

Avaliação da influência dos polimorfismos genéticos do gene da
Leptina sobre o peso das carcaças de bovinos cruzados de
aptidão cárnica

Dissertação

Curso de Mestrado em Agricultura Sustentável

André Filipe Cordeiro Churra

Orientadores:

Rute Guedes dos Santos – (Orientador Interno)

Luís Alcino Pinto Monteiro da Conceição – (Co-Orientador)

Elvas, 2017

ANDRÉ FILIPE CORDEIRO CHURRA

Avaliação da influência dos polimorfismos genéticos do gene da
Leptina sobre o peso das carcaças de bovinos cruzados de
aptidão cárnica

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Agricultura
Sustentável conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre.

Orientador: Rute Isabel Duarte Guedes dos Santos

Arguente principal: Maria Inês Alves de Carvalho Martins Carolino

Arguente: Maria da Graça Teles de Sousa Pacheco de Carvalho

Presidente do Júri: Noémia do Céu Machado Farinha

Classificação: 16 valores

Escola Superior Agrária de Elvas

2017

Agradecimentos

Não é fácil nem justo individualizar os agradecimentos sob pena de nos esquecermos de alguém em particular. No entanto tenho a fazer agradecimentos a duas instituições em particular e às pessoas que as compõem:

- Escola Superior Agrária de Elvas e aos meus mestres de sempre pelo apoio e incentivo (Prof^s. José Manuel Rato Nunes, Luís Alcino da Conceição e Ricardo Braga). À Prof^a Rute Santos, que nunca me leccionou qualquer cadeira mas que se mostrou disponível a orientar este trabalho desde o primeiro minuto. Estou-lhe muito grato e jamais me esquecerei do gesto. Quero deixar uma palavra a todos os docentes e não docentes a quem solicitei ajuda, em especial à Prof^a Graça.
- ELIPEC - Agrupamento de Produtores de Pecuária, SA: A todos os meus colegas e associados, em especial ao meu grande colega e companheiro, o Enf^o Vet. Daniel Pombo, e ao Director-Geral, o Eng^o António Rodrigues. Vai também uma palavra de especial agradecimento aos produtores envolvidos no projecto e aos seus técnicos/colaboradores (Eng^a M^a João Valentim, Eng^o José Maria Falcão, Dr. José Maria Rasquilha e ao Sr. Alberto Barradas).

À parte destas instituições, quero agradecer aos meus pais, ao Gil e à Paula por me terem proporcionado condições para aqui chegar.

Agradeço aos meus amigos de infância, os de sempre.

À Maria, em particular.

Foi com um enorme prazer que frequentei esta casa maravilhosa que é a ESAE. Levo-a comigo para onde for.

Resumo

Com o intuito de avaliar a influência do polimorfismo genético do gene da leptina sobre o peso da carcaça, recolheram-se dados relativos a 110 bovinos de sexo feminino, provenientes de 4 explorações na região do Alto Alentejo. Analisaram-se os resultados da pesquisa de 3 polimorfismos de nucleotídeo único (UASMS1, UASMS2 e Exon2FB), em conjunto com os pesos das carcaças. O peso médio das carcaças foi de $178,22 \pm 39,79$ kg e a idade média ao abate de $8,93 \pm 2,16$ meses. Observaram-se diferenças significativas entre explorações, provavelmente relacionadas com as diferentes práticas de manejo. Não se observaram efeitos significativos dos diferentes genótipos sobre os pesos das carcaças, para qualquer dos polimorfismos pesquisados. Os resultados, embora não evidenciem diferenças com significado estatístico, parecem indicar vantagem nos alelos que apresentam Timina (em vez de Citosina), nos polimorfismos UASMS2 e Exon2FB. A frequência dos alelos Citosina foi superior para os três polimorfismos pesquisados, e as frequências genóticas foram consistentes com as esperadas numa população em equilíbrio.

Palavras-chave: genótipo; leptina; bovinos de carne; peso da carcaça

Abstract

In order to evaluate the influence of the genetic polymorphism of the leptin gene on carcass weight, data were collected on 110 female cattle from 4 farms in the Alto Alentejo region. The results of the study of 3 SNPs (UASMS1, UASMS2 and Exon2FB), together with the carcass weights, were analyzed. The average carcass weight was 178.22 ± 39.79 kg and the average age at slaughter was 8.93 ± 2.16 months. There were significant differences between farms, probably related to different management practices. No significant effects of the different genotypes on carcass weights were observed, for any of the surveyed SNPs. The results, although differences show no statistical significance, seem to indicate an advantage in the Thymin (instead of Cytosine) alleles in SNP UASMS2 e Exon2F. The frequency of the Cytosine alleles was higher in all three SNPs, and the genotype frequencies were consistent with those expected in a population in balance.

Keywords: genotype; leptin; beef cattle; carcass weight.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ADN – ácido desoxirribonucleico;

C – Citosina;

F – Fêmea;

F1 – Animal cruzado entre progenitores de raça autóctone em linha pura e de raça exótica em linha pura;

F2 – Animal cruzado entre progenitor F1 e outro de raça exótica em linha pura;

F3 – Animal cruzado com mais de 75% de sangue proveniente de cruzamentos industriais;

GMD – Ganhos médios diários;

M – Macho;

PCR – *Polymerase chain reaction*;

SNP - *Single nucleotide polymorphism*;

T – Timina;

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Figuras.....	vii
1. Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objectivos.....	3
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. A genética animal.....	4
2.2. Factores que influenciam as frequências génicas e genotípicas.....	7
2.3. Técnicas de genética molecular.....	8
2.4. A leptina.....	9
2.5. Morfologia animal e aptidões cárnicas de bovinos.....	14
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Explorações agropecuárias.....	18
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Observação de carcaças em matadouro.....	20
3.2.2. Protocolo laboratorial para determinação do polimorfismo da leptina.....	21
3.2.3. Tratamento estatístico.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Idade ao abate e peso da carcaça.....	24
4.2. Polimorfismo nucleotídico simples UASMS1 C>T.....	27
4.3. Polimorfismo nucleotídico simples UASMS2 C>T.....	27
4.4. Polimorfismo nucleotídico simples Exon2FB C>T.....	28
5. Discussão.....	29
5.1. Relação entre a idade ao abate e o peso da carcaça.....	29
5.2. Polimorfismo do gene da leptina.....	30
6. Conclusões.....	33
7. Bibliografia.....	34
Anexos.....	37

Índice de Quadros

Quadro 1- Número de cromossomas das principais espécies de ruminantes (adaptado de Gama, 2002)	6
Quadro 2- Peso médio (vivo) nas diversas fases da vida de bovinos nas várias tipologias (Fonte: Gama, 2002)	14
Quadro 3 - Proporção dos diferentes tipos de tecidos na carcaça em bovinos (Fonte: Gama, 2002)	16
Quadro 4 - Idade ao abate e peso da carcaça (médias \pm desvios padrão) dos indivíduos originários das 4 explorações agropecuárias	25
Quadro 5 - Coeficiente de correlação de Pearson e coeficientes de determinação entre a idade ao abate e peso da carcaça	26
Quadro 6 – Pesos de carcaça (médias mínimo quadráticas \pm erros padrão) para os diferentes genótipos do SNP UASMS1 nos indivíduos da herdade de S. Pedro (n=10).....	27
Quadro 7 - Pesos de carcaça (médias mínimo quadráticas \pm erros padrão) para os diferentes genótipos do SNP UASMS2 (n=95).....	28
Quadro 8 - Pesos de carcaça (médias mínimo quadráticas \pm erros padrão) para os diferentes genótipos do SNP Exon2FB (n=99).....	28
Quadro 9 – Frequências alélicas obtidas em diferentes raças e obtidas na amostra em estudo	31

Índice de Figuras

Fig. 1 - O gene da leptina com 3 exões e 2 intrões (Taniguchi et al. 2002)	9
Fig. 2- Circuito da leptina	11
Fig. 3- Genótipos da leptina	11
Fig. 4 - Catalogação de amostras.....	17
Fig. 5 - Parque exterior com alimento concentrado	18
Fig. 6 - Parque de recria (São Pedro)	19
Fig. 7 - Carregamento de gado (Herdade das Barradinhas).....	20
Fig. 8 - Acompanhamento da pesagem de carcaças (Matadouro Santacarnes)	21
Fig. 9 - Protocolo laboratorial (Fonte: Equigerminal).....	22
Fig. 10- Histograma de frequências – idade ao abate (meses) (n = 110).....	24
Fig. 11 - Histograma de frequências – peso da carcaça (kg) (n = 110).....	24
Fig. 12 - Gráfico de dispersão (regressão linear) entre a idade ao abate e o peso da carcaça. .	26
Fig. 13 – Curva de crescimento dos bovinos (Fonte: Godinho, 2014)	29

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

Neste trabalho estão presentes os resultados, bem como a sua discussão de uma componente de um projecto entre a Escola Superior Agrária de Elvas e a ELIPEC S.A – Agrupamento de produtores de pecuária.

Denominado de “VITAPEC – Vitela e Vitelão da Elipec” e realizado no âmbito de uma candidatura ao programa PRODER, o projecto teve como fundamentos principais a observação de ganhos médios diários (GMD) dos animais de quatro explorações agro-pecuárias, análise profiláctica específica através da vacinação e observação *in loco* dos pulmões ao abate, bem como da delineação de um score pulmonar para avaliação dos vários grupos. Outro dos parâmetros avaliados é a comparação dos pesos de carcaça entre os animais dessas quatro explorações (a maioria com menos de um ano), fazendo referência e verificando qual o polimorfismo do gene da leptina que está presente na genética desse bovino. A ideia central é utilizar as comparações de pesos de carcaça para observar o efeito dos três polimorfismos em estudo no produto final.

Para elaborar este estudo foram utilizados grupos de animais em três programas de abate:

- Vitela (fêmeas abatidas até aos 8 meses)
- Vitelão (fêmeas abatidas até aos 12 meses)
- Novilha (fêmeas abatidas até aos 16 meses)

Estes animais foram essencialmente destinados à comercialização na cadeia “Pingo Doce” bem como das marcas “Vitela do Monte” e “Herança do Alentejo”, sendo abatidos no Matadouro Regional do Alto Alentejo, em Sousel e Santacarnes, em Santarém.

As análises laboratoriais, que consistiam em obtenção de ADN genómico de bovinos de modo não invasivo, eram elaboradas com amostras de pêlos de bovinos, recolhidas previamente, e posteriormente enviadas ao laboratório “Equigerminal”, em Coimbra, para extracção do ADN e identificação dos polimorfismos.

A identificação dos polimorfismos presentes foi catalogada e confrontada com os pesos de carcaça. Foram tidos em conta regimes alimentares, maneios e idades semelhantes. Quanto

à raça, e para evitar diferenças óbvias entre raças exóticas e autóctones, os animais eram essencialmente filhos de vacas cruzadas (F1) com touros Limousine ou Charoleses.

Nos ruminantes a *performance* alimentar está relacionada com factores nutricionais, ambientais, genéticos e com o estado fisiológico do animal. O animal que experimenta algum défice nutricional, desloca-se para procurar alimentos, consumindo-os até estar saciado, de tal maneira que o desequilíbrio do seu estado nutricional pode afectar diversos sistemas, incluindo a capacidade de o animal se reproduzir, crescer e resistir a infecções (Araújo-Febres, 2005, citado por Carolino, 2015). O conhecimento de factores e mecanismos que regulam a curto prazo quantidade de alimento consumida e a longo prazo a deposição de gordura corporal, tidos pelo apetite e o consumo de alimentos (Reynolds *et al.*, 2004, citados por Carolino, 2015) é importante para planear programas de suplementação alimentar para ruminantes em pastoreio (Thomas *et al.*, 2002, citados por Carolino, 2015).

A ingestão de alimentos é controlado por mecanismos fisiológicos, que conduzem o animal a iniciar e finalizar o consumo num dado momento sendo este um aspecto multifactorial controlado pelo hipotálamo (Keisler *et al.*, 1999, citados por Carolino, 2015) e que deve corresponder ao estado fisiológico em que o animal se encontra. Uma estratégia para determinar de forma precisa o estado nutricional do efectivo, é pela determinação da concentração de metabolitos séricos e hormonas. Estes compostos representam um índice adequado do fornecimento de nutrientes com relação à aplicação dos mesmos (Lentz *et al.*, 2005, citados por Carolino, 2015).

Uma das hormonas que ajuda a estabelecer o estado nutricional nos ruminantes é a leptina, que é uma proteína produzida pelo tecido adiposo que regula o consumo de alimento e intervém no metabolismo energético (Lentz *et al.*, 2005, citados por Carolino, 2015), afecta a actividade imune e a presença de outras hormonas (Ahima *et al.*, 1996, citados por Carolino, 2015).

O peso de uma carcaça traduz-se na quantidade total de produto disponível. Os pesos têm importância no aproveitamento e rendimento animal. As carcaças estão compostas por gordura (como acima referido), músculo e osso. A gordura acaba por ser o tecido com maior variabilidade, sendo que o osso varia menos na dimensão da sua composição. O produto em si, a parte comestível que será consumida abrange o músculo e uma parte (aquela que o consumidor procura) de gordura. O excesso de gordura representa um factor económico negativo, uma vez que a gordura em excesso será aparada e fará com que se perca mais tempo na linha de abate e para além disso as aparas possuem muito pouco valor comercial.

Na obesidade, os níveis de leptina estão aumentados sendo que os animais que não produzem leptina tornam-se extremamente obesos (Romero & Zanesco, 2006, citados por Carolino, 2015), com o prejuízo da classificação e tipificação das respectivas carcaças que assumem uma grande relevância no âmbito comercial uma vez que servem para satisfazer os mercados e as tendências.

Assim sendo, coloca-se a hipótese de que existem polimorfismos do gene da leptina associados a melhores *performances* produtivas dos bovinos de carne, e que será do interesse do produtor que os futuros reprodutores no seu efectivo tenham nos seus genes a variação que está positivamente correlacionada com melhores resultados.

1.2. Objectivos

O objectivo geral deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos genéticos do gene da Leptina sobre o peso das carcaças de bovinos cruzados de aptidão cárnica, nos 4 efectivos parceiros do projecto VITAPEC – Vitela e Vitelão da ELIPEC.

Para tal, e de acordo com o plano de actividades elaborado, acompanharam-se os animais destes efectivos, e recolheu-se a informação relativa à sua idade ao abate e respectivo peso da carcaça.

Paralelamente, colheram-se amostras de pelo com raiz dos indivíduos amostrados, e procedeu-se ao seu envio para o laboratório da empresa prestadora do serviço de pesquisa dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene da leptina. Optou-se, no âmbito do projecto, por pesquisar 3 SNP anteriormente referidos na literatura como tendo influência sobre os parâmetros das carcaças dos bovinos, concretamente o UASMS1 C>T na posição 207, o UASMS2 C>T na posição 528 e o Exon2FB C>T na posição 15196.

Por último, procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados, na tentativa de avaliar a presença de efeitos dos SNP pesquisados nos valores fenotípicos do peso da carcaça, e de comparar as frequências alélicas e genotípicas encontradas com as referidas na literatura consultada.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *A genética animal*

A genética é a parte da ciência que estuda a hereditariedade, a estrutura e função dos genes e a variação dos seres vivos. É através da genética que procuramos compreender os mecanismos e leis de transmissão das características através das gerações. Em genética, a transmissão de informação envolve quatro elementos básicos:

- A diversidade de estruturas celulares com inúmeras formas especificando aspectos diferentes do organismo;
- Um mecanismo de replicação que copia a informação e repassa à descendência;
- A capacidade de mutação para que haja maior variabilidade;
- A capacidade da descendência para traduzir as informações herdadas em proteínas.

A genética serve de base para a compreensão da evolução. A mudança evolutiva observada nas populações é a consequência das diferentes taxas de reprodução, mutação, migração e selecção, tornando herdáveis as novas características. Sendo assim, grande parte das explicações evolutivas são também genéticas (Canhas, 2017).

Melhoramento genético animal

O melhoramento genético animal é um conjunto de processos selectivos que visam o desenvolvimento de determinadas características na população, diminuindo consequentemente a frequência das características indesejáveis. Nada mais é do que a aplicação da genética animal com o intuito de aumentar a média de produção dos animais. Está baseada em dois pilares fundamentais: a selecção e os cruzamentos. O estudo e a aplicação do melhoramento genético animal convergem obrigatoriamente para três grandes áreas:

1. Genética básica ou mendeliana: princípios de transmissão do material genético de uma geração à outra. Baseada nas leis de Mendel.
2. Genética de populações: estudo da genética mendeliana ao nível das populações animal. O fundamento básico da genética de populações é o teorema de Hardy-Weinberg (datado de 1908). Usualmente é limitada ao estudo de caracteres qualitativos (pelagem, chifres etc.) os quais são influenciados por pequeno número de genes. Os

princípios da genética de populações podem ser usados no delineamento de estratégias de selecção, principalmente no caso de detecção e eliminação de genes deletérios.

3. Genética quantitativa: relacionada com características económicas (produção de carne, leite, ovos etc), determinadas por muitos pares de genes e nas quais o efeito de cada um raramente pode ser medido. Factores não genéticos e efeitos aleatórios de ambiente tendem a mascarar os efeitos dos genes que influenciam determinada característica. A base da genética quantitativa é a combinação dos princípios de genética e de conceitos estatísticos.

O melhoramento genético e o melhoramento ambiental devem ser simultaneamente trabalhados uma vez que a produção de cada indivíduo é resultado da acção dos seus genes e das forças que agem sobre eles, ou seja: Fenótipo = genótipo + ambiente. É, no entanto, de grande importância determinar a fracção do fenótipo que é devida aos efeitos dos genes, bem como a fracção que é devida aos efeitos de ambiente, pois apenas os efeitos dos genes são transmitidos à próxima geração (Eler, 2014).

Modo de acção dos genes

A acção dos genes, consoante o valor relativo de expressão de cada genótipo, pode classificar-se como:



(adaptado de Gama, 2002)

- Acção aditiva: É um tipo de acção genómica em que cada um dos inúmeros genes que constituem o genótipo do indivíduo provoca um pequeno efeito na manifestação de determinada característica, ou seja, surte efeito na manifestação do valor fenotípico do indivíduo, independente da acção dos outros genes que constituem o genótipo. O efeito provocado pela acção independente de cada um dos genes adiciona-se aos efeitos dos demais na determinação do valor fenotípico.
- Acção não aditiva: É um tipo de acção genómica resultante da interacção entre os alelos, que faz com que o valor expresso pelo genótipo heterozigoto seja

diferente da soma dos efeitos independentes de cada gene. Esta interação pode ser de dois tipos: Dominância e epistasia.

- Dominância: É a interação entre alelos do mesmo locus. O efeito da dominância ocorre no genótipo heterozigoto e o grau de dominância entre os alelos determina o valor expresso pelo genótipo heterozigoto
- Dominância completa: O heterozigoto e um dos homozigotos apresentam o mesmo valor fenotípico. O homozigoto que possui o mesmo valor que o heterozigoto caracteriza o gene dominante. O outro homozigoto caracteriza o gene recessivo.
- Dominância incompleta: O valor fenotípico do heterozigoto apresenta-se entre os valores dos dois homozigotos, mas fora do ponto médio.
- Sobredominância: Ocorre quando o valor fenotípico do heterozigoto é superior a um dos homozigotos. Existem evidências de que as características relacionadas ao "valor adaptativo" são controladas por genes de acção sobredominante. Os heterozigotos seriam mais vigorosos.
- Epistasia: É a interação entre alelos de diferentes locos, com um loco alterando a expressão de outro. Os locos envolvidos podem estar no mesmo cromossoma ou não. A acção epistática pode ser observada tanto em características qualitativas, quanto nas quantitativas (Eler, 2014).

O número de cromossomas típico das principais espécies de ruminantes domésticos encontra-se sumarizado no quadro I:

QUADRO I - NÚMERO DE CROMOSSOMAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE RUMINANTES (ADAPTADO DE GAMA, 2002).

Espécie	Número de cromossomas
Bovinos (<i>Bos taurus</i>)	60
Ovinos (<i>Ovis aries</i>)	54
Caprinos (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	60

Do número de cromossomas referido acima para cada espécie, dois são cromossomas sexuais e os restantes são autossomas. Nos mamíferos os cromossomas sexuais e os restantes

são autossomas. Também nos mamíferos os cromossomas sexuais são XY no macho e XX na fêmea, pelo que são os espermatozóides (portadores do cromossoma X ou Y) que vão determinar o sexo da descendência (Gama, 2002).

2.2. Factores que influenciam as frequências génicas e genotípicas

Uma população grande que mantém um sistema de acasalamentos ao acaso permanece estável com relação às frequências génicas e genotípicas na ausência de forças externas capazes de mudar as suas propriedades genéticas. Esse estado de equilíbrio pode então ser modificado pela actuação de forças externas. Os processos de alteração da frequência génica podem ocorrer de duas formas:

a) Sistemática: Tende a alterar a frequência génica de uma forma previsível em quantidade e em direcção. São três os processos sistemáticos: migração, mutação e selecção.

b) Dispersiva: Ocorre em pequenas populações, como resultado de efeitos amostrais. Esta forma é conhecida como oscilação genética. Pode-se prever a quantidade da mudança, mas não a sua direcção (Eler, 2014).

i. Mutação

Mutação génica é uma mudança na sequência de bases nitrogenadas do ADN de um cromossoma, com conseqüente mudança na síntese de ARN, que leva as informações para a síntese proteica que ocorre nos ribossomas. Desta forma, a nova proteína sofre alterações funcionais e, conseqüentemente, fenotípicas de grande importância. As mutações podem ser de dois tipos:

- Mutações recorrentes: mutações que ocorrem com determinada frequência.
- Mutações não recorrentes: aquelas que ocorrem apenas uma vez e não mais se repetem.

ii. Migração

É o movimento de indivíduos de uma população para outra, seguido de reprodução entre as subpopulações, resultando na “mistura” dos patrimónios genéticos dessas subpopulações (Eler, 2014).

iii. Selecção

A selecção pode ser definida como o processo no qual alguns indivíduos são escolhidos entre os membros de uma população para produzirem a geração seguinte. Pode ser de dois tipos: natural e artificial (Eler, 2014).

Lei de Hardy-Weinberg

Em 1908, o matemático inglês Godfrey H. Hardy e o médico alemão Wilhem Weinberg concluíram que, se nenhum factor evolutivo actuasse sobre uma população que satisfizesse certas condições, as frequências dos seus alelos permaneceriam inalteradas ao longo das gerações. Esse princípio ficou conhecido como lei ou teorema de Hardy-Weinberg, ou princípio do equilíbrio génico. As condições necessárias para que uma população se mantenha em equilíbrio génico, segundo Hardy e Weinberg, são as seguintes:

- A população deve ser muito grande (teoricamente, quanto maior, melhor), de modo que possam ocorrer todos os tipos de cruzamento possíveis, de acordo com as leis de probabilidades.
- A população deve ser panmítica (do grego *pan*, todos, e do latim *miscere*, misturar), isto é os cruzamentos entre indivíduos de diferentes génotipos devem ocorrer ao acaso, sem qualquer preferência.

Uma população que possua essas características, e na qual não ocorra nenhum factor evolutivo, tais como mutação, selecção ou migração, permanecerá em equilíbrio génico, ou seja, as frequências dos alelos não sofrem alteração ao longo das gerações.

2.3. Técnicas de genética molecular

Durante os últimos anos, ou até mesmo décadas, a selecção e melhoramento genético de animais tiveram como grande suporte a utilização de métodos de genética de populações, de modo a permitir a criação e desenvolvimento de estratégias utilizadas na selecção e cruzamentos. Estes métodos permitiram chegar à obtenção de raças ou populações de animais que possuem melhores scores a nível produtivo e bons índices de integração ambiental.

Estas alterações vieram trazer proveitos económicos notáveis. Muitos dos caracteres quantitativos considerados nos programas de melhoramento animal são influenciados pela acção de um elevado número de genes, por factores ambientais e as suas interacções, com pequenos efeitos na expressão do fenótipo (Ruane & Sonnino, 2011).

O indivíduo distingue-se de um seu congénere na combinação única do ácido desoxirribonucleico (ADN), cuja transcrição cria a variação proteica que resulta na diversidade individual expressada através do fenótipo.

Tang (2011) refere que foram descritas associações entre vários marcadores genéticos e caracteres economicamente importantes para a produção animal e que a incorporação desses marcadores nos modelos de avaliação genética aumentará a precisão e eficácia da selecção.

2.4. A leptina

De seu nome proveniente do grego *leptos*, que significa magro, a leptina é uma proteína segregada pelo tecido adiposo que, ao regular a adiposidade, é um potencial controlador do tecido adiposo, verificando-se a implicação da leptina no mecanismo de retrocontrolo da massa adiposa (Taniguchi *et al.*, 2002).

A leptina é uma hormona produzida predominantemente pelo adipócito, sendo fundamental na regulação da homeostasia energética. Actua como sinalizadora da massa gorda existente no organismo, estando envolvida no controlo e balanço dos lípidos nos tecidos não adiposos, na ingestão alimentar e termogénese, com subseqüentes implicações metabólicas. A leptina é genericamente responsável pela inibição da ingestão alimentar e aumento da termogénese, o que contribui para a manutenção de adequadas reservas lipídicas e manutenção do peso corporal (Lau, *et al.* 2014).

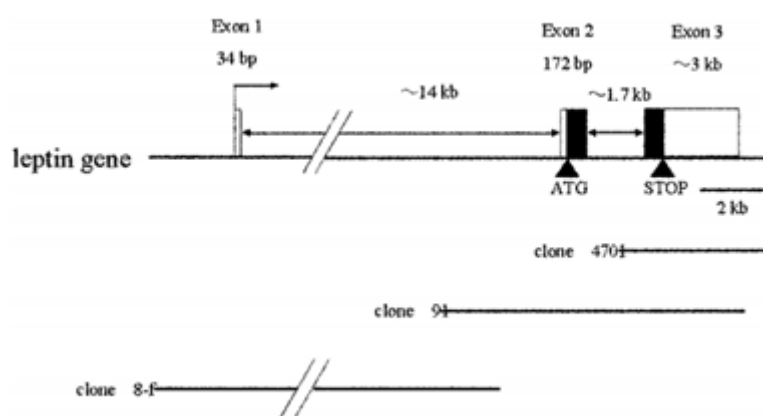


FIG. 1 - O GENE DA LEPTINA COM 3 EXÕES E 2 INTRÕES (TANIGUCHI ET AL. 2002)

Em 1994, Zhang *et al.* identificaram o gene *ob*, localizado no cromossoma 7 (7q31.3), e o seu produto, a leptina. Desde a sua caracterização a leptina tem adquirido importância crescente como molécula fundamental na regulação do balanço energético. A leptina é também

uma hormona liporreguladora que controla a homeostasia dos lípidos nos tecidos não adiposos, especialmente durante os períodos de sobrealimentação. Deste modo, os seus níveis circulantes correlacionam-se estreitamente com as reservas de tecido adiposo, ou seja, o aumento da adiposidade conduz a um aumento da produção de leptina, enquanto uma diminuição de massa gorda está associada a uma redução da sua expressão.

A leptina é codificada por um gene com 167 aminoácidos, e a sua função é essencialmente hormonal e autócrina. Como referido anteriormente, a leptina regula o apetite, mas também o metabolismo. Nos dias de hoje, o apetite e os factores que lhe estão relacionados, nomeadamente os Ganhos Médios Diários (GMD) e a taxa de conversão, são de grande relevância económica, uma vez que em bovinicultura de carne pode significar a diferença entre o sucesso ou o fracasso de uma engorda. O peso de carcaça, o marmoreado da carne e o próprio rendimento da carcaça estão associados à presença de leptina, como nos referem Geary *et al.* (2003), que observaram que as concentrações séricas da leptina se correlacionaram positivamente com estas características em algumas raças, incluindo a Limousine, de que são cruzados a maior parte dos animais amostrados nesta tese.

Considine *et al.* (1996) analisaram a expressão do gene da leptina no tecido subcutâneo abdominal em humanos, e encontraram uma correlação positiva entre a leptina e o índice de massa corporal. Este é um dos principais índices que nos permitem conhecer o estado nutricional dos ruminantes. Sugeriu-se que a quantidade libertada por cada adipócito, dependerá mais do fluxo de nutrientes que entram e saem desta célula, do que do tamanho da mesma (Houseknecht 1998, citados por Carolino, 2015). A leptina é libertada para a circulação sanguínea ligada a proteínas que regulam o seu metabolismo, a sua biodisponibilidade e a respostas dos tecidos à hormona. Existe uma união da leptina a macromoléculas, específica e reversível, que é a maneira em que esta pode transportar-se pela corrente sanguínea (Lentz *et al.*, 2005, citados por Carolino, 2015).

Como podemos ver na figura 2, os animais com maior quantidade de adipócitos têm maior concentração de leptina no sangue do que animais mais magros; o nível de leptina que circula no sangue é determinado por receptores do cérebro: quando as moléculas de leptina se ligam a esses receptores, são transmitidos sinais neuronais e hormonais para suprimir o apetite e aumentar a taxa metabólica.

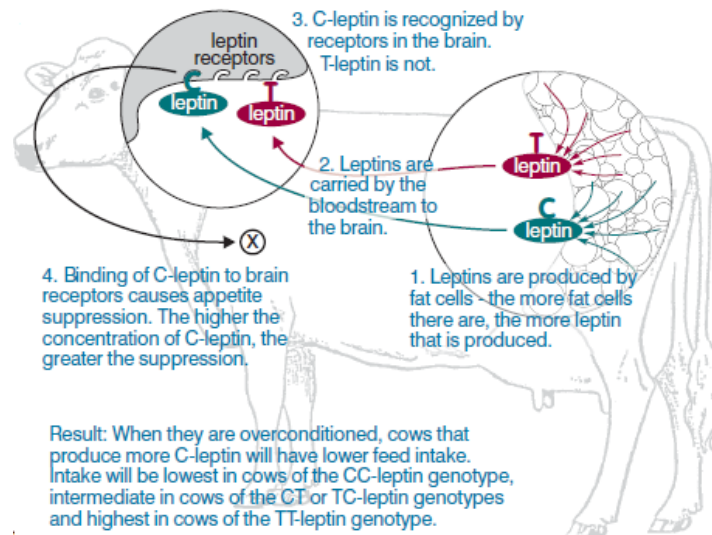


FIG. 2- CIRCUITO DA LEPTINA

Fonte: Western Dairy Digest (2004)

Recentemente, Buchanan *et al.* (2002) descobriram que, dependendo do genótipo, os animais podem produzir duas variantes distintas de leptina, chamadas 'Leptina-C' e 'Leptina-T', na figura abaixo podemos observar que animais com genótipo CC produzem apenas 'Leptina-C', e igualmente para a 'Leptina-T', enquanto o genótipo TC produz ambas as variantes. Pensa-se que apenas a variante 'Leptina-C' é reconhecida pelos receptores de leptina, a 'Leptina-T' não é reconhecida, os níveis elevados de sangue desta variante não resultam em envios de sinais para supressão do apetite. A estas variantes deve-se uma substituição de Timina (T) por Citosina (C) (figura 3).

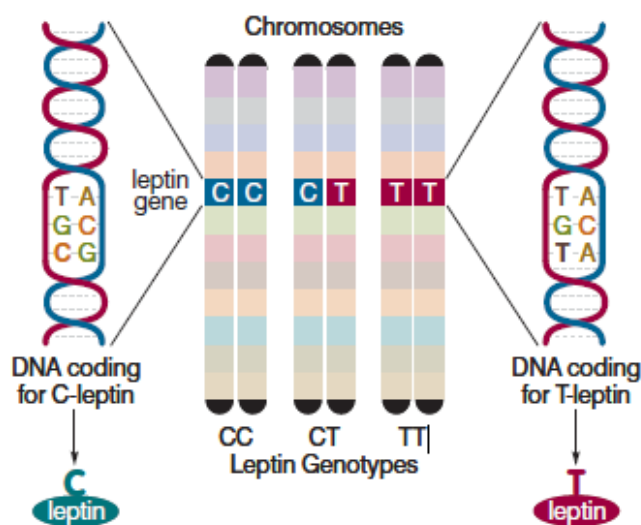


FIG. 3- GENÓTIPOS DA LEPTINA

Fonte: Western Dairy Digest (2004)

Esta abreviatura de polimorfismo de nucleótido simples, designada por SNP, surge para referenciar o principal tipo de variação molecular existente no ADN, observada na acumulação de sequências de ADN obtidas a partir de diferentes indivíduos (Carolino, 2015). O número de SNP's identificados por análise tem vindo a aumentar (Landi, 2011), e vários estudos têm relacionado estes marcadores genéticos com a qualidade da carne. A utilização dos marcadores moleculares fornece informação sobre o genótipo do animal, permitindo a identificação e a selecção de animais com características produtivas mais adequadas, em idade precoce. Estas técnicas quando integradas nas metodologias tradicionais e cuja sua finalidade seja o melhoramento genético podem resultar em melhorias na eficiência, intensidade e precisão na selecção dos animais. A identificação do genótipo em idades precoces permite também o encurtamento temporal entre gerações com aumento do ganho genético, obtendo-se também maiores rendimentos e um incremento de qualidade dos produtos.

As três variações analisadas neste trabalho são substituições de uma Citosina por uma Timina. Woronuk *et al.* (2012) referem-nos que os polimorfismos (C/T) na leptina existente nos bovinos demonstram um impacto nas características das carcaças, sendo que os polimorfismos CC necessitam de mais dias para atingir os 12 mm de gordura lombar (45 dias), os CT, 42 dias e os TT, 38 dias. Neste estudo está bem patente a importância dos polimorfismos genéticos da leptina que contribuem para a deposição de mais ou menos gordura.

No que toca ao peso das carcaças, McEvers *et al.* (2012) descrevem o grupo TT como tendo carcaças mais leves do que os animais de genótipo CC em estudo, bem como menos largura nos músculos dorsais e ventrais. É mencionada ainda a maior deposição de gordura intramuscular no genótipo TT em relação aos genótipos CT e CC. Yamada *et al.* (2003) referem-se à leptina como uma proteína que atua para regular a ingestão de alimentos, gastos energéticos de manutenção, peso corporal homeostático e, conseqüentemente para influenciar deposição de gordura em animais e humanos.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento genético é causa da selecção pelas populações dos indivíduos com maiores capacidades para trazer mudanças positivas às próximas gerações. Os testes podem fornecer aos produtores de gado uma gama de informações genéticas, incluindo atribuição de parentesco, detecção de defeitos genéticos e marcadores genéticos, ou polimorfismos de nucleótido único, para traços qualitativos, como cor de pele e outros traços quantitativos (Fitzsimmons *et al.*, 1998 citados por Carolino, 2015; Buchanan *et al.*, 2002; Van Eenennaam *et al.*, 2007).

A tecnologia genómica tem entre outros, o potencial de gerar valor em cada sector da indústria de carne bovina, entre outras, ajudando tanto na gestão quanto nas decisões de selecção (Van Eenennaam e Drake, 2012). Na indústria da carne portuguesa ainda é pouco usual o recurso a estas análises, havendo portanto reprodutores com variabilidade genética de valor acrescentado que ainda não são valorizados por isso, uma vez que não existe selecção a este nível.

O interesse crescente pelo estudo da genética em bovinos de carne resultou na descoberta do gene da leptina que está associado à deposição de gordura (Fitzsimmons *et al.*, 1998, citados por Carolino, 2015; Buchanan *et al.*, 2002). Thompson refere-nos ainda que essas diferenças genéticas resultam numa valorização por animal que andarás entre os 15 e 64 dólares americanos por cabeça.

Da análise de diferentes estudos ressaltam três importantes polimorfismos nucleotídicos simples do gene da leptina ligados a qualidade da carcaça dos bovinos:

- A variação UASMS1 C>T na posição 207 do gene da Leptina com substituição de uma Citosina (C) por uma Timina (T). Silva *et al.* (2012) verificaram a influência da substituição C/T na área transversal do músculo *longissimus dorsi* (Rib Eye Area, REA), verificando-se um aumento da REA nos animais portadores da variação C. Por outro lado, Moore (2011) refere que a presença do genótipo TT do UASMS1 é indicador de valores fenotípicos mais elevados para a ingestão diária de matéria seca, o peso vivo, o peso ao abate e o peso da carcaça.

- A variação UASMS2 C>T na posição 528 do gene da Leptina com substituição de uma Citosina por uma Timina. Nesta posição do gene da Leptina também os animais portadores de pelo menos uma Timina (T) nesta posição foram associados a ingestões de matéria seca e ganhos médios diários superiores, assim como a valores mais elevados de peso ao abate e espessura da gordura dorsal. Adicionalmente, a presença de genótipos com pelo menos uma Timina também se correlacionou positivamente com o marmoreado da carne e com particularidades do comportamento alimentar (Nkrumah *et al.*, 2005). Já Lusk (2007) observou para o genótipo UASMS2-CC o maior peso vivo no início da engorda, mas para o genótipo UASMS2-TT a taxa de crescimento do peso vivo mais elevada.

- A variação Exon2F C>T na posição 15196 com substituição de uma Citosina por uma Timina. Nesta posição do gene da Leptina também os animais portadores de pelo menos uma Timina (T) nesta posição foram associados a carcaças de melhor qualidade (Pinto *et al.*, 2011). Em concreto, Nkrumah *et al.* (2004) associaram o genótipo TT a maiores taxas de ingestão, frequência e duração da ingestão superiores, maior espessura da gordura dorsal e menor

rendimento magro da carcaça. Detetaram ainda uma frequência superior do alelo T nas linhagens de origem britânica (Angus e Hereford) e do alelo C nas linhagens de origem continental (Limousin, Gelbvieh e Charolais).

Os SNP UASMS1 e UASMS2 do gene da leptina localizam-se na sequência promotora e podem, portanto, alterar a expressão do gene; o SNP E2FB localiza-se no exão 2, e introduz uma alteração de um aminoácido (Arg para Cys na posição 305), o que pode alterar a estrutura terciária da proteína madura (Clempson *et al.*, 2011).

2.5. **Morfologia animal e aptidões cárnicas de bovinos**

As principais características que caracterizam as raças de bovinos de carne são:

- Grande precocidade
- Elevado rendimento em carcaça (65-66%)
- Tronco compacto, de diâmetro largo
- Linha superior (dorso) paralela à inferior (ventre)
- Grande massa muscular
- Garupa larga e bem desenvolvida
- Cabeça e extremidades dos membros reduzidas
- Idade de abate – 1 a 2 anos (variável consoante o mercado)

No quadro 2 pode-se observar o peso médio dos bovinos expresso em quilogramas.

QUADRO 2- PESO MÉDIO (VIVO) NAS DIVERSAS FASES DA VIDA DE BOVINOS NAS VÁRIAS TIPOLOGIAS (FONTE: GAMA, 2002)

Idade	Raças pesadas	Raças médias	Raças pequenas
Nascimento	45	38	30
6 meses	200	185	145
18 meses	480	400	315
24 meses	600	500	380
Adulto	1200	950	650

- Os cruzamentos:

O cruzamento é o acasalamento de indivíduos de raças distintas (com vista à exploração da variabilidade inter-racial), e representa uma das práticas de melhoramento genético mais aplicadas em produção animal (Gama, 2002).

Os animais usados para este estudo são cruzamento F1, F2 e até F3 das raças: Alentejana, Limousine, Charolês, podendo haver vestígios genéticos de raças como Sallers, Preta ou Mertolenga.

Há essencialmente duas razões que levam à utilização e cruzamentos nas espécies pecuárias:

- Tirar partido da heterose ou vigor híbrido;
- Aproveitar a possível complementaridade entre raças, devida a diferença nos respectivos efeitos directos e maternos para os caracteres de interesse.

O cruzamento é provavelmente a forma mais rápida de melhorar o potencial genético de uma população, e é uma prática extremamente útil em produção animal, desde que:

- As raças que entram no cruzamento mantenham a sua identidade própria (isto é, a sua existência não venha a ser colocada em risco pelo sistema de cruzamentos utilizado);
- Cada uma das raças seja adequadamente escolhida e jogue no cruzamento o papel mais adequado.

Há contudo que ter em atenção que o cruzamento é um ganho de uma só vez, e que só a selecção permite um progresso continuando ao longo do tempo. Dado que os dois sistemas de melhoramento não são incompatíveis, antes complementares, na prática são normalmente combinados (Gama, 2002).

- A Carcaça
 - Carcaça – Corpo do animal despojado da pele e de todos os órgãos internos, com a excepção dos rins e gordura envolvente depois de desprovidos da cabeça, extremidades locomotoras e cauda.
 - No quadro 3 da próxima página podemos observar a proporção de tecidos da carcaça.

QUADRO 3 - PROPORÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE TECIDOS NA CARÇA EM BOVINOS (FONTE: GAMA, 2002)

	Bovino
Magro (%)	59
Gordura (%)	25
• Subcutânea (%)	8
• Intermuscular (%)	13
• Restante (%)	4
Osso (%)	16

Um produto de qualidade é aquele que atende perfeitamente, de forma confiável, acessível, segura, e, no tempo certo, às necessidades do cliente (Campos, 1992). Se o produto for um alimento como a carne de bovino e o cliente ser um consumidor moderno, muito selectivo, poder-se-ia adaptar esta definição de modo a incluir valor nutritivo, sanidade e características organolépticas (Felicio, 1997). A carcaça bovina é dividida essencialmente em quarto dianteiro e traseiro, sendo que o excesso de gordura representa um factor económico negativo, uma vez que a gordura em excesso será aparada e fará com que se perca mais tempo na linha de abate e para além disso as aparas possuem muito pouco valor comercial.

3. Material e Métodos

3.1. *Material*

Este trabalho foi realizado ao longo de mais de um ano em que foram recolhidas 110 amostras de pêlos de vitelos/as para identificação e catalogação genómica. Nas quatro explorações agro-pecuárias aproveitaram-se os dias em que o manejo do gado bovino implicou passagem pelas mangas para recolher o material que iria mais tarde ser examinado nos laboratórios da Equigerminal, em Cantanhede.

As amostras, depois de devidamente catalogadas no terreno e separadas por exploração na Escola Superior Agrária de Elvas, eram enviadas para laboratório via correio (figura 4).

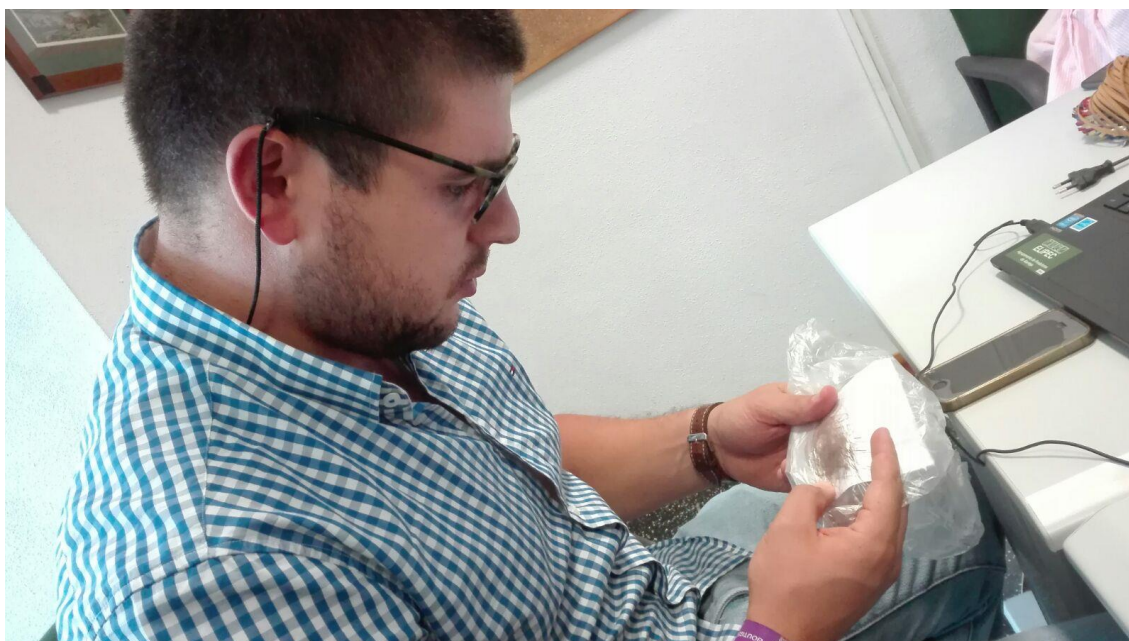


FIG. 4 - CATALOGAÇÃO DE AMOSTRAS

Os abates estiveram à responsabilidade da ELIPEC S.A. e foi a empresa que forneceu previamente as datas de abate, bem como os pesos de carcaça.

O estudo baseou-se em animais cruzados e não em raças em linha pura, para evitar as diferenças óbvias de rendimento entre raças exóticas e autóctones. São cruzamentos base e muito usuais nesta região os que foram alvo de amostragem. Os efectivos têm essencialmente touros Limousin, Sallers ou Charolês, sendo que as fêmeas são cruzadas há várias gerações. A generalidade das vacadas da região de Elvas, Monforte, Portalegre e Arronches, são oriundas da Raça Alentejana, contando ainda com presença de raça Preta e Mertolenga.

3.1.1. Explorações agropecuárias

As explorações nas quais foram recolhidas as amostras e acompanhados os pesos de abate dos bovinos foram as seguintes:

- **Chainça da Elvirinha** (Herdade das Barradinhas): Esta propriedade agrícola está situada na Freguesia de Esperança, concelho de Arronches. É a típica exploração extensiva em regime de montado misto com predominância do azinho, com prados naturais de sequeiro.

Os parques de acondicionamento (figura 5), para manejo do gado e fornecimento de alimentos concentrados e grosseiros são amplos e com zonas cobertas.



FIG. 5 - PARQUE EXTERIOR COM ALIMENTO CONCENTRADO

- **Herdade de São Pedro (Chaves)** – Soc. Agrícola de São Pedro, sita na freguesia de São Vicente e Ventosa, concelho de Elvas (figura 6). Possui alguns prados permanentes e muito pouco coberto arbustivo ou arbóreo.



FIG. 6 - PARQUE DE RECRIA (SÃO PEDRO)

- **Herdade da Torre de Figueiras** – Soc. Agrícola da Carrilha de Palma, sita na freguesia de Monforte, concelho de Monforte. Possui alguns prados permanentes e culturas perenes, bem como arvenses. É uma exploração com uma diversidade de culturas muito grande em que o gado ocupa uma fatia importante.
- **Herdade das Furadas** – Agrisa – Agropecuária. Sita no concelho de Arronches. Possui alguns prados permanentes e culturas arvenses. O coberto arbóreo apresenta algum montado de sobro, mas na sua generalidade é escasso.

Durante o decurso deste estudo acompanharam-se *in loco* diversas tarefas na exploração. À parte das pesagens, abates, profilaxia e desmames, foram acompanhados os carregamentos de gado para o matadouro (figura 7).



FIG. 7 - CARREGAMENTO DE GADO (HERDADE DAS BARRADINHAS)

3.2. Métodos

3.2.1. Observação de carcaças em matadouro

Em alguns abates, foram observadas as carcaças nos matadouros de Santarém e de Sousel, para comprovar a sua rastreabilidade e fazer observação do processo. O intuito destas observações foi essencialmente académico e de modo a comprovar a correcta identificação das carcaças bem como da verificação dos respectivos pesos destas (figura 8). Não foram tidas em linha de conta para este estudo as classificações de carcaça do sistema “EUROP”. As pesagens apenas diferiam na medida em que em Santarém eram pesadas as metades das carcaças e em Sousel as carcaças por inteiro.



FIG. 8 - ACOMPANHAMENTO DA PESAGEM DE CARÇAÇAS (MATADOURO SANTACARNES)

3.2.2. Protocolo laboratorial para determinação do polimorfismo da leptina

A prestação do serviço de análises laboratoriais foi adjudicada, no âmbito do projecto VITAPEC, à Equigerminal, empresa que se dedica à investigação e prestação de serviços na área da biotecnologia animal, sediada em Coimbra. De acordo com o protocolo proposto pela empresa, recolheram-se amostras de pelos com raiz de bovinos abatidos no âmbito do projeto. Estas amostras foram acondicionadas em envelopes individuais devidamente identificados, e remetidas à Equigerminal para extração de ADN e pesquisa de SNP no gene da leptina (figura 9).

Após algumas otimizações no protocolo, a empresa relatou ter sido possível extrair com sucesso ADN a partir dos pelos de bovino, conseguindo uma concentração média de ADN de 1834,29 microgramas/mL. De modo a confirmar se o ADN obtido continha ADN genómico de bovinos, foi efetuado um controlo de amplificação para o gene da beta actina.

Seguidamente, foram desenhados vários pares de sondas específicas para amplificar os fragmentos de ADN que contêm 3 variações, UASMS1, UASMS2 e EXON2F. Depois de obtidas as sequências flanqueadoras dos polimorfismos procedeu-se ao desenho de novas sondas específicas para os polimorfismos UASMS1, UASMS2 e EXON2F. Os fragmentos específicos foram amplificados por PCR convencional e PCR em tempo real. A presença de todos os polimorfismos foi confirmada por sequenciação por Sanger. No decorrer do projeto, foi também rotinado um teste de diagnóstico simples e rápido por PCR em tempo em real para a identificação dos 3 SNPs da leptina. Este teste de diagnóstico possibilitou a genotipagem destes SNPs de uma forma mais económica e rápida.

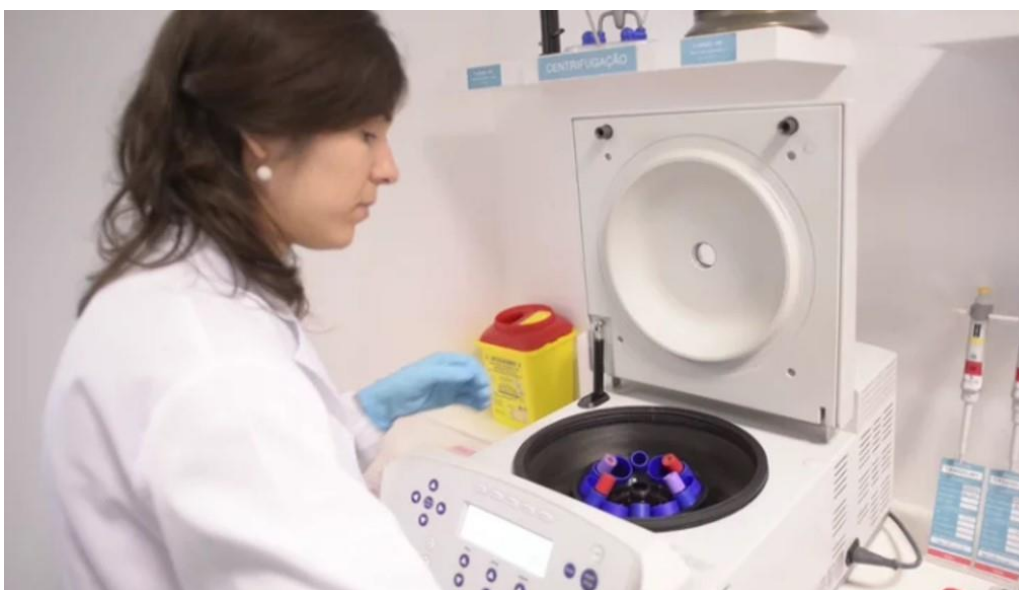


FIG. 9 - PROTOCOLO LABORATORIAL (FONTE: EQUIGERMINAL)

3.2.3. Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados obtidos, utilizou-se o *software* Statistica v.12 (Statsoft®). Realizou-se uma análise de variância prévia para determinar a importância do efeito “Exploração” sobre as idades ao abate e os pesos das carcaças, assim como o cálculo das correlações de Pearson para determinar o nível de associação entre ambas as variáveis.

Para avaliar o efeito dos diferentes genótipos em cada SNP sobre o peso das carcaças, utilizaram-se modelos lineares (com o procedimento *General Linear Models*), realizando uma análise de variância/covariância, considerando o genótipo e a exploração como factores de agrupamento e a idade ao abate como covariável. Para apresentação dos resultados, optou-se por calcular as médias mínimo-quadráticas (ou médias marginais estimadas) e os erros padrão, controlando os valores para a média da covariável “Idade ao abate”.

Foram também calculadas as frequências alélicas e genotípicas para cada um dos SNP do gene da leptina, e comparadas, mediante um teste de qui-quadrado, as frequências genotípicas observadas com as frequências esperadas numa população em equilíbrio de Hardy-Weinberg (ou seja, sendo p e q as frequências dos dois alelos, as frequências genotípicas esperadas seriam p^2 , $2pq$ e q^2).

4. Resultados

4.1. Idade ao abate e peso da carcaça

Recolheram-se as idades ao abate e os pesos das carcaças de 110 bovinos de sexo feminino, provenientes das 4 explorações pecuárias envolvidas no projeto VITAPEC. A idade média ao abate foi de $8,93 \pm 2,16$ meses, variando entre os 6 e os 16 meses, com 98 amostras com menos de 12 meses (figura 10).

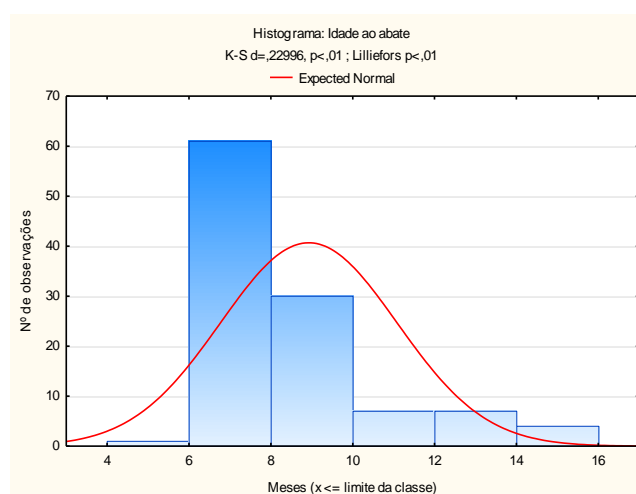


FIG. 10- HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIAS – IDADE AO ABATE (MESES) (N = 110)

O peso médio das carcaças foi de $178,22 \pm 39,79$ kg, variando entre um mínimo de 99,60 kg e um máximo de 270,97 kg de peso de carcaça (figura 11).

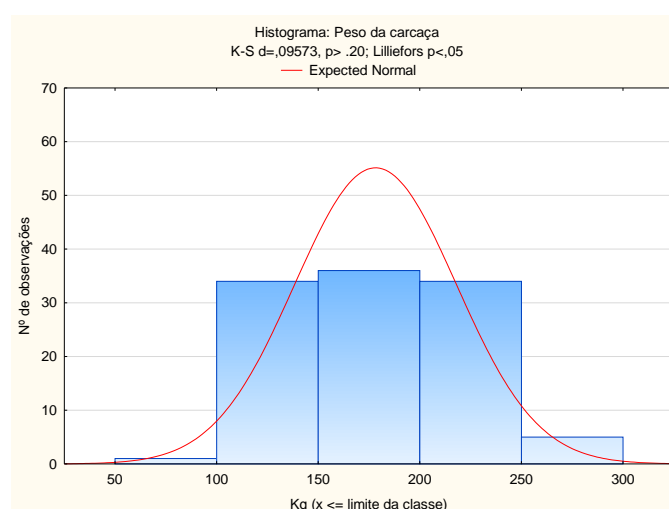


FIG. 11 - HISTOGRAMA DE FREQUÊNCIAS – PESO DA CARÇAÇA (KG) (N = 110)

No quadro 4 apresentam-se as idades ao abate e o peso das carcaças em função das explorações de onde os indivíduos eram originários.

QUADRO 4 - IDADE AO ABATE E PESO DA CARÇAÇA (MÉDIAS \pm DESVIOS PADRÃO) DOS INDIVÍDUOS ORIGINÁRIOS DAS 4 EXPLORAÇÕES AGROPECUÁRIAS

Exploração	C. da Elvirinha	S. Pedro	T. das Figueiras	Furadas
Nº de animais	20	53	18	19
Idade ao abate (meses)	8,40 \pm 2,19 ^a	8,83 \pm 1,54 ^{ab}	8,44 \pm 2,38 ^{ab}	10,21 \pm 2,93 ^b
Peso da carcaça (kg)	155,52 \pm 40,81 ^a	201,85 \pm 34,14 ^b	165,49 \pm 26,64 ^a	148,27 \pm 21,60 ^a

NOTA: Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes

Realizou-se também uma análise de variância quanto às duas variáveis em questão, considerando a Exploração como factor de agrupamento, e verificando-se que existiram diferenças significativas entre grupos quanto à idade ($p < 0,05$) e quanto ao peso da carcaça ($p < 0,001$) (ver Anexo I). O teste de separação de médias de Tukey permitiu verificar que os animais da Chainça da Elvirinha foram abatidos significativamente mais cedo do que os da Herdade das Furadas, e que os da Herdade de S. Pedro obtiveram pesos de carcaça significativamente superiores aos das restantes 3 explorações (os resultados do teste de Tukey estão, também, assinalados no quadro 4).

Para avaliar a relação entre as variáveis idade ao abate e peso da carcaça, calcularam-se os coeficientes de correlação de Pearson e os coeficientes de determinação, para o conjunto de animais na amostra, assim como para cada exploração, individualmente (quadro 5).

QUADRO 5 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON E COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO ENTRE A IDADE AO ABATE E PESO DA CARÇAÇA

Exploração	Coef. de correlação (r)	Valor de p	Coef. de determinação (r ²)
Todas	0,39	0,000028	0,15
Chainça da Elvirinha	0,56	0,010637	0,31
S. Pedro	0,65	0,000000	0,43
Torre das Figueiras	0,53	0,022388	0,29
Furadas	0,73	0,000433	0,53

Verificou-se que existe uma associação positiva estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre estas duas variáveis, quer quando consideramos a amostra no seu todo (figura 12), quer quando consideramos cada uma das explorações individualmente.

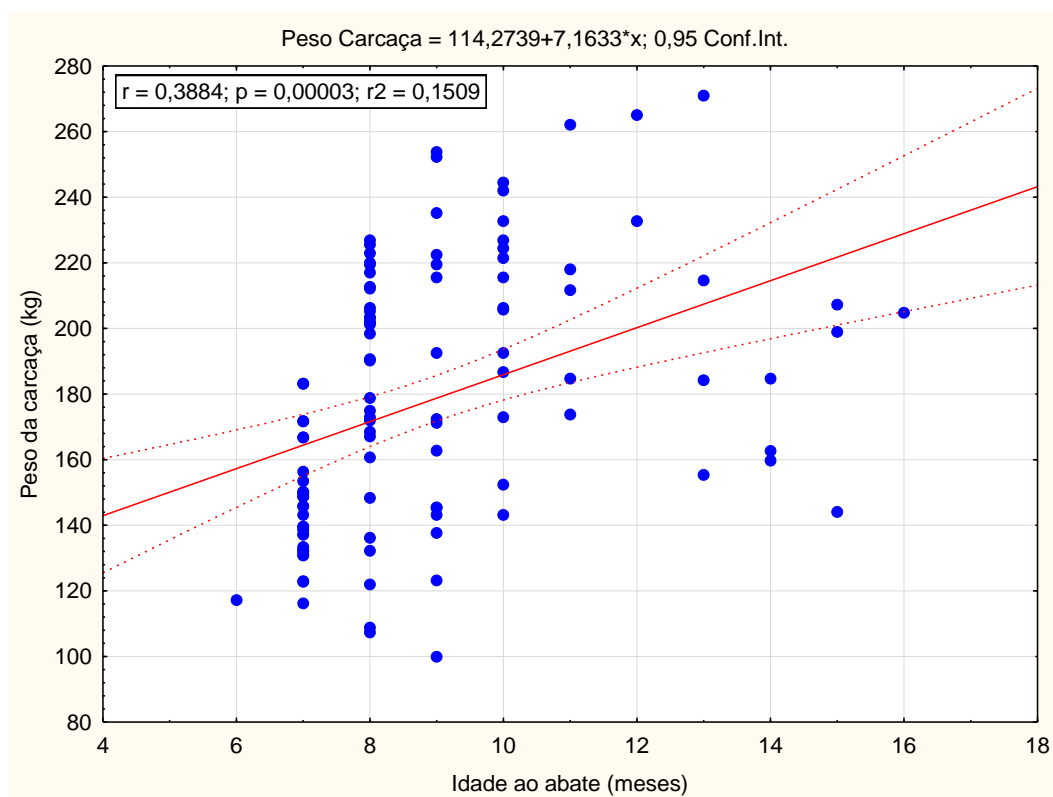


FIG.

FIG. 12 - GRÁFICO DE DISPERSÃO (REGRESSÃO LINEAR) ENTRE A IDADE AO ABATE E O PESO DA CARÇAÇA.

4.2. Polimorfismo nucleotídico simples UASMSI C>T

Dos 110 indivíduos amostrados, apenas em 11 foi possível obter resultados da análise genética para o SNP UASMSI; destes, 10 indivíduos pertenciam à exploração da Herdade de S. Pedro, e apenas 1 indivíduo à exploração Chainça da Elvirinha.

Assim, para avaliar a influência deste polimorfismo no peso das carcaças consideraram-se apenas os 10 indivíduos da Herdade de S. Pedro, e construiu-se um modelo linear que considerou o peso da carcaça como variável dependente, o polimorfismo nucleotídico simples para o UASMSI como fator e a idade em meses como covariável. Nem o polimorfismo do UASMSI nem a idade ao abate tiveram influência significativa sobre o peso da carcaça (ver Anexo II). Os valores das médias mínimo-quadráticas e erros padrão para cada genótipo apresentam-se no quadro 6. O valor médio da covariável foi de 8,90 meses.

QUADRO 6 – PESOS DE CARÇAÇA (MÉDIAS MÍNIMO QUADRÁTICAS ± ERROS PADRÃO) PARA OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP UASMSI NOS INDIVÍDUOS DA HERDADE DE S. PEDRO (N=10)

SNP UASMSI	CC (n = 3)	CT (n = 5)	TT (n = 2)
Peso da carcaça (kg)	218,87 ± 16,23	223,43 ± 11,94	193,07 ± 21,77

Embora a amostra seja diminuta, nestes 10 indivíduos as frequências alélicas foram de 55% para o alelo C e 45% para o alelo T, e as frequências genotípicas foram de 30% CC, 50% CT e 20% TT. Quando comparadas através do teste de Chi-Quadrado, estas frequências genotípicas não diferiram significativamente das esperadas numa população em equilíbrio.

4.3. Polimorfismo nucleotídico simples UASMS2 C>T

Obtiveram-se resultados para o UASMS2 em 95 dos 110 indivíduos amostrados, distribuídos pelas 4 explorações. Para avaliar o efeito do polimorfismo do gene da leptina nesta localização sobre o peso da carcaça, incluíram-se no modelo linear o polimorfismo e a exploração como factores de agrupamento e a idade ao abate como covariável (ver Anexo III). O peso da carcaça não variou significativamente entre os diferentes genótipos, e o efeito da exploração continuou a ser estatisticamente significativo. As médias mínimo-quadráticas do peso da carcaça nos três genótipos apresentam-se no quadro 7. O valor médio da covariável foi de 8,85 meses.

QUADRO 7 - PESOS DE CARÇAÇA (MÉDIAS MÍNIMO QUADRÁTICAS ± ERROS PADRÃO) PARA OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP UASMS2 (N=95)

SNP UASMS2	CC (n = 58)	CT (n = 30)	TT (n = 7)
Peso da carcaça (kg)	165,36 ± 3,87	167,21 ± 5,31	167,77 ± 11,36

As frequências alélicas foram de 76,84% para o alelo C e de 23,16% para o alelo T, e as frequências genotípicas para CC, CT e TT foram de 61,05%, 31,58% e 7,37%, respectivamente. Quando comparadas através do teste de Chi-Quadrado, estas frequências genotípicas não diferiram significativamente das esperadas numa população em equilíbrio.

4.4. Polimorfismo nucleotídico simples Exon2FB C>T

Foi possível obter resultados para o Exon2FB em 99 dos 110 indivíduos amostrados, distribuídos pelas 4 explorações. Na análise estatística, incluíram-se novamente no modelo linear o polimorfismo e a exploração como factores de agrupamento e a idade ao abate como covariável (ver Anexo IV). Também neste caso, não se verificou um efeito significativo dos diferentes genótipos relativos ao Exon2FB sobre o peso da carcaça, voltando o efeito da exploração a ser estatisticamente significativo. As médias mínimo-quadráticas do peso da carcaça nos três genótipos apresentam-se no quadro 8 (o valor médio da covariável foi de 8,85 meses).

QUADRO 8 - PESOS DE CARÇAÇA (MÉDIAS MÍNIMO QUADRÁTICAS ± ERROS PADRÃO) PARA OS DIFERENTES GENÓTIPOS DO SNP EXON2FB (N=99)

SNP Exon2FB	CC (n = 51)	CT (n = 25)	TT (n = 23)
Peso da carcaça (kg)	164,22 ± 4,17	170,39 ± 5,83	168,68 ± 6,00

As frequências alélicas foram de 64,14% para o alelo C e de 35,86% para o alelo T, e as frequências genotípicas de 51,52% para CC, 25,25% para CT e 23,23% para TT. Quando comparadas através do teste de Chi-Quadrado, estas frequências genotípicas não diferiram significativamente das esperadas numa população em equilíbrio.

5. Discussão

5.1. Relação entre a idade ao abate e o peso da carcaça

Os resultados demonstram que cerca de metade das fêmeas abatidas tinham até 8 meses de idade (estando na categoria “Vitela”), e as restantes tinham mais de 8 meses (situando-se, portanto, na categoria “Vitelão” e, em menor número, na categoria “Novilho”). A correlação positiva significativa entre a idade e o peso da carcaça era esperada em animais em crescimento, e no intervalo etário em concreto (dos 6 aos 16 meses de idade). A curva de crescimento dos bovinos segue um perfil sigmoide característico (Goonewardene *et al.*, 1981) (figura 13), em que a fase de crescimento máximo, associado a um aumento contínuo do ganho médio diário, ocorre até à fase da puberdade, inclusive (Godinho, 2014). Em raças de aptidão cárnica, as novilhas atingem a puberdade após os 13 a 15 meses (Almeida *et al.*, 2013).

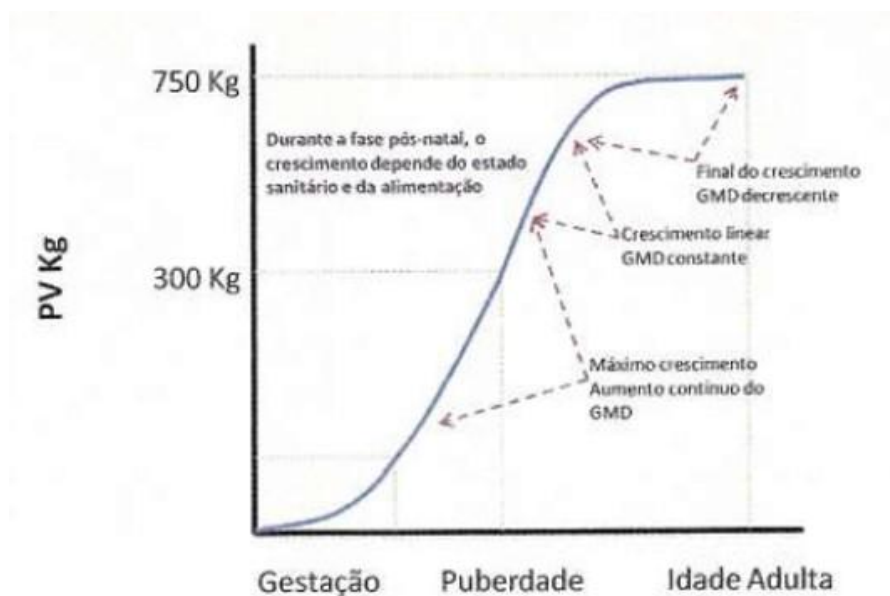


FIG. 13 – CURVA DE CRESCIMENTO DOS BOVINOS (FONTE: GODINHO, 2014)

Relativamente, aos pesos das carcaças, embora o valor médio tenha sido próximo de 180 kg, verificou-se uma dispersão apreciável, com uma frequência semelhante nas categorias 100 a 150 kg, 150 a 200 kg e 200 a 250 kg. Estes valores têm implicação comercial, designadamente naquilo que respeita ao canal de distribuição a que se destinam as carcaças, dado existirem limites impostos, por exemplo, pelas grandes superfícies de distribuição. Do ponto de vista zootécnico, dado as fêmeas terem ganhos médios diários (GMD) inferiores aos dos machos, e comecem a depositar gordura a uma idade inferior à dos machos, torna-se mais eficiente que o seu abate permita originar carcaças que não ultrapassem os 180 - 200kg (Godinho, 2014).

Tendo em consideração que todos os indivíduos provêm de efectivos cruzados de aptidão carne, o efeito estatisticamente significativo da Exploração sobre os pesos das carcaças permite deduzir que haverá diferenças apreciáveis no maneio dos animais, designadamente no que diz respeito à alimentação, e que se traduzem no peso significativamente superior das carcaças provenientes da Herdade de S. Pedro, quando comparadas com as restantes.

5.2. Polimorfismo do gene da leptina

Nos três SNP situados no gene da leptina pesquisados nos indivíduos da amostra parecem existir, de acordo com a literatura, efeitos fenotípicos apreciáveis associados aos alelos em que a Citosina (C) é substituída pela Timina (T) (Nkrumah *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2011; Woronuk *et al.*, 2012). Os resultados deste estudo não permitiram aferir qualquer efeito significativo dos diferentes genótipos sobre o peso das carcaças, para qualquer dos SNP pesquisados.

No caso do SNP UASMS1, o maior peso das carcaças observou-se no grupo CC. No entanto, a exiguidade da amostra não permite tirar qualquer conclusão, podendo este resultado dever-se unicamente ao acaso. Schenkel *et al.* (2005) observaram rendimentos magros superiores e rendimentos de gordura inferiores em animais com o genótipo CC. Dado que os animais em estudo se encontravam numa fase de crescimento, seria porventura admissível considerar que os resultados obtidos são compatíveis com os observados por estes autores, dado que na fase em questão o aumento de peso em músculo é, ainda, mais significativo do que o aumento de peso em gordura.

Já os resultados no SNP UASMS2 parecem ir ao encontro dos resultados de Nkrumah *et al.* (2005), já que o peso de carcaça inferior encontrou-se no grupo CC, sendo o valor mais elevado no grupo TT. Embora sem significado estatístico, os dados parecem confirmar a influência positiva dos alelos T no peso ao abate, e por consequência, no peso das carcaças.

Quanto aos resultados referentes ao SNP Exon2FB, verifica-se um peso de carcaça superior no grupo CT, seguido pelo grupo TT e sendo o grupo CC o que apresentou um peso médio de carcaça inferior. Relativamente ao SNP Exon2FB, Schenkel *et al.* (2005) observaram rendimentos de gordura superiores nos indivíduos CT, comparativamente aos dois genótipos restantes (embora, tal como no presente estudo, as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas). Já Nkrumah *et al.* (2004) observaram rendimentos de gordura superiores nos indivíduos TT. Woronuk *et al.* (2012) relatam uma correlação significativa entre os genótipos e o peso vivo, estando a presença dos alelos T inversamente relacionada com o peso vivo final. Estes resultados são contraditórios aos obtidos no presente estudo. Deve, no entanto,

considerar-se o facto de a amostra destes autores ser constituída por animais com idade média superior (cerca de 12 meses), pelo que os efeitos deste polimorfismo do gene da leptina poderão ter-se manifestado a outro nível, tendo em conta a curva de crescimento dos animais e a importância relativa da deposição de gordura nessa fase. Não foi possível aplicar um modelo estatístico que testasse o efeito conjugado das variações nas três localizações (haplotipos), uma vez que só foi possível obter o genótipo para os três SNP em 10 dos indivíduos amostrados.

Quanto às frequências alélicas encontradas, a do alelo C foi superior à do alelo T nos três SNP pesquisados (55,00% no UASMSI, 76,84% no UASMS2 e 64,14% no Exon2FB). Schenkel *et al.* (2005) calcularam a frequência destes mesmos alelos em 5 raças distintas, tendo obtido frequências superiores do alelo T no SNP UASMSI e frequências superiores do alelo C nos SNP UASMS2 e Exon2FB (quadro 9). Como foi referido anteriormente, o número reduzido de amostras em que foi possível identificar os genótipos do SNP UASMSI não constitui uma amostra significativa e que permita fazer qualquer ilação a este respeito. Relativamente ao SNP UASMS2, as frequências alélicas obtidas são semelhantes às obtidas por aqueles autores nas diferentes raças. Quanto ao SNP Exon2FB, observa-se nos resultados deste estudo uma frequência do alelo C aparentemente superior à encontrada noutras raças.

QUADRO 9 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS OBTIDAS EM DIFERENTES RAÇAS E OBTIDAS NA AMOSTRA EM ESTUDO

SNP	Freq. Alélica	Resultados obtidos por Schenkel <i>et al.</i> (2005)					Resultados VITAPEC
		Angus	Limousine	Charolês	Simmental	Outras	
UASMSI	%C	48,8	48,3	45,4	34,6	38,4	55,00
	%T	51,2	51,7	54,6	65,4	61,6	45,00
UASMS2	%C	73,3	65,5	77,3	69,8	74,4	76,84
	%T	26,7	34,5	32,7	30,2	25,6	23,16
Exon2FB	%C	45,4	51,7	54,6	58,8	58,3	64,14
	%T	54,6	48,3	45,4	41,2	41,7	35,86

O reduzido número de animais amostrados no presente estudo poderá justificar parcialmente as diferenças encontradas, dado que Schenkel *et al.* (2005) genotiparam 1111 animais para obter os citados resultados. Adicionalmente, importa referir que este estudo se realizou em animais cruzados de aptidão cárnica, sendo as raças com maior contribuição para os cruzamentos a Angus, Charolesa, Limousine e Simmental. Todas elas são raças melhoradas desde há muito tempo para produção de carne. Nos efectivos integrados no projecto VITAPEC, os tipos e proporções das raças utilizadas nos cruzamentos será certamente distinto, e será provavelmente relevante a contribuição de raças autóctones, nas quais o melhoramento genético para a produção de carne é ainda um processo muito recente.

Ainda que as diferenças nos fenótipos correspondentes aos diferentes genótipos não tenham sido significativas, os resultados poderão ser complementados através de outros estudos, com amostras mais numerosas, em que se consiga comprovar a vantagem produtiva de alguns alelos. Tal tornaria possível que uma seleção de reprodutores portadores dos alelos favoráveis viesse, a curto/médio prazo, a influenciar uma melhor performance produtiva nos efectivos. A ser assim, a genotipagem dos touros para pesquisa dos polimorfismos do gene da leptina poderia tornar-se mais uma ferramenta para apoio à decisão dos produtores.

As frequências genotípicas encontradas na amostra não foram significativamente diferentes das esperadas numa população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dado o número muito reduzido de animais amostrados, este facto não permite retirar qualquer conclusão, mas é consistente com uma ausência de seleção, quer directa quer indirectamente, para estes genótipos na população.

6. Conclusões

- Nos 110 bovinos do sexo feminino analisados, a idade média ao abate foi de 8,93 \pm 2,16 meses, e o peso médio da carcaça foi de 178,22 \pm 39,79 kg. Verificou-se existir uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a idade ao abate e o peso da carcaça ($r = 0,39$, $p < 0,001$). Verificou-se também existirem diferenças significativas entre explorações na idade ao abate e no peso das carcaças, permitindo admitir a existência de práticas de manejo dos animais substancialmente diferentes.
- Os resultados da pesquisa dos 3 SNP no gene da leptina mostraram existir variabilidade na população. No entanto, não se verificaram diferenças significativas nos resultados fenotípicos (peso das carcaças) em função dos genótipos encontrados.
- Em termos absolutos, as frequências alélicas obtidas parecem concordar com a que constam da literatura consultada, quer para o UASMS2, quer para o Exon2FB. Tal não se verificou nos resultados referentes ao UASMS1, mas neste caso a amostra reduziu-se a 10 indivíduos.
- As frequências genotípicas observadas convergiram com as esperadas numa população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Os resultados obtidos não permitem retirar conclusões taxativas; para tal, seria necessário dar continuidade ao estudo, alargando de forma expressiva o número de animais amostrados. No entanto, quer as frequências alélicas e genotípicas encontradas, quer os valores médios associados a cada genótipo, permitem admitir que, caso se confirme a vantagem de uns genótipos sobre outros, será possível utilizar a genotipagem dos touros reprodutores e a seleção de genótipos favoráveis como forma de melhorar os pesos das carcaças nestas populações.

7. Bibliografia

Almeida, OM; Pinho, RO; Lima, DMA; Martins, LF. (2013). Endocrinologia da puberdade em fêmeas bovinas. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, Ano IX, n.º 20 (Janeiro de 2013).

Buchanan, F. C., Van Kessel, A. G., Waldner, C., Christensen, D. A., Laarveld, B., & Schmutz, S. M. (2003). Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3164-3166.

Campos, V. F. (1992). *TQC: controle da qualidade total*. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 11.

Canhas, I. (2017). *Genética*. Disponível online em <https://www.infoescola.com/ciencias/genetica/>, consulta a 23/09/2017.

Carolino, M.I. (2015). *Influências genéticas nas características da carcaça e carne em bovinos*. Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária, 182 pp. *on-line*, consulta a 12/09/2017, disponível em http://www.pecuaria.pt/docs/Tese%20doutoramento%20definitiva_Ines%20Carolino.pdf

Clempson, AM; Pollott, GE; Brickell, JS; Bourne, NE; Munce, N; Wathes, DC; 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94 :3618–3628. doi: 10.3168/jds.2010-3626

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.*, February 1;334(5):292-5. doi: 10.1056/NEJM199602013340503

Eler, JP (2014). *Teorias e métodos em melhoramento genético animal: I Bases do melhoramento genético animal*, Pirassununga, 241 f. Disponível online em <https://pt.scribd.com/document/266453417/melhoramento-animal>, consulta a 23/09/2017.

Felício, P. E. (1997). *Fatores ante e post mortem que influenciam na qualidade da carne bovina*.

Gama, LT (2002). *Melhoramento Genético Animal*. Escolar Editora.

Geary, T. W., McFadin, E. L., MacNeil, M. D., Grings, E. E., Short, R. E., Funston, R. N., & Keisler, D. H. (2003). Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 81(1), 1-8.

Godinho, A. (Maio de 2014). Bases fisiológicas do crescimento e engorda. *Notícias Limousine*, pp. 98-100.

Goonewardene, LA; Ver, RT; Hardin, RT (1981). A growth study of beef cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 61: 1041-1048.

Landi, V & Quiroz Valiente (2011). *Los Avances De Las Nuevas Tecnologías Genéticas Y Su Aplicación En La Selección Animal*

Lau, E., Freitas, P., Oliveira, A. I., & Carvalho, D. (2014). A leptina e o seu impacto metabólico nas lipodistrofias. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, 9(1), 36-40.

Lusk, J. L. (2007). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle I. *Journal of Animal Science* 85:1865-1872. doi:10.2527/jas.2006-665

McEvers, T. J., Dorin, L. C., Berg, J. L., Royan, G. F., Hutcheson, J. P., Appleyard, G. D., ... & Lawrence, T. E. (2013). Effect of leptin genotype and zilpaterol hydrochloride supplementation on the growth rate and carcass characteristics of finishing steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 93(2), 199-204.

Moore, S.S. (2011). Leptin promoter polymorphisms and uses thereof. Patent n° US 7947444 B2

Nkrumah JD, Li C, Basarab JB, Guercio S, Meng Y, Murdoch B, Hansen C and Moore SS. (2004). Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Canadian Journal of Animal Science* 84, 211-219.

Nkrumah JD, Li C, Yu J, Hansen C, Keisler DH, Moore SS. (2005). Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *J Anim Sci.*, 83(1):20-8.

Pinto LFB, Ferraz JBS, Pedrosa VB, Eler JP, Meirelles F V., Bonin MN, et al. (2011). Single nucleotide polymorphisms in CAPN and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nelore cattle. *Genet. Mol. Res.*;10:2057-64.

Ruane, J., & Sonnino, A. (2011). Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 356-363.

Schenkel FS; S. P. Miller, SP; Ye, X; Moore, SS; Nkrumah, JD; Li, C; Yu, J; Mandell, IB; Wilton, JW; Williams, JL. (2005). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 83:2009–2020.

Silva, R. C. G.; Ferraz, J. B. S.; Meirelles, F. V.; Eler, J. P.; Balieiro, J. C. C.; Cucco, D. C.; Mattos, E. C.; Rezende, F. M.; Silva, S. L. (2012). Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nelore cattle. *Genetics and Molecular Research, Ribeirao Preto*, v. 11, n. 4, supl., Part 3, pp. 3721-3728

Tang G., X. Li, G. Plastow, S.S. Moore, Z. Wang (2011). Developing marker-assisted models for evaluating growth traits in Canadian beef cattle genetic improvement. *Livestock Science* 138 62–68.

Taniguchi, Y., Itoh, T., Yamada, T., & Sasaki, Y. (2002). Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. *IUBMB life*, 53(2), 131-135.

Thompson, N. M., DeVuyst, E. A., Brorsen, B. W., & Lusk, J. L. (2014). Value of Genetic Information for Beef Cattle at the Feedlot Stage. In 2014 Annual Meeting, February 1-4, 2014, Dallas, Texas (No. 162431). Southern Agricultural Economics Association.

Van Eenennaam, A. L., & Drake, D. J. (2012). Where in the beef-cattle supply chain might DNA tests generate value? *Animal Production Science*, 52(3), 185-196.

Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., ... & Thomas, M. G. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 85(4), 891-900.

Woronuk, G. N., Marquess, F. L., James, S. T., Palmer, J., Berryere, T., Deobald, H., ... & Kononoff, P. J. (2012). Association of leptin genotypes with beef cattle characteristics. *Animal Genetics*, 43(5), 608-610.

Yamada, T., Kawakami, S., Nakanishi, N., (2003). The relationship between plasma leptin concentrations and distribution of body fat in crossbred steers. *Journal of Animal Science* 74, 95–100.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425–432.

Anexos

Anexo I: ANOVA/ANCOVA (efeito da Exploração sobre a Idade ao Abate e Peso da Carça)

Effect	Univariate Results for Each DV - Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition								
	DF	Idade SS	Idade MS	Idade F	Idade p	Peso Carça SS	Peso Carça MS	Peso Carça F	Peso Carça p
Intercept	1	7273,131	7273,131	1654,851	0,000000	2543940	2543940	2392,403	0,000000
Exploração	3	41,544	13,848	3,151	0,028031	59866	19955	18,767	0,000000
Error	106	465,874	4,395			112714	1063		
Total	109	507,418				172580			

Anexo II: ANOVA/ANCOVA (efeito do genótipo UASMSI e da Idade ao Abate sobre o Peso da Carça)

Effect	Univariate Tests of Significance for Peso Carça Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 26,55832				
	SS	DF	MS	F	p
Intercept	2058,664	1	2058,664	2,918664	0,138423
Idade_Meses	42,280	1	42,280	0,059943	0,814744
"UASMI"	1008,237	2	504,118	0,714712	0,526730
Error	4232,068	6	705,345		

Anexo III: ANOVA/ANCOVA (efeito do genótipo UASMS2, da Exploração e da Idade ao Abate sobre o Peso da Carça)

Effect	Univariate Tests of Significance for Peso Carça Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 28,24179				
	SS	DF	MS	F	p
Intercept	30312,32	1	30312,32	38,00445	0,000000
Idade_Meses	27036,66	1	27036,66	33,89756	0,000000
"UASM2"	84,23	2	42,12	0,05280	0,948597
Exploração	58725,68	3	19575,23	24,54269	0,000000
Error	70188,72	88	797,60		

Anexo IV: ANOVA/ANCOVA (efeito do genótipo Exon2FB, da Exploração e da Idade ao Abate sobre o Peso da Carça)

Effect	Univariate Tests of Significance for Peso Carça Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition; Std. Error of Estimate: 28,03987				
	SS	DF	MS	F	p
Intercept	40066,41	1	40066,41	50,95986	0,000000
Idade_Meses	30690,18	1	30690,18	39,03438	0,000000
Exploração	64091,59	3	21363,86	27,17237	0,000000
Exon 2FB	713,48	2	356,74	0,45373	0,636665
Error	72333,59	92	786,23		