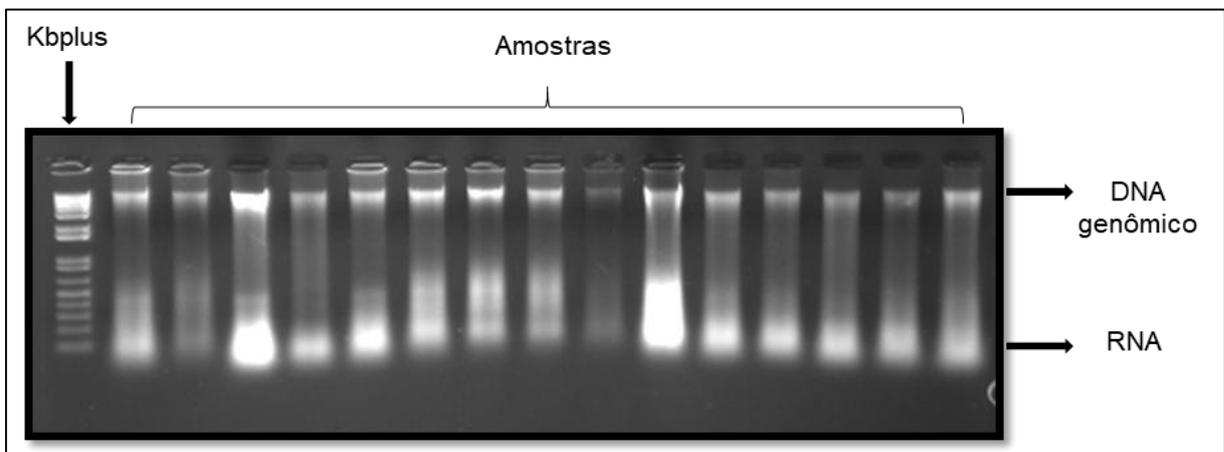


Figura 6 - Exemplo de amostras de DNA extraído. Eletroforese em gel de agarose 0,5% (Fonte: Autor próprio).

Os resultados obtidos nesta etapa de extração de DNA corroboram com o que Laureano (2006) e Oliveira (2017) encontraram em suas pesquisas, na qual utilizaram também a técnica adaptada de Lima (2003) para a extração de DNA de pelos de bovinos da raça Nelore.

Para garantir a melhor visualização e anelamento dos *primers* e eficácia da técnica, foi realizada o método de *PCR-touchdown*. Os fragmentos amplificados tinham em torno de 709pb, no qual indicam o funcionamento dos primers desenhados para a região estudada (Figura 7).

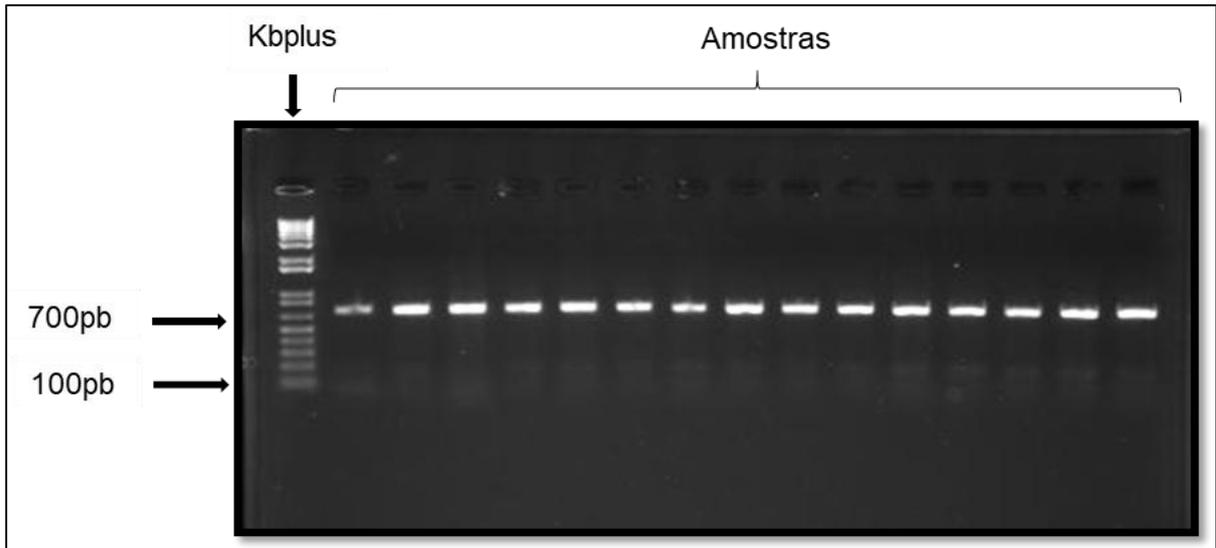


Figura 7 - Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores TG, FWD e REV. Gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®) (Fonte: autor próprio).

Com base nos resultados obtidos nesta etapa, tornou-se possível a realização da técnica de RFLP, onde as amostras continham apenas a região de interesse do gene da Tireoglobulina avaliada neste trabalho. Após digestão das 60 amostras com a enzima *Hinf-I*, foi possível identificar três padrões de migração de bandas distintos em 57 amostras, correspondendo respectivamente aos genótipos MM, Mm e mm, conforme ilustrado na Figura 8.

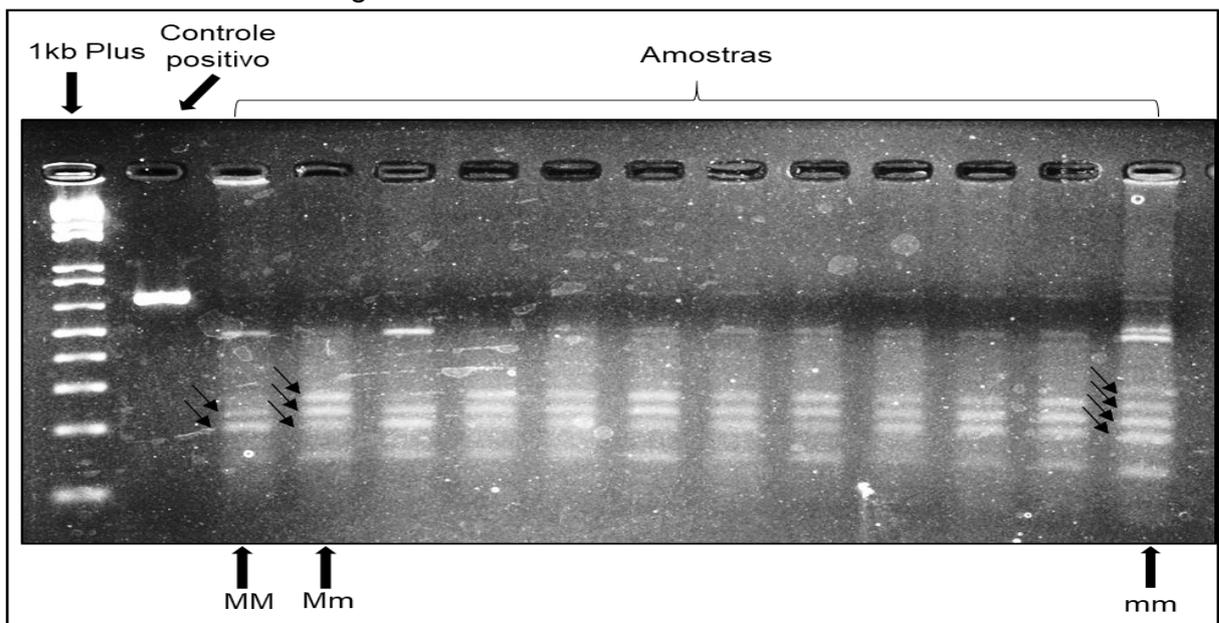


Figura 8 - Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease *HinfI*. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®) (Fonte: autor próprio).

Pela contagem direta dos padrões distintos de migração para a enzima *Hinf-I* nos 60 animais avaliados, foram calculadas as frequências genotípicas para os genótipos MM, Mm e mm, respectivamente. A partir destas frequências, foram calculadas as frequências dos alelos M e m, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências genotípicas e alélicas observadas com padrões polimórficos de migração para o gene TG digeridos com a enzima *Hinf-I*.

	Genótipos observados			Frequências
	MM	Mm	mm	alélicas *
Frequência	0.5614	0.3334	0.1052	f (M) = 0,7281
N	32	19	6	f (m) = 0.2719

*= significativo para teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg - χ^2 a 5% de significância

Os resultados obtidos com o teste de χ^2 ao nível de 5% de significância, mostram que as frequências observadas na região estudada nos animais avaliados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fato este, pode estar atribuído à existência de seleção natural / artificial nos animais avaliados. Hill e Robertson (1968); Liu (1998) relataram que a deriva genética destes animais, migração, mutação ou seleção natural e/ou artificial contribuem para alterações nas frequências alélicas a cada geração de animais. A obtenção de diferentes frequências nestes animais, torna-os passíveis à seleção para determinada característica pela existência de variabilidade genética encontrada.

Egito *et al.* (2004), analisaram o gene da TG em bovinos Crioulos Lageanos, detectando também, polimorfismos na região de interesse. Encontrando frequências genotípicas de 23% e 9% para os alelos homozigotos e 68% para o alelo heterozigoto. Já as frequências alélicas foram iguais a 43% e 57% para os respectivos alelos.

Analisando polimorfismos em bovinos derivados do acasalamento entre touros e vacas das raças Wagyu e Limousin, por meio de análise RFLP em diferentes genes, Wu *et al.* (2005), relataram que entre estes genes estava a TG e obtiveram como resultado, que todos os genes estudados contribuíram significativamente para a característica de marmoreio. Analisando também raças taurinas, Qian-Fu *et al.* (2008) utilizaram 271 animais das raças Simental, Angus, Charolês e Limousin, onde identificaram a presença de polimorfismo em regiões distintas do gene destes animais,

Barreto *et al.* (2012), analisaram o SNP no gene da TG em bovinos da raça Pantaneira, utilizando a enzima de restrição *Psu-I*. Esta raça também é naturalizada brasileira e adaptadas à região do Pantanal. Obteram como resultado, a presença do alelo em frequência superior a 57%, evidenciando o potencial de uma raça naturalizada para a produção de uma carne com maior qualidade e um maior valor comercial agregado.

Em contrapartida, em raças zebuínas alguns estudos mostraram o inverso. Siqueira *et al.* (2007), avaliaram as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo TG em touros de raça zebuína (Nelore), em raças taurinas adaptadas (Bonsmara, Caracu e Senepol) e em touros de raça taurina não adaptada (Angus), com a enzima de restrição *Mbo-I*, obtendo como resultado que nenhum dos touros da raça Nelore apresentaram o alelo favorável para o marmoreio, enquanto os touros de raças taurinas apresentavam polimorfismo para esta característica. Resultado este, está de acordo com o que Oliveira (2017) encontrou recentemente, onde suas amostras com a raça Nelore não apresentaram variação fenotípica para este gene utilizando a enzima *Xmn-I*. Contribuindo com estes resultados, Casas *et al.* (2005), analisaram também este polimorfismo no gene TG em bovinos da raça Brahman, no qual encontraram uma baixa frequência do alelo favorável para o grau de marmoreio.

6 CONCLUSÃO

A existência de polimorfismo para a região estudada do gene TG, que está relacionado ao maior teor de marmoreio, sugere que a raça Crioula Lageana possui variação genética para esta características e que, se esta variação estiver associada com as variações fenotípicas de marmoreio, este gene poderá ser um candidato à seleção assistida, resultando em animais com potencial para produtos cárneos de qualidade e maior valor agregado.

Sugere-se que pesquisas posteriores sejam realizadas a fim de concretizar este resultado, sabendo da importância da genotipagem destes animais para o melhoramento genético da raça, objetivando uma futura inserção dos mesmos como uma raça de produção destinada ao corte.

7 REFERÊNCIAS

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). **Pecuária Brasileira**. 2016. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp> Acesso em: 01 out. 2019.

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne). **Rebaho Bovino Brasileiro**. 2016. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp> Acesso em: 01 out. 2019.

ALVES, V. **Evolução filogenética dos bovinos autóctones portugueses**. In: Jornadas Técnicas de Raças Bovinas Autóctones, 2. Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal, 2004.

ARAÚJO, R. V. *Os jesuítas dos 7 povos*. Porto Alegre: **La Salle**, 1990. 467p.

ATHANASSOF, N. Manual do criador de bovinos. 6.ed. São Paulo: Editora Melhoramentos. 1957. 818p.

ÁVILA, T. S. **Perfil e Comportamento do Consumidor de Carne Bovina: Uma análise do Paraná e Santa Catarina**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BARENDSE, W. J. **Assessing lipid metabolism**. Int. WO 99/23248. US n. 638751. 23 Oct. 1998. 14 May 1999. Disponível em: <<http://ep.espacenet.com>> Acesso em: 19 out. 2019.

BARENDSE, W. J.; BUNCH, R.; THOMAS, M.; ARMITAGE, S.; BAUD, S.; DONALDSON, N. **The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle**. Australian Journal of Experimental Agriculture, Collingwood, VI, v. 44, n.7, p. 669-674, 2004.

BARRETO, C.; WALKER, C.; JULIANO, R.; RAMOS, A.; BARBOSA, E.; ALVES, A.; EGITO, A. A. **Polimorfismo de base única no gene da tireoglobulina relacionado ao marmoreio cárneo em bovinos da raça pantaneira**. Embrapa Gado de Corte – artigo, 2012.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 32(3), 314. 1980.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o mundo. **R. Bras. Zootec.** Viçosa, v. 38, n. spe, p. 64-71, 2009.

CAMARGO, M. A. R.; MARTINS, V. M. V. **Raça Crioula Lageana, um patrimônio genético.** *A Hora Veterinária*, Ano 24, n. 143, p. 61-64, janeiro-fevereiro/2005.

CARVALHO, T. D.; SIQUEIRA, F.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; MEDEIROS, S. R. **Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle**, R. Bras. Zootec. vol.41 no.10 Viçosa Oct. 2012

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNET, G. L.; CHAISE JR, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, IL, v. 67, n. 10, p. 2661-2668. 1989.

CHAVES, A. R. D.; LIMONI, B. H. S.; GOMES, M. D. N. B.; DUARTE, M. T.; BRIXNER, B. M.; SOARES, E. S. M. Raças bovinas e a qualidade da carne. **Anais X Mostra Científica**, p. 294-300, 2017.

DAVIS, G.H.; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 76, p. 2331-2339, 1998.

EGITO, A. A. de; ALBUQUERQUE, M. S.; MARIANTE, A. da S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2002. Londrina, PR. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p. 121-126.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Genômica e Melhoramento Genético em Bovinos.** 2016. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11466626/artigo-genomica-e-melhoramento-genetico-em-bovinos>> Acesso em: 10 out. 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Associação de marcadores moleculares do BTA 14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim.** 2006. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/47771/associacao-de-marcadores-moleculares-do-bta-14-com-espessura-de-gordura-em-bovinos-da-raca-canchim>> Acesso em: 17 out. 2019.

EQUIPE BEEFPOINT. **Marmoreio é a principal característica sensorial para a carne bovina.** Cadeia PRODUTIVA; Giro do Boi. 2013. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/marmoreio-e-a-principal-caracteristica-sensorial-para-a-carne-bovina>> Acesso em: 10 out. 2019.

EQUIPE BEEFPOINT. **Percepção de alguns atributos de qualidade da carne bovina segundo os consumidores:** Radares Técnicos. 2016. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/qualidade-da-carne/percepcao-de-alguns-atributos-de-qualidade-da-carne-bovina-segundo-os-consumidores-43075/>> Acesso em: 10 out. 2019.

EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P. B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de Corte.** Piracicaba: FEALQ, 2010. Cap. 2. p. 11-38.

FALCONER, D. S.; MCKAY, T. F. C.; **Introduction to quantitative genetics.** Longman Press, London, UK, 1996, 4 ed.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. **FAOSTAT.** 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/>>. Acesso em: 01 out. 2019.

FARMNEWS, 2018. **Maiores rebanhos bovinos em 2018, por país produtor.** Disponível em: <<http://www.farmnews.com.br/historias/maiores-rebanhos-mundiais/>> Acesso em 01 out. 2019.

FELÍCIO, P. E. de; CORTE, O. O.; PICCHI, V. Rendimentos de carcaça e de subprodutos de abate de novilhos das raças Nelore e Pitangueiras de dois grupos etários. In: **Anais XI Congresso da Soc. Bras. Ciênc. E Tec. De Alim**, p. 109, 1988.

FORNI, S.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G. Análise genética da característica dias para o parto em bovinos da raça Nelore. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v. 11, n. 3. p. 143-148, 2003.

GENÉTICA VIRTUAL. 2011. Tópicos Extras. **Marcadores Moleculares**. Disponível em: <<http://www.geneticavirtual.webnode.com.br/genetica-virtual-home/topicos-extras/marcadores-moleculares/>> Acesso em: 17 out. 2019.

GIACOMINI, K. **Puberdade em novilhas da raça Crioula Lageana**. 85p. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias. Lages, SC. 2006.

GOULART, J. A. **Brasil do Boi e do Couro**. Edições GRO. Rio de Janeiro, 1965. A expansão para o Sul, p.44-63.

HILL, W. G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova York, v. 33, p. 226-231, 1968.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2018. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 out. 2018.

KIJAS, J. W.; LENSTRA, J. A.; HAYES, B.; BOITARD, S.; NETO, L. R. P.; SAN CRISTOBAL, M. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. **PLoS Biol**, v. 10, n. 2, p. e1001258, 2012.

LAUREANO, M. M. M. **Polimorfismos nos genes da Prolactina e do IGF-I em bovinos da raça Nelore**. *Dissertação* (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2006.

LAWRIE, R. A. A Qualidade Sensorial da Carne. In: LAWRIE, R. A.. **Ciência da Carne**. 6. ed. Cambridge: Artmed, 2005. Cap. 10, p. 249.

LIMA, S. P. G. **Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino em rebanhos Nelore selecionados para o peso pós-desmama**. *Dissertação* (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2003.

LIU, B. H.; **Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 611, 1998.

LÔBO, R. N. B.; LÔBO, A. M. B. O. **Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte**. Belo Horizonte – MG: Embrapa, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/247_000fy349pxy02wx5ok0pvo4k3d1s30wt.pdf> Acesso em: 17 out. 2019

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no Brasil, qualidade, quantidade ou ambas. **Simpósio sobre desafios e novas tecnologias na bovinocultura de corte-SIMBOI**, v. 2, 2006.

MAEDA, M.; MURAYAMA, N.; ISHII, H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**, v. 34, n. 5, p. 290-298, 1989.

MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília, Embrapa Sede/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 232p.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. 2 ed. Brasília: Embrapa Sede, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 272p.

MARTINS, V. M. V.; VEIGA, T. F.; MARTINS, E.; QUADROS, S. A. F.; CARDOSO, C. P.; RIBEIRO, J. A. R. **Raça Crioula Lageana: o esteio do ontem, o labor do hoje e a oportunidade do amanhã**. Lages: Ed. ABCCL, 2009.

MATEUS, J. C. et al. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 35, n. 2, p. 106-113, 2004.

NUNES, J.L., PIQUEREZ, M. et al. **Beef quality parameters estimation using ultrasound and color images**. BMC Bioinformatics, v.16(supl.4):S6, 2015.

OLIVEIRA, P. P. de. **Avaliação das características obtidas por ultrassom e a associação do uso de marcador molecular para o marmoreio em bovinos da raça Nelore**, 2017.

PARMA, J.; CHRISTOPHE, D.; POHL, V.; VASSART, G. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence for intron loss and "exonization" during Evolution. **J. Mol. Biol.** 1987; 196:769-79.

PAYNE, W. Y. **A Cattle production in the tropics**. London: Longman, 1970. V. 1.

PEIXOTO, A. M. Raças de bovino de corte que interessam no Brasil. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. cap. 4, p. 55-73.

PRIMO, A. T. Os bovinos ibéricos nas Américas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p. 183-199.

PRIMO, A. T. **The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals**. In: Global Conference on Conservation of Domestic Animal Genetic Resource, 5. 2000. Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

RAMALHO, R. **Marmoreio da Carne: carne vermelha**. Disponível em: <<http://www.carnenossa.blogspot.com.br/2010/08/marmoreio-da-carne.html>> Acesso em: 19 out. 2019.

RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. **Denmark: Institute Of Biological Psychiatry**, Mental Health Centre Sct. Hans, S/D. 2012.

REZENDE, E. H. S.; LOPES, M. A. **Identificação, certificação e rastreabilidade na cadeia da carne bovina e bubalina no Brasil**. Lavras: UFLA, 2004. 39 p. (Boletim Agropecuário, 58).

ROSA, V. L. da. **Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da raça Crioula Lageana**. 2017.

ROUSE, J. E. ***The Criollo: Spanish cattle in the Americas***. Oklahoma: University of Oklahoma Press, 1977. 303p.

SALMAN, A. K. D.; LAUREANO, M. M. M. **Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pelo de bovinos**. Embrapa Rondônia, Circular técnica, v. 87, 2006.

SHIN S, CHUNG E (2007) **Association of SNP marker in the thyroglobulin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle**. Asian-Aust. J Anim Sci 20: 172-177.

SIQUEIRA, F.; TORRES JUNIOR, R. A. A.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; SILVA, L. O. C.; SOARES, C. O.; EUCLIDES FILHO, K.; ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, G. M. S.; OLIVEIRA, R. M. Determinação das frequências alélicas e genotípicas do gene da tireoglobulina em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE CARNES, 4. 2007, Campinas, SP. **Mercados do século XXI qualidade, segurança alimentar, certificação e rastreabilidade**: anais. Campinas, SP: ITAL: CTC, 2007. p. 295-297.

SÓ BIOLOGIA. **Técnica de PCR, Fragmentos de DNA**. 2008. Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/PCR.php>> Acesso em: 17 out. 2019.

STEAK GUIDE. **Steak Guide I: Best types of steak, characteristics & cuts**. August 31, 2018. Disponível em: < <https://www.gentlemansgazette.com/steak-guide/>>. Acesso em: 10 out. 2019.

SUGISAWA, L.; SOARES, W. R. M. 2006. **Ultrassonografia para predição da composição da carcaça de bovinos jovens**. Revista Brasileira de Zootecnia, 35, p. 177-185.

VEIGA, T. F. A. Raça Crioula Lageana: percepções em relação às possibilidades de sua exploração na região do Planalto Catarinense. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 1, 2009.

WU, X. L.; MACNEIL, M. D.; DE, S.; XIAO, Q. J.; MICHAL, J. J.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; WRIGHT JR, R. W.; JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. **Genetica**, The Hague, v. 125, n. 1, p. 103-113, 2005.