

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREAS: SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO E AMBIENTE

ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL
CATEGORIA: DISSERTAÇÃO

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA COMO INDICADOR
DE MARMOREIO EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL**

Nancy de Freitas Fadel

MARÍLIA - SP
2023

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA COMO INDICADOR
DE MARMOREIO EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL**

ALUNA: Nancy de Freitas Fadel
ORIENTADORA: Prof^a. MD. PhD. Isabela Bazzo da Costa
COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Leticia Peternelli da Silva

Trabalho de conclusão de Mestrado Profissional apresentado à Universidade de Marília – UNIMAR, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS – Área: Produção Animal.

MARÍLIA - SP
Junho de 2023

UNIVERSIDADE DE MARÍLIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA
CERTIFICAÇÃO DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA COMO INDICADOR
DE MARMOREIO EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL**

ALUNA: Nancy de Freitas Fadel

ORIENTADORA: Prof^a. MD. PhD. Isabela Bazzo da Costa

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Leticia Peternelli da Silva

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do Título de MESTRE –
ÁREA: PRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Prof^a. MD. PhD. Isabela Bazzo da Costa

Prof. Dr.

Prof. Dr. Rodolfo Cláudio Spers

Marília, 23 de junho de 2023.

Presidente da Comissão Examinadora
Prof^a. MD. PhD. Isabela Bazzo da Costa

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NANCY DE FREITAS FADEL – nascida em 14 de abril de 1979, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, é nutricionista formada pela Universidade de Marília - UNIMAR, Curso de Nutrição, graduada em janeiro de 2008. Possui curso de especialização em Nutrição Clínica pela Universidade do Oeste Paulista, 2010, especialização em Nutrição Esportiva pela Universidade de Marília, 2015. Discente do Programa de Mestrado Profissional em Saúde Animal, Produção e Ambiente pela Universidade de Marília – UNIMAR, 2022. Atua nas áreas de nutrição clínica e esportiva em clínicas privadas desde 2008, desenvolve projetos de mentoria em nutrição e desde 2012 é docente no curso de nutrição da Universidade Paulista – UNIP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, repleta de saúde, proteção; por sempre me guiar, me permitindo seguir de cabeça erguida por honra a suas bênçãos em todas as minhas vitórias.

Ao meu filho Lucas Freitas Fadel, de quem tenho tanto orgulho, que desde o primeiro instante de vida despertou em mim um amor incondicional. Eu te amo, meu filho, meu eterno menino! Obrigada por sua compreensão pois em toda essa trajetória de vida profissional houve a necessidade de muitos momentos ou até dias de ausências e dedicação, mas nenhum em que eu não preferisse estar com você.

Ao meu marido Silter Fadel, meu parceiro de vida; que há mais de 27 anos está ao meu lado, me acolhendo em seus braços com tanto amor e respeito. Querido, meus mais sinceros e profundos agradecimentos a ti. Muito obrigada por me enxergar melhor e mais forte do que penso que sou, por me incentivar a buscar cada vez mais meu enriquecimento pessoal, pelos sonhos vividos e realizados juntos, por tudo o que faz e fizeste por mim, por nós e pela nossa família. Que nossa história continue sendo traçada com fé e esperança e que possamos juntos continuar a realizar nossos planos.

Aos meus anjos de quatro patas, a todos que fizeram e fazem parte da minha vida minha eterna gratidão, por tanto amor e alegrias dados a mim e à minha família.

A querida e linda Prof^a. MD. PhD. Isabela Bazzo da Costa, pelo privilégio de ter sido minha orientadora; pela honra em me permitir ser seu orientada; e assim juntas desenvolver esse trabalho, que foi desde o início tão prazeroso e se tornou muito enriquecedor na minha trajetória.

Gostaria de agradecer a todos os professores dessa instituição de ensino que me acolherem com grande carinho e respeito, compartilhando de forma tão generosa seus conhecimentos e vivências. Aos queridos professores do

Programa, Prof. Dr. Rodolfo, Prof. Dr. Carlos, Prof. Dr. Lucas, Prof^a. Dr^a. Patrícia, Prof. Dr. Daniel, Prof^a. Dr^a. Cláudia, Prof. Dr. Fábio, Prof. Dr. Marcílio, Prof. Dr. Raul, em especial à minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Leticia Peternelli da Silva; a todos que tive o privilégio de conhecer e de estarem presentes em nosso desenvolvimento acadêmico atual.

Aos meus colegas de turma de pós-graduação, que tornaram esse período ainda mais agradável, nas trocas de experiências durante nossa convivência; por todo carinho e respeito; pôr em mesmos, nas diversas áreas de cada um, de forma multidisciplinar, nossa jornada tornaram-se incrível.

ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE DA LEPTINA COMO INDICADOR DE MARMOREIO EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL

RESUMO

Estudos realizados na área da biotecnologia animal em referência ao rebanho bovino proporcionou o mapeamento do genoma dos *Bos Taurus*. Os avanços possibilitaram a observância de mutações gênicas sobre herdabilidade com a oferta de dados que permitiram a associação no uso de marcadores moleculares com finalidades importantes para identificar a segregação de caracteres nas progênes. A pecuária moderna visando a implementação de seleção gênica em seus plantéis, visa se beneficiar na utilização destes marcadores impactando de forma positiva na produtividade, lucratividade e associação de atributos qualitativos a carcaça animal, viabilizando a produção de carne *gourmet* diante da necessidade de um mercado consumidor mais exigente. Dentre os genes e seus polimorfismos de nucleotídeos únicos a leptina se destaca pois, encontra-se intrinsecamente ligada a deposição de gordura presente nos tecidos de revestimento e marmoreio, estes possíveis de serem associados à qualidade da carne no que rege as características organolépticas. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo identificar a expressão gênica dos polimorfismos do gene da Leptina e sua relação com marmoreio em animais selecionados da raça Senepol, utilizando 62 garrotes PO (puros por origem), com a extração do DNA obtidos dos pêlos da vassoura da cauda, utilizando a técnica da PCR- RFLP e utilização dos primers de acordo com o *GenBank*. Os resultados obtidos demonstraram que os produtos amplificados foram digeridos, e nas amostras analisadas; pode-se verificar a existência da variante alélica da Timina (T) foi expressa na maior parte dos testes presente em 58 amostras, onde destas; 45 eram homozigotos TT e 13 heterozigotos TC e somente 4 amostras não expressavam esta forma alélica sendo homozigotos CC, afirmando a presença expressiva do polimorfismo da leptina nos animais raça Senepol, pressupondo a sua maior aptidão para o marmoreio.

Palavras-chave: Expressão gênica, Leptina, polimorfismos, Marmoreio.

ANALYSIS OF THE POLYMORPHISM OF THE LEPTIN GENE AS AN INDICATOR OF MARBLE IN BOVINE OF THE SENEPOL BREED

ABSTRACT

Studies carried out in the area of animal biotechnology in reference to the bovine herd provided the mapping of the *Bos Taurus* genome, advances made it possible to observe genetic mutations on heritability with the provision of data that allowed the association in the use of molecular markers with important purposes to identify the segregation of characters in the progenies. Modern livestock, aiming at the implementation of genetic selection in their herds, aims to benefit from the use of these markers, positively impacting productivity, profitability and association of qualitative attributes with the animal carcass, enabling the production of gourmet meat in the face of the need of a consumer market more demanding. Among the genes and their single nucleotide polymorphisms, leptin stands out because it is intrinsically linked to the deposition of fat present in the coating tissue and marbling aspects, which are likely to be associated with the quality of the meat in terms of organoleptic characteristics. In view of this, the present study aimed to identify the polymorphisms of the Leptin gene and its relationship with marbling in selected animals of the Senepol breed, using 62 PO tourniquets, with the extraction of the DNA obtained from the hairs of the tail broom, using the technique of PCR-RFLP and use of primers according to GenBank. The obtained results demonstrated that the amplified products were digested, and in the analyzed samples; it can be verified the existence of the allelic variant of Thymine (T) was expressed in most of the tests present in 58 samples, where of these; 45 were TT homozygotes and 13 TC heterozygotes and only 4 samples did not express this allelic form being CC homozygotes, confirming the expressive presence of the leptin polymorphism in the Senepol animals, assuming their greater aptitude for marbling.

Keywords: Gene expression, Leptin, polymorphisms, Marbling.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel de agarose demonstrando a presença de DNA genômico em algumas amostras dos animais identificados de acordo com a sequência numérica.....26
- Figura 2.** Gel de agarose de parte dos resultados das análises de PCR com os primers escolhidos para o polimorfismo do gene Leptina27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística realizada entre o grupo de animais que a expressaram o Alelo T.....	27
---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 . Certificado de aprovação CIAEP-01.0218.2014 pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Marília – UNIMAR do trabalho, conforme as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA); de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, sob o protocolo 013/202237

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

AOL: Área de olho de lombo

Arg: Arginina

BamHI: Enzima de restrição

°C: Graus Celcius

CAP-Unimar: Centro de Avaliação e Performance – Universidade de Marília

C: Citosina

CEUA: Comitê de Ética em Uso Animal

Cys: cisteína

cm: centímetro

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EGS: Espessura de gordura de subcutâneo

FIV: Fertilização *in vitro*

GS: seleção genômica

GWAS: Estudos de Associação Genômica Ampla

IA: Inseminação Artificial

ID: Numeração do animal

LEP: Leptina

MAR: marmoreio

MAS: marcadores moleculares

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

MN: Monta Natural

PCI: fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PO: Puro por origem

RFLP. polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP)

rpm: Rotações por minuto

SAM: Seleção Assistida por Marcadores

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SSr : *Simple sequence repeats*

TBE: Tris-HCl, EDTA e Ácido Bórico

TE-TWEEN: Tris, EDTA e Tween 20

TE: Transferência de embriões

T: Temperatura em graus Celsius

T: Timina

U: Unidade

V: Volts

Xmnl: Enzima de Restrição

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivo específico	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal- CEUA.....	22
4.2 Animais avaliados.....	22
4.3 Coleta de material para extração de DNA.....	22
4.4 Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS	31
8. ANEXOS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados na área da biotecnologia animal, em referência ao rebanho bovino, passou por expansão a partir do século XXI com o advento do mapeamento genético de bovinos (*Bos taurus*), que em 2005 teve sua primeira publicação, apresentando cerca de 2.670,15 milhões de pares de bases gênicas (OLIVEIRA JÚNIOR; PERES; FERRAZ, 2017). Estes estudos possibilitaram obter informações que, aliadas a evolução tecnológica, estabeleceram a observância de mutações gênicas que puderam ser consideradas em cada nova geração, possibilitando determiná-las como marcadores moleculares estes caracterizados como elementos úteis para identificação na segregação de caracteres hereditários e em ensaios posteriores, onde puderam ser sequenciados e depositados em bancos de dados públicos; painéis constituídos de mais de 50 mil marcadores foram apresentados e empregados na produção de um mapa da diversidade dos bovinos (DJARI et al., 2013; KADARMIDEEN; ROHR; JANSSE, 2006).

No que se refere às mutações, as modificações mais presentes na cadeia dos ácidos desoxido nucleotídeos (DNA) foram determinadas como polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP), que se baseiam na troca de apenas uma das bases nitrogenadas Adenina, Guanina sendo estas bases púricas Citosina e Timina bases pirimídicas presentes na cadeia da molécula de DNA, possibilitando assim; pesquisas entre Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) e a Seleção Genômica (GS). Tais evidências demonstraram a estabilidade da presença de algumas variações gênicas pressupondo que a determinação de SNP poderiam ser relevantes para algumas raças *Bos taurus* ou populações considerando o ponto de vista fenotípico (OLIVEIRA JÚNIOR; PERES; FERRAZ, 2017; HAWKEN et al., 2013; REGITANO; VERONI, 2009).

A pecuária moderna visando a implementação de programas de melhoramento genético do rebanho de corte, se beneficia da inclusão do conhecimento desenvolvido através da avaliação de alguns genes e seus MAS, originando ferramentas tecnológicas a fim de otimizar as seleções genéticas em plantéis; impactando de maneira positiva no viés da produtividade,

lucratividade e atributos da carne bovina além de; caracterizar progêneses mais homogêneas (BRIDI; CONSTANTINO, 2011; MENEZES et al., 2005).

O conceito de qualidade da carne é muito amplo com variâncias diversas, pois está associado isoladamente ou em conjunto a fatores intrínsecos e extrínsecos que regem não apenas as propriedades organolépticas, mas também aos quesitos sanitários. Possibilitando relacionarmos a seleção da raça, manejo nutricional eficiente, precocidade, composição da carcaça animal; presença de reações bioquímicas pertinentes ao período *post mortem* onde há influências de ações enzimáticas e pH são relevantes, bem como a adequação sobre as técnicas de conservação da carne relativas à ação da temperatura e armazenamento (NOGUEIRA, 2007; SIQUEIRA et al., 2007).

Porém, um consenso é efetivo e está ligado a presença do depósito de tecido adiposo nos bovinos, visto que é necessário como atrativo a definição qualitativa, podendo este ser observado nos aspectos de cobertura da carcaça mensurados de forma global ou em cortes específicos e a variância no grau marmoreio (MAR) em cortes comercializados. Podendo segundo as referências desempenhar maiores experiências sensoriais aos consumidores, sendo este um desafio no mercado da bovinocultura extensiva (BRIDI; CONSTANTINO, 2011; THOMPSON, 2004).

O Brasil se destaca comercialmente por ser competitivo no mercado de exportação de carne *commodity*, mas nas últimas duas décadas sofreu a pressão em aderir a exigência dos mercados consumidores de carne bovina *premium* no território internacional e nacional. Tal tendência se expande diante da alta velocidade de informação presente por meio das redes sociais e comerciais disponíveis. O consumidor busca produtos de alta qualidade sendo esse valor baseado não apenas por componentes nutricionais e salubre, mas incluindo os caracteres de maciez e palatabilidade capazes de proporcionar maior prazer de consumo, exercendo impactos diretos na pecuária de corte e na forma de comercialização desta matéria prima (SEBRAE, 2023)

A produção de carnes *gourmet* é atrativo para o segmento da criação de gado de corte que buscam desenvolver produtos que agregam melhor valor de mercado, mas que estão dispostos a investir em pacotes tecnológicos. A adesão dos frigoríficos e estabelecimentos comerciais, também são uma

crescente, sem descumprir os padrões relacionados à segurança alimentar, a prática pode ser vista pela adoção de empresas que buscam comercializar cortes específicos não tradicionais a cultura local, como pode ser visto através do *Cube roll* retirado do Bife ancho e *Strip Loin* proveniente do Contra filé; agregando a linhas de produção selos internacionais de certificação que regulamenta e reconhece cortes cárneos com elevado índice gastronômico, gerenciando assim a padronização da produção (BEEFPOINT, 2018; NOGUEIRA, 2007).

Com isso, a seletividade do grupo genético escolhido na utilização da prática da criação extensiva de gado se torna de suma necessidade, porém além do genótipo é necessário considerar a interação nas expressões de seus caracteres sofrem e os meios de produção bem como a interação com o ambiente. Diante disso, o suporte a nutrição eficiente e adequação no abate se tornam de extrema necessidade, para a expressão fenotípica e a produção de carnes nobres uma vez que há diferenças marcantes nas carcaças de diferentes genótipos em uma mesma raça, podendo determinar fenótipos mais ou menos apreciados (MENEZES et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2007).

Vários genes foram previamente identificados em pesquisas com bovinos como possíveis responsáveis pelos atributos da carne de corte, dentre estes, o hormônio leptina (LEP) está diretamente associado com metabolismo de lipídios, podendo assim, se relacionar com o MAR (marmoreio) e a deposição de gordura subcutânea; possibilitando desenvolver estudos pertinentes às mutações do gene LEP validando como um marcador a ser considerado (NKRUMAH et al., 2007; KOOHMARAIE et al., 2003; KOWALSKI et al., 2014). Diante do exposto, no presente trabalho, o objetivo foi analisar a possível expressão do marcador LEP associando ao MAR em animais bovinos da raça Senepol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Características de “gourmetização” vêm sendo associadas à carne do gado Senepol (*Bos taurus taurus*), raça taurina de clima tropical com grande adaptabilidade a clima quente, rusticidade e alta taxa de conversão alimentar, fomentada por bovinocultores em território brasileiro; capaz de proporcionar aos comensais um produto superior com características de extremamente maciez, tenacidade e palatabilidade (BRIDI; CONSTANTINO, 2011; FADEL, 2022).

Tais atributos conferem a aceitação no mercado consumidor *gourmet*, agradando a paladares exigentes que buscam prazeres gastronômicos, portanto, a utilização da raça em programas de melhoramento genético atinge os padrões necessários para o seguimento de seleção e conseqüentemente na agregação de valores, seja para o gado puro ou em cruzamento industrial, proporcionando elevado padrão de carcaça vigente segundo especialistas, apresentado nos requisitos: perímetro do músculo *Longissimus dorsi* ou Área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura de subcutâneo (EGS), marmoreio (MAR), maciez e valores influenciados pelo pH superior a 5,8 (SILVA; BORDIN; BUENO, 2019; SIQUEIRA et al., 2007; SURITA et al., 2018).

A incorporação de tecnologias que podem ser utilizadas no âmbito da busca para reduzir a variação da qualidade da carne é uma necessidade vigente, para isso, proporcionar a evolução em programas de seleção animal, dentre estes o uso da rastreabilidade dos MAS associados com caracteres na produção animal; permitindo então a antecipação de avaliações e a incorporação em programas de seleção em índices de desempenho superiores para rebanhos de corte (MARTINEZ et al., 2002; REGITANO et al., 2009).

Segundo Vignal e colaboradores (2002), os avanços nos sistemas de sequenciamento automatizado de ácidos nucleicos permitiram que diferentes animais de uma mesma espécie fossem comparados, utilizando a presença de marcadores genéticos estando relacionados às variações individuais, onde estes podem ser transmitidos de gerações para gerações; colaborando para a evolução no desempenho da progênie. Estas seriam resultantes de mutações que podem ser decorrentes de substituições, deleções e adições de nucleotídeos, que, uma vez caracterizadas constituem polimorfismos de

nucleotídeos (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs), pois mesmo existindo diferentes padrões de deposição de gordura em EGS e MAR; que contribuem para a maciez da carne dentre as raças, a variação mais expressiva é aquela que ocorre em bovinos de uma mesma raça.

A adoção de técnicas de extração e análise do DNA, incorporados ao uso de teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e o método que nos permite a amplificação de determinadas regiões da cadeia dos ácidos desoxido nucleicos de um espécime e determinam as posições genômicas que correspondem à característica desejada, visto o caso do MAR (REGITANO et al., 2009).

A metodologia aplicada a avaliação de marcadores é realizada com a identificação dos polimorfismos de tamanho do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP), marcadores do tipo microsatélite (*simple sequence repeats* – SSR) e polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP) (MARTINEZ et al. 2000; SIQUEIRA et al. 2007).

A premissa na Seleção Assistida por Marcadores (SAM) e ou MAS, validadas por meio da análise de polimorfismos localizados em genes candidatos; que desempenham alguma função biológica de interesse e posteriormente a inclusão destes, em painéis de SNPs; são instrumentos a serem considerados na priorização do melhoramento de raças *Bos Taurus* incluindo o Senepol, reduzindo as diferenças na padronização da carne produzida nacionalmente (BARENDSE, 1999; FADEL, 2022; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; KIM; MISRA, 2007).

Vários genes puderam ser previamente identificados como possíveis responsáveis por virtudes da carne de corte, sendo considerado o gene leptina que criptografa a LEP; uma proteína-hormona de 16 quilodáltons (kDa) sintetizada pelos adipócitos em mamíferos, que de forma direta em estudos se relaciona a reserva energética corporal. Revisões comprovam que sua secreção plasmática está intrinsecamente equiparada a quantidade de reserva orgânica deste tecido. Nos bovinos, a secreção da LEP foi validada como promotora de fatores qualitativos a carcaça pois ocasiona um maior deposição de gordura, apresentadas no aspecto de revestimento e MAR (AHANI, et al., 2012; KONONOFF, et al., 2005).

Análises sobre este gene e seu papel biológico afirmaram sua influência sobre a ingestão alimentar e conseqüentemente o balanço energético além de abranger aspectos positivos sobre o sistema imunológico e fertilidade dos animais. Pesquisas neste vértice realizadas com algumas raças bovinas apontam que as secreções deste hormônio estão relacionadas com a carga genética paterna, o que confere diferenças significativas a composição corporal da progênie (BERG et al., 2003; NKURUMAH et al., 2005; RICHARDSON et al., 2004).

Mutações presentes no gene LEP ou seu promotor já foram descritos anteriormente, associados às distinções existentes no soro dos bovinos ruminantes de diferentes raças, sexo e idade, transcorrendo a variantes alélicas no DNA, sendo passíveis de proporcionar modificações no eixo fisiológico desta proteína (KONFORTV et al., 1999). Dentre as expressões alélicas observadas, os polimorfismos foram identificados nos éxon 2 e 3 do gene LEP, sendo significativa a ocorrência na transição da citosina (C) para uma timina (T); que codificou uma mudança no perfil de aminoácidos da LEP, originando a substituição de uma molécula de arginina (Arg) para uma cisteína (Cys) - (Arg25Cys), este identificado no éxon 2. Tal variante pode ser relacionada a maior retenção adiposa às carcaças de bovinos. Abordando concerne a Cys adicional existente no alelo T e seu mecanismo fisiológico na molécula de LEP decorrente da alteração da ligação dissulfeto, promoveu repercussões otimizadas entre a ingesta alimentar e deposição de gordura; permitindo pressupor que o alelo T estivesse associado a carcaças fenotipicamente mais gordas e o alelo C a carcaças mais magras (BARENDSE, 2003, BUCHANAN et al., 2002).

A aplicação do MAS no cenário global é relevante para a seleção de características economicamente importantes associados a rebanho nacional, a fim de alcançar um produto mais rentável e eficiente consistindo em uma ferramenta de identificação dos melhores animais e permitindo a evolução dos ganhos genéticos das gerações, impulsionando a eficiência produtiva da pecuária (SOUSA et al., 2017).

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do polimorfismo do gene da Leptina em bovinos da raça Senepol, evidenciando sua presença e correlação com o marmoreio.

3.2 Objetivos específicos

Apresentar dados genéticos que possam ser correlacionados a qualidade da carne em decorrência do marmoreio, proporcionando informações capazes de auxiliar no processo de melhoramento e produtividade animal, realizados diante a extração do DNA genômico de bovinos da raça Senepol, confirmando a existência dos polimorfismos do gene da leptina, possibilitando sua utilização para a seleção de plantéis da raça.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal – CEUA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Marília, conforme as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA); de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009; através de CERTIFICADO identificado como CIAEP-01.0218.2014 e sob o protocolo 13/2022 (Anexo 1).

4.2 Animais avaliados

Foram avaliados e utilizados 62 novilhos da raça Senepol, Puros por Origem (PO), sendo estes animais pertencentes à prova de ganho de peso do Centro de Aperfeiçoamento e Performance da Universidade de Marília (CAP-UNIMAR), realizado durante os meses de outubro a novembro de 2022 na Fazenda Experimental da Universidade de Marília. Os animais experimentados são oriundos de técnicas reprodutivas diversas como Monta Natural (MN), Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), Transferência de Embriões (TE) e Fertilização *in vitro* (FIV).

Os animais estiveram sendo conduzidos sob regime alimentar em manejo intensivo de criação e seleção, tendo como principal fonte de alimento a silagem de milho. Os suplementos minerais eram balanceados para cada categoria específica e fornecidos a partir de cochos distribuídos pelos piquetes.

4.3 Coleta de material para extração de DNA

Após os animais serem predispostos em tronco de contenção, houve a coleta manual de amostras de pêlos da vassoura da cauda dos mesmos, foram retiradas frações de aproximadamente 25 pêlos por vez, e coletados aproximadamente cerca de 50 pêlos de cada animal. Após a coleta o excesso dos pêlos foi aparado com tesoura, restando fios de aproximadamente 5 cm com a presença dos folículos pilosos. As amostras estavam acondicionadas em envelopes próprios individualizados, vedados e devidamente identificados de acordo com a numeração do animal (ID), acondicionados na sequência para transporte em recipientes térmicos sem necessidade de criopreservação e em

seguida encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Marília – UNIMAR.; onde as extrações do DNA foram realizadas. Após devida recepção, confirmações de identificações, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga (1,5mL), também devidamente identificados e mantidos a -20°C até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA genômico, foi utilizada a técnica PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) adaptada de Lima (2003). Em cada microtubo contendo os folículos pilosos foram adicionados 500 µL de solução TE-TWEEN (Tris 50 mM, 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 está etapa, houve a adição 15 µL de proteinase K (20 µg/µL); as amostras foram incubadas novamente a 55°C por 6 horas, sendo necessária aplicar agitação por inversão a cada 30 minutos.

Após o período de incubação foi realizada uma reação *overnight* a 37°C. Nesta primeira etapa da extração, adicionou se 1 volume de PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos passaram por agitação vigorosa em agitador automático tipo vórtex, por durante 10 segundos. Posteriormente foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm a 23°C, por 10 minutos; onde o sobrenadante existente foi transferido para um novo tubo; este também devidamente identificado, gerando 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), sendo realizada a mistura através de imersão, seguida de repouso durante 1,5 horas a 20°C; e novamente realizou a centrifugação 12.000 rpm a 4 °C pelo tempo de 60 minutos. Onde 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 subsequentes.

No intuito de verificar a eficácia da metodologia da extração, as amostras ficaram misturadas a 3µL de tampão de corrida (azul de bromo-fenol, 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 realizada transcorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Foto

documentação L-Pix EX® (*Loccus Biotecnologia*), sendo as imagens dos géis capturadas com o software L-Pix Imagem Ex®.

4.4 Amplificação do material genético

O par de *primers* utilizado nas reações de PCR foram desenhados de acordo com as informações disponíveis no *GenBank*, possuindo as seguintes sequências de nucleotídeos:

LP - Forward 5' – CCGAACACCAGAAAGTGCAG - 3'

LP – Reverse 5' – GGGACGGGGACTTACCATTG - 3'

As reações de PCR realizadas em volume final de 25µL por amostra, continham 2µL de DNA genômico, 0,5µM de cada primer, tampão PCR 1X, 0,5µM de MgCl₂, 100µM de dNTPS, 0,75U EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®). Onde os ciclos de amplificação do material genômico deram se por meio de Termociclador Biometra®.

Para verificar o resultado da amplificação da amostra, uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi adicionada a 3µL de tampão de corrida (azul de bromo-fenol, xileno-cyanol e glicerol) e por fim, submetida à eletroforese em gel de agarose a 2,0% com brometo de etídio (0,05 µg/ml), utilizando tampão TBE 1X a 70V por cerca de 70 minutos. O gel foi visualizado através aplicação de luz ultravioleta em Sistema de Foto documentação L-Pix EX® (*Loccus Biotecnologia*) e as imagens capturadas por meio do software L-Pix Imagem Ex®.

Após o isolamento e amplificação da região de interesse do gene da Leptina pela PCR, as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. Onde a enzima de restrição endonuclease XmnI foi à escolhida, apresentando os seguintes sítios de corte:

XmnI - 5' -GAANN*NNTTC – 3' 3'CTTNN*NNAAG – 5'

A digestão transcorreu em volume final de 20 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 10 unidades

das enzimas BamHI e XmnI. O procedimento realizado através de termociclador Biometra®. A digestão da enzima XmnI transcorreu por 15 minutos a 37°C e posteriormente a 65°C por 20 minutos para sua inativação, sendo por fim; as amostras levadas a conservação sob a temperatura de 4°C até momento da foto documentação.

Para a visualização do resultado, houve necessidade da adição de 7µL de cada amostra e 3µL de tampão de corrida (azul de bromo-fenol, xileno-cyanol e glicerol), decorrendo novamente a realização do sistema de eletroforese em gel de agarose (2,5%) com brometo de etídio (0,05 µg/ml), em tampão TBE 1X a corrente de 70V, por cerca de 1 hora e 40 minutos.

A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Foto documentação L-Pix EX® (*Loccus Biotecnologia*) e as imagens registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas para os resultados do possível polimorfismos do gene da Leptina identificado, transcorreu através da utilização do teste Qui-quadrado pelo Software R.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apresentado na Figura 1, pode-se afirmar que a técnica de extração de DNA genômico escolhida para desenvolvimento desse estudo, mostrou-se eficaz. As amostras que se apresentaram positivas no padrão de migração das bandas no gel de eletroforese confirmaram uma quantidade satisfatória de DNA extraído. Os resultados obtidos na extração estão de acordo com os estudos de Laureano e colaboradores (2006), os quais também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) para extração de pêlos da cauda de bovinos novilhos.

Na figura 1 pode se constatar a presença de DNA genômico nas amostras dos animais identificados de acordo com a sequência numérica, onde de 1 a 5 e 7 a 8 apresentaram o material genético procurado. Apenas a amostra 6 se apresentou negativa, podendo ser associado por possível deficiência na técnica de extração de DNA, sendo excluída e novamente experimentada.

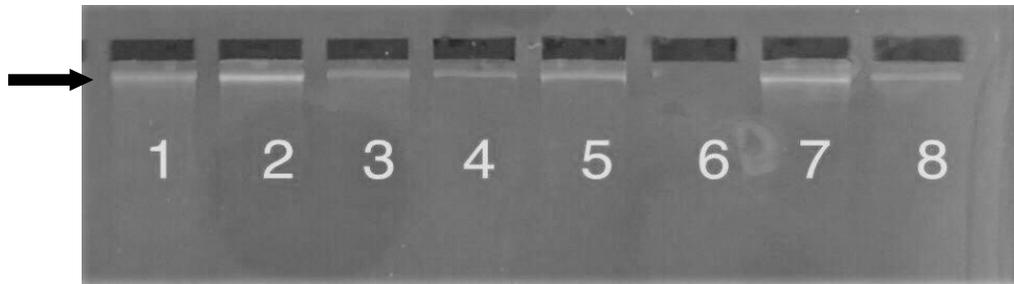


Figura 1. Gel de agarose com DNA genômico

Já nas análises de amplificação do material genético com o anelamento dos primers do polimorfismo da leptina, os fragmentos apresentaram bandas positivas em 709pb, indicando o funcionamento dos primers desenhados para a região estudada, conforme demonstrado na Figura 2.

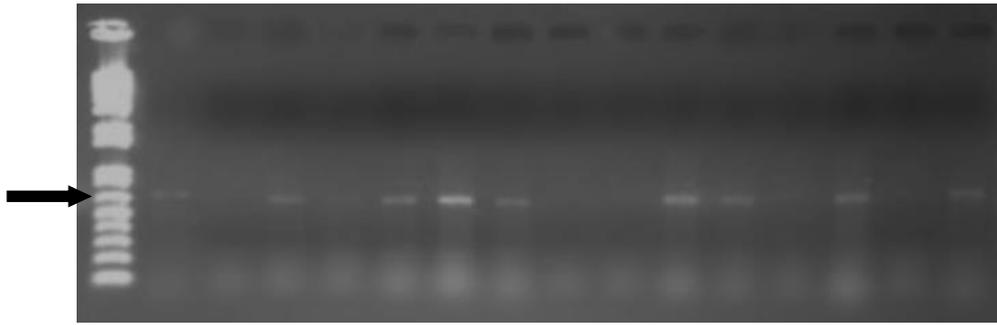


Figura 2. Gel de agarose e os primers do gene leptina

A partir dos resultados obtidos através da técnica de PCR foi possível a realização da PCR-RFLP, onde as amostras continham apenas a região de interesse do gene da Leptina e esta foi digerida através da ação da enzima XmnI, conforme descrito anteriormente na metodologia de execução desse trabalho.

Os resultados obtidos demonstraram que os produtos amplificados de PCR foram digeridos, nas amostras analisadas; pode-se verificar a existência do alelo T em 58 amostras, onde destas; 45 eram homocigotos TT e 13 heterocigotos TC e somente 4 amostras não expressavam esta forma alélica sendo homocigotos CC. Os dados se mostraram estatisticamente diferentes quando comparados entre eles, em relação à presença ou ausência desta expressão do alelo T (Tabela 1), confirmando, portanto, a contribuição significativa do polimorfismo do gene leptina estudado para a análise da característica de marmoreio em novilhos da raça Senepol.

Teste binomial					
	Alelos	N° amostras	Total amostras	Proporção	Valor de p
Polimorfismo	TT	45	62	0,726	< 0,001
	TC	13	62	0,210	< 0,001
	CC	4	62	0,065	< 0,001

Nota: A proporção H_a é $\neq 0,5$

Tabela 1. Demonstrativo da análise estatística realizada da comparação entre os grupos de animais que expressam o alelo T, como característica do polimorfismo do gene Leptina.

Acrescentando conhecimento aos estudos do genoma bovino, Nkrumah e colaboradores (2007) relacionaram seu trabalho às características genóticas e fenóticas de novilhos reprodutores *Bos Taurus Taurus* de diferentes raças cujo o objetivo estava embasado na avaliação sérica da LEP, o desempenho e mérito das carcaças, corroborando em seus achados com a composição corporal e concentrações plasmáticas da LEP, onde nos animais estudados; a raça Angus apresentaram valores 20 % maiores quando comparados aos animais Charolês, tal resultado pode ser apresentado levando em consideração a variância significativa entre as raças, o que difunde o interesse em estudos inter-racial para o hormônio e seus SNPs, como pode ser visto nos trabalhos de Azari e pesquisadores (2012), Fortes e colaboradores (2009), que diante das variáveis alélicas raciais puderam concluir a segregação destes caracteres, a qual demonstra a necessidade da escolha de raças, que sejam capazes de expressar genotipicamente os indicadores mais favoráveis a LEP, na busca de fatores associados a qualidade da carne.

Diversificados polimorfismos estiveram associados ao gene LEP e sua expressão fisiológica, no estudo realizado por Buchanan e colaboradores (2002) com a seleção de touros de corte das raças Angus, Hereford, Charolês e animais mestiços do rebanho bovino canadense, onde foi possível a observância de caracteres fenotípicos distintos em relação a deposição de gordura, sendo possível discernir a existência da transcrição alélica T e adição do aminoácido Cys ao gene LEP, afirmando a existência do SNP entre as diferentes raças, porém Sesma et al (2010) além de correlacionar a existência alélica, propõe que uma mesma raça poderia apresentar expressões do mesmo polimorfismos em porcentagens divergentes no plantel, concluindo a necessidade de seleção gênicas de animais que manifestam caracteres produtivos a qualidade da carne, sendo de extrema relevância os achados apresentados em nosso estudo com bovinos selecionados da raça Senepol.

A despeito de pesquisas que relacionam a presença dos polimorfismos da LEP e produtividade e rentabilidade os autores Kulig e Kmiec (2009) declaram aspectos positivos relacionados à presença de alelo T que evidenciam melhores índices de peso corporal e ganho médio diário em heterozigoses CT/CT, quando comparados com os indivíduos CC/CT e CC/CC,

considerando a metodologia realizada em animais ainda jovens, enquanto que Liefers et al 2002 observa a relação da fertilidade e sua associação aos indicadores presentes; enquanto Knonoff e colaboradores (2005) discutem sobre a uniformidade de carcaças com maior retenção adiposa, estabelecido com a amostragem de quatro variantes alélicas e expressão de positividade para a transcrição de T. Desta maneira os resultados contribuem para solidez de discussões na associação da seleção MAS na bovinocultura moderna.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste estudo, através de confirmação da presença do polimorfismo do gene Leptina e sua correlação com adiposidade em MAR em bovinos da raça Senepol, a aplicabilidade no uso de MAS na formação de plantéis mais selecionados pode ser uma realidade associada aos pacotes tecnológicas de interesse econômico; contribuindo para evolução da raça Senepol e a pecuária de corte, proporcionando decisões assertivas no processo de seleção genética dos rebanhos, trazendo lucratividade e sustentabilidade aos projetos de pecuária moderna.

7. REFERÊNCIAS

- AZARI, A.; HASANI, S.; HEIDARI, M.; YOUSEFI, S.. Genetic polymorphism of leptin gene using PCR- PFLP method in three different populations. Slovak Journal . Anim. Science., v.45, p. 39-42, 2012.
- BEEFPOINT;<<https://www.beefpoint.com.br/carne-1953-recebe-certificacao-internacional-de-qualidade/> 19 de julho de 2018>. Acesso em: 08 mai. 2023.
- BARENDSE, W. J.. Assessing lipid metabolism. Int. WO 99/23248. US n. 638751. 23 Oct. 1998, 14 May 1999.
- BARENDSE, W. J.. DNA: Markers for meat tenderness. US 20040115678, 8 Feb. 2002, 5 Nov. 2003.
- BERG, E. P.; MACFADIN, E. L.; MADDOCK, K. R.; GOODWIN, R. N.; BASS, T. J.; KEILER, D. H.. Serum concentrations of leptin in six genetic lines of swine and relationships with growth and carcass characteristics. Journal. Animal. Science. 81:167–171, 2003.
- BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M.. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetic Selection Evolution, Les Ulis Cedex, v. 34, n. 1, p. 105-116, 2002.
- BRIDI, A.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M. A. Qualidade da carne de bovinos produzidos em pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL A PASTO, 1, Anais. Maringá/SIMPOPASTO, 2011, Maringá, Paraná, p 311-332. 2011.
- DJARI, A.; ESQUERRÉ, D.; WEISS, B.; MARTINS, F.; MEERSSEMAN, C.; BOUSSAHA, M.; KLOPP, C.; ROCHA, D.. Gene-based single nucleotide

polymorphism discovery in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. *Unité Génétique Animale et Biologie Intégrative, BMC Genomics* 2013.

FADEL, S. A. O. Uso de marcador molecular para a avaliação de marmoreio em bovinos da raça Senepol. 2022. Tese de dissertação (Mestrado em produção animal)- Universidade de Marília- Unimar. Marília, 2022.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 220, 1998.

FORTES, M. R. S.; CURI, R. A.; CHARDULO, A. L.; SILVEIRA, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, H. N.. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genetics and Molecular Biology*, v.32, p.75-82 , 2009.

HAWKEN, R. J.; ZHANG, Y. D.; FORTES, M. R. S.; COLLINS, E.; BARRIS, W. C.; COBERT, N. J.; WILLIAMS, P. J.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R. G.; WALLELEY, J. R. W.; BARENDSE, W.; JOHNSTON, D. J.; PRAYAGA, K. C.; TIER, B.; REVERTER, A.; LEHNERT, S. A.. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *Journal of animal Science*, v.90, p.1398-1410, 2012.

KADARMIDEEN, H. N.; ROHR, P. von; JANSSE, L. L. G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mammalian Genome*, v. 17, n. 6, p. 548-564, 2006.

KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 9, p. 289-320, 2007.

KONFORTOV, B. A.; LICENCE V. E., MILLER J.R., Re-sequencing DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon, *Mamm. Genome* v.10, p. 1142 -1145, 1999.

KOOHMARAIE, M.; VEISETH, E.; KENT, M. P.; SHACKELFORD, S. D. Understanding and managing meat tenderness. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 40., 2003, Santa Maria. Otimizando a produção animal: anais. Santa Maria: SBZ, 2003.

KONONOFF, P. J.; DEOBALD, H. M.; STEWART, E. L.; LAYCOCK, A. D.; MARQUESS, F. L. S.. The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. *Journal. Animal. Science.* v. 83, p. 927–932, 2005.

KOWALSKI, L. H.; FREITAS, J. A.; FERNADES, S. R.; JUNIOR, P. R.; FERNADES, J. I. M.; SILVA, M. G. B.. Leptina e grelina na produção animal de ruminantes. *Revista de Ciências Agrárias* v. 37, p. 375-383, 2014.

KULING, H.; KMIEC, M. Associação entre polimorfismo do gene leptina e características de crescimento em bovinos Limousin. *Jornal russo de Genética.* v. 45 , ed. 6, p.738-741, 2009.

LIEFERS, S.C.; PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; LENDE. V. D.. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* v. 85, p.1633-1638, 2002.

MARTINEZ, M.L; MACHADO, M.A; FERREIRA, A.M. Biotecnologia na pecuária: genética molecular. *Informe Agropecuário*, v.21, n.204, p.67-78, 2000.

- MARTINEZ, M.L; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, Campo Grande. Anais, p.48-57, 2002.
- MENEZES, L. F. G.; RESTLE, J.; VAZ, F. N.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; FREITAS, A. K. de; METZ, P. A. M. Composição física da carcaça e qualidade da carne de novilhos de gerações avançadas do cruzamento alternado entre as raças Charolês e Nelore, terminados em confinamento. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG, v. 34, n. 3, p. 946-956, 2005.
- MENEZES, G. R. O., NIETO, L. M., ROSA, A. N., NOBRE, P.R. C., SILVA, L.O. C., GONDO, A. Tendências genéticas para características de carcaça ao sobreano na raça Nelore - Programa Embrapa - Geneplus. Anais, X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. Uberaba, Minas Gerais, 2013.
- NOGUEIRA, K. L. A influencia de raça, sexo, idade ao abate sobre a qualidade da carne do Nelore e Bradford. Tese (Dissertação de Mestrado)- faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.
- REGITANO, L. C. A.; MÉO-NICIURA, S. C.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal. 1. ed. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 66 p., 2007.
- REGITANO, L. C. A.; VENERONI, G. C.; Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos, SP, 22 e 23 de junho, 2009.
- RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F.. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. Aust. J. Exp. Agric. 44:441– 452, 2004.

SIQUEIRA, F.; TORRES J., R. A. A.; REGITANO, L. C. A.; FEIJÓ, G. L. D..
Genética Molecular Aplicada à Qualidade da Carne Bovina, 2007.

SILVA, AL; BORDIN, R.A; BUENO, R.. Atributos relacionados à carne do gado Senepol; Characteristics attributes to Senepol beef cattle. Revista Tekhne e Logos, Botucatu, SP, v.10, n.1, 2019.

SEBRAE;<<https://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/artigos/home/confiradicas-e-acompanhe-a-tendencia-dascarnes%20gourmet,e09c950896157810VgnVCM1000001b00320aRCRD>>. Acesso em: 08 mai. 2023.

SESMA, B. R.; MORENO, A. J. R.; NAZAR, P. M.; HERNÁNDEZ, R. H.; LLAVEN, M. A. O.; RUIZ, R. P.. Polimorfismos del gen de leptina en sementales bovinos pardo suizo Leptin gene polymorphisms on sires cattle brown swiss. Quehacer Científico en Chiapas. v.10, p. 30-33, 2010.

SOUSA, I. I.; MAIUMI, I.; BLECHA, Z.; MACIEL, S.; BEATRIZ, A.; FERREIRA,R.; LUÍS, G.; FEIJÓ, D.; FAVERO, R.; SANTIAGO, G. G..Embrapa Gado de Corte, Universidade Federal do Mato Grosso; GADO. Genes LEP e TG com características de qualidade de carne e carcaça em bovinos da raça Canchim; Genes with beef and carcass quality characteristics in Materiais e Métodos Resultados e Discussão. v. 5, p. 3–5, 2017.

SURITA, L. M.; FERREIRA, J. R.; SILVA, L. G. P.; LIMONI, B. H. S.; DUARTE, M. J.; MORAIS, M. G.; GOMES, M. N. B.. Avaliação de características de carcaça em bovinos de corte por ultrassonografia de em tempo real . Anais da XI amostra científica FAMEZ/ UFMS, ANAIS DA XI MOSTRA CIENTÍFICA FAMEZ / UFMS, Campo Grande – MS, 2018.

THOMPSON, J. Key influencer of meat quality. Armidale feeder steer School, Armidale, session 5^a, p.46-53, 2004.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal –CEUA



CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal

CERTIFICADO CIAEP-01.0218.2014

Certificamos que o projeto intitulado “**Análise do polimorfismo da leptina como indicador de marmoreio em bovinos da raça Senepol**” (Protocolo 13/2022), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Isabela Bazzo da Costa, que envolve produção, manutenção e /ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA.

Vigência do projeto	20/09/2022 a 20/03/2023
Espécie/linhagem	Bovino
Número de animais	60
Peso / Idade	100kg/ 6 meses
Sexo	Machos

Marília, 15 de Setembro de 2022,

Profa. Dra. Cláudia Sampaio Fonseca Repetti

Coordenadora do CEUA

