

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0621689-7 A2**

BRPI0621689A2

(22) Data de Depósito: 26/05/2006

(43) **Data da Publicação:** 20/12/2011
(RPI 2137)

(51) Int.Cl.:

C12Q 1/68

C12P 19/34

C07H 21/02

C07H 21/04

G06F 17/00

G07F 15/00

(54) Título: POLIMORFISMOS EM GENE DE FATOR A DE TRANSCRIÇÃO MITOCONDRIAL ("TFAM") E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA

(73) Titular(es): Merial Limited

(72) Inventor(es): Brent Woodward

(74) Procurador(es): Di Blasi, Parente, Vaz e Dias & Al

(86) Pedido Internacional: PCT US2006020775 de 26/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/139547 de 06/12/2007

(57) Resumo: POLIMORFISMOS EM GENE DE FATOR A DE TRANSCRIÇÃO MITOCONDRIAL ("TFAM") E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA. A regulação fisiológica de ingestão, crescimento e particionamentO de energia em animais está sob o controle de genes múltiplos que podem ser importanteS candidatos para resolver a variação genética de características economicamente relevantes na produção de carne bovina. A presente invenção se refere à identificação de únicos polimorfismos de nucleotídeos (SNPs), dentro dos genes bovinos que codificam fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM") e suas associações com características economicamente relevantes na produção de carne bovina. A invenção engloba adicionalmente métodos e sistemas, incluindo processos baseados em redes, para gerenciar os dados de SNP e outros dados relacionados a anrrnars específicos e a rebanhos de animais, cuidados veterinários, dados de controle de qualidade e diagnósticos e o gerenciamento de animais domésticos, que, baseados no genótipo, têm características de qualidade de carne previsíveis, condições pecuárias, bem-estar animal, informações de segurança alimentar, auditoria de processos existentes e dados a partir de locais no campo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
**"POLIMORFISMOS EM GENE DE FATOR A DE TRANSCRIÇÃO
 MITOCONDRIAL ("TFAM") E SUAS ASSOCIAÇÕES COM
 CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA"**

5 **INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA**

Todos os documentos citados ou referenciados nos documentos citados no pedido, e todos os documentos citados ou referenciados aqui ("documentos citados aqui"), e todos os documentos citados ou referenciados nos documentos citados aqui, em conjunto com quaisquer instruções, descrições, especificações de produto e folhas de produtos do fabricante, para quaisquer produtos mencionados aqui ou em qualquer documento aqui incorporado por referência, são por meio disso aqui incorporados por referência, e podem ser empregados na prática da invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere à identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) dentro dos genes bovinos que codifiquem fator A de transcrição mitochondrial ("TFAM") e suas associações com características economicamente relevantes na produção de carne bovina. A invenção se refere adicionalmente a métodos e a sistemas, incluindo processos baseados em rede, para gerenciar os dados de SNP e outros dados relacionados a

animais específicos e a rebanhos de animais, cuidados veterinários, dados de controle de qualidade e diagnósticos e gerenciamento de animais de criação, que, com base na tipificação de genótipo, tenham características de
5 qualidade de carne previsíveis, condições pecuárias, bem-estar animal, informação de segurança alimentar, auditoria de processos existentes e dados a partir de locais de campo.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Aperfeiçoamentos significativos em desempenho animal, eficiência e qualidade de carcaça e de carne têm sido feitos durante os anos, por meio da aplicação de técnicas padrão de seleção e de criação animal. Entretanto, tais técnicas de criação animal clássicas demandam vários anos
15 de avaliação genética de registros de desempenho sobre animais individuais e de seus parentes e, portanto, são muito caros. Outros esforços têm sido feitos para aperfeiçoar a produtividade e a qualidade por meio da aplicação de tais práticas de gerenciamento, como o uso de
20 aditivos de ração animal, implantes hormonais animais e quimioterápicos. Entretanto, existe significativa resistência política e regulatória à introdução e ao uso de tais metodologias. Tais metodologias são também não hereditárias e necessitam ser aplicadas diferentemente em

cada sistema de produção.

Existe uma demanda por métodos que permitam a seleção relativamente fácil e mais eficiente e a criação de animais de fazenda com uma vantagem para uma característica hereditária de níveis de leptina circulantes, ingestão de ração animal, taxa de crescimento, peso do corpo, mérito de carcaça e composição de carcaça. O significado econômico do uso de marcadores genéticos, que estejam associados com características economicamente importantes específicas (especialmente características com baixa hereditariedade) em animais de criação por meio de seleção auxiliada por marcador não pode, portanto, ser superestimada.

A regulação fisiológica da ingestão, crescimento e distribuição de energia em animais está sob o controle de múltiplos genes, que podem ser candidatos importantes para deslindar a variação genética em características economicamente relevantes (ERT) na produção de carne bovina. Polimorfismos nesses genes candidatos, que mostram associação com ERT específicas, são nucleotídeos de características quantitativas úteis para seleção auxiliada por marcador.

Fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM"), um membro de uma família de proteínas de grupo de elevada mobilidade e o fator de transcrição mitocondrial

identificado pela primeira vez (Fisher e Clayton, Mol Cell Biol. 1988; 8:3496-509), é essencial para a manutenção e a biogênese de ADN mitocondrial (mtADN). Em primeiro lugar, TFAM desempenha um papel similar à histona na mitocôndria, uma vez que ela está firmemente associada com mtADN como um componente principal do nucleóide (Kanki et al. Mol Cell Biol. 2004; 24:9823-34). Evidências mostraram que uma molécula de mtADN está empacotada com cerca de 900 moléculas de TFAM em média (Alam et al. Nucleic Acids Res. 2003; 31:1640-5), o que faz com que mtADN não mais esteja desnudo. Em segundo lugar, TFAM regula o número de cópias de mtADN em mamíferos. Investigação utilizando uma combinação de camundongos com super-expressão de TFAM e deficiência (*knockout*) de TFAM demonstrou que o número de cópias de mtADN é diretamente proporcional ao nível de proteína de TFAM total em embriões de camundongo (Ekstrand et al. Hum Mol Genet. 2004; 13 :935-44). A interferência de ARN da expressão de TFAM endógeno em células HeLa também indicou que a quantidade de mtADN está correlacionada em paralelo com a quantidade de TFAM (Kanki et al. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1011:61-8). Em terceiro lugar, TFAM estimula a transcrição de mtADN. A proteína de TFAM possui dois domínios de grupo de elevada mobilidade tandem, o que faz com que TFAM se ligue a, libere e dobre ADN sem

especificidade de sequência e, portanto, facilite a iniciação de transcrição de mtADN (Gaspari et al. 2004; 1659:148-52). Evidências mostraram que a importação de wt-TFAM para as mitocôndrias do fígado a partir de ratos com hipotireoidismo aumentou a síntese de ARN de maneira significativa em até 4 vezes (Garstka et al. Nucleic Acids Res. 2003; 31:5039-47).

Já é sabido há muito anos que o tecido adiposo desempenha um papel central na regulação e na manipulação de metabolismos de energia por meio do armazenamento e rotatividade de triglicerídeos e por meio da secreção de fatores que afetem a saciedade e a utilização de combustível. Entretanto, muitos aspectos chave da adipogênese são acompanhados pela estimulação de biogênese mitocondrial (Wilson-Fritch et al. Mol Cell Biol. 2003; 23:1085-94). Por exemplo, o principal sítio de β -oxidação de ácidos graxos ocorre em mitocôndrias (Reichert e Neupert, Trends Genet. 2004; 20:555-62), o que pode fornecer intermediários chave para a síntese de triglicerídeos via a ação de piruvato carboxilase (Owen et al. J Biol Chem. 2002; 277:30409-12). Além disso, uma massa mitocondrial relativamente grande é necessária para gerar acetil-CoA para a ativação de ácidos graxos antes da esterificação para formar triglicerídeos. Todos esses

estudos demonstraram o papel e a função essenciais das mitocôndrias no metabolismo de lipídeos.

Para se explorar adicionalmente o mecanismo de mitocôndrias envolvidas em adipogênese, Wilson-Fritch e colaboradores (Wilson-Fritch et al. Mol Cell Biol. 2003; 23:1085-94 e Wilson-Fritch et al. J Clin Invest. 2004; 114:1281-9) estudaram a diferenciação de células 3T3-L1 (representativas de adipócitos brancos) por uso de abordagens tanto proteômicas quanto genômicas. A análise proteômica revelou um aumento de 20 a 30 vezes na concentração de inúmeras proteínas mitocondriais, enquanto que a análise genômica com a perfilação de expressão de genes, usando Affymetrix GeneChips, detectou um aumento estatisticamente significativa na expressão de muitos genes mitocondriais codificados no núcleo durante a adipogênese. Em particular, os inventores constataram uma profunda diminuição de aproximadamente 50% nos níveis de transcritos para genes mitocondriais codificados no núcleo acompanhando o início de obesidade (Wilson-Fritch et al. J Clin Invest. 2004; 114:1281- 9).

Permanece vantajoso fornecer SNPs adicionais que possam predizer de maneira mais acurada o fenótipo de um animal e também um método de negócio que forneça eficiências de produção aumentadas em criação de gado

bovino, assim como fornecimento de acesso a vários registros dos animais e que permita comparações com objetivos esperados ou desejados com respeito à qualidade e à quantidade de animais produzidos.

5 A citação ou a identificação de qualquer documento neste pedido não é uma admissão de que tal documento está disponível como técnica anterior à presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção se refere à identificação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) dentro dos genes bovinos que codificam fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM") e suas associações com características economicamente relevantes na produção de carne bovina.

15 A invenção engloba um método para subgrupar animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um polimorfismo similar em um gene TFAM, que pode compreender a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de
20 polimorfismo de um único nucleotídeo no gene TFAM, e a segregação de animais individuais em subgrupos, sendo que cada animal em um subgrupo tem um polimorfismo similar no gene TFAM.

A invenção também engloba um método para subgrupar

animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um genótipo similar no gene TFAM, que pode compreender a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse no gene TFAM, e a segregação de animais individuais em subgrupos dependendo de se os animais tenham, ou não tenham, o(s) polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse no gene TFAM.

O(s) polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse pode(m) ser selecionado(s) a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição -1220 no promotor do gene TFAM, uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

A invenção de refere adicionalmente a um método para subgrupar animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um genótipo similar no gene TFAM, que pode compreender a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de qualquer um dos SNPs acima, e a segregação de animais individuais em subgrupos dependendo de se os animais tenham, ou não tenham, qualquer um dos SNPs acima no gene TFAM.

A invenção também se refere a método para identificar um animal tendo um fenótipo desejável, quando comparado à população geral de animais daquela espécie, que pode compreender a determinação da presença de polimorfismo de um único nucleotídeo no gene TFAM do animal, sendo que a
5 presença do SNP é indicativa de um fenótipo desejável.

Em uma concretização vantajosa, o animal pode ser um bovino. Em outra concretização vantajosa, o gene TFAM pode ser um gene ~~TFAM bovino.~~

10 A invenção também engloba métodos e sistemas auxiliados por computador para o aperfeiçoamento da eficiência de produção para criação animal tendo carne macia comercializável usando dados múltiplos, e, em particular, o genótipo dos animais quando ele se relacionar
15 a SNPs de TFAM. Os métodos da invenção englobam a obtenção de uma amostra genética a partir de cada animal em um rebanho de animais de criação, a determinação do genótipo de cada animal com respeito às características de qualidade específicas conforme definidas por um painel de pelo menos
20 dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), o agrupamento de animais com genótipos similares e, opcionalmente, o subgrupamento adicional de animais com base em fenótipos similares. Os métodos da invenção também podem englobar a obtenção e a manutenção de dados que se

relacionem aos animais ou aos rebanhos, a suas condições pecuárias, aos cuidados e à condição de saúde e veterinários, ao histórico genético ou parentesco, e o fornecimento destes dados a outros por meio de sistemas que estejam baseados em rede, contidos em um banco de dados ou fixados no próprio animal, tal como por um *microchip* implantado. Portanto, um aspecto vantajoso da presente invenção é dirigido a um sistema de computador e a métodos auxiliados por computador para o rastreamento de características de qualidade para criação animal possuindo predisposições genéticas específicas.

A presente invenção engloba, de maneira vantajosa, métodos e sistemas auxiliados por computador para a aquisição de dados genéticos, particularmente, de dados genéticos conforme definidos pela ausência ou presença de um SNP dentro do gene TFAM relacionado às características de qualidade da carne da criação de animal e a associação daqueles dados com outros dados sobre o animal ou seu rebanho, e a manutenção daqueles dados de maneiras que sejam acessíveis. Outro aspecto da invenção engloba um método auxiliado por computador para predizer que animais de criação animal possuem uma diferença biológica em qualidade de carne, e que pode incluir as etapas de uso de um sistema de computador, por exemplo, um computador

programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um dispositivo de entrada e um dispositivo de saída, as etapas de: (a) entrada, no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados que incluem o genótipo de um animal quando ele se relacionar a qualquer um dos SNPs de TFAM aqui descritos, (b) a correlação da qualidade de carne predita pelo genótipo de TFAM usando o processador e o sistema de armazenamento de dados e (c) a saída, para o dispositivo de saída, da qualidade de carne correlacionada ao genótipo de TFAM, por meio do quê se prediz quais animais de criação animal possuem uma qualidade de carne em particular.

Ainda outro aspecto da invenção se refere a um método de fazer negócios para o gerenciamento de criação animal, compreendendo o fornecimento, a um usuário, de um sistema de computador para o gerenciamento de criação animal, compreendendo características físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais, ou um meio legível por computador para o gerenciamento de criação animal compreendendo características físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais, ou características físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais, sendo que uma característica física é ingestão, crescimento ou mérito de carcaça em gado bovino de corte e o genótipo é

um genótipo TFAM.

Observa-se que, nesse relatório descritivo e particularmente nas reivindicações e/ou parágrafos, termos tais como "compreende", "compreendido", "compreendendo" e os similares podem ter o significado a eles atribuído na Lei de Patentes Norte-Americana; por exemplo, eles podem significar "inclui", "incluído", "incluindo", e os similares; e que termos tais como "consistindo essencialmente em" e "consiste essencialmente em" têm o significado conferido a eles na Lei de Patentes Norte-Americana, por exemplo, eles admitem elementos não explicitamente mencionados, mas, excluem elementos que sejam encontrados na técnica anterior ou que afetem uma característica básica ou nova da invenção.

Essas e outras concretizações são reveladas ou são óbvias a partir de e englobadas por, a seguinte Descrição Detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A seguinte descrição detalhada, dada por meio de exemplo, mas não pretendida a limitar a invenção unicamente às concretizações específicas descritas, pode ser melhor entendida em conjunto com os desenhos acompanhantes, nos quais:

A Figura 1 fornece uma anotação esquemática de

seqüências de cADN e de ADN genômico do gene TFAM bovino usando uma combinação de abordagem *in silico* com amplificação de região de alvo de PCR.

A Figura 2 fornece uma seqüência de nucleotídeos da região à montante do gene TFAM bovino (SEQ ID NO: 1). Essa seqüência corresponde à região flanqueante de 5' e ao éxon 1. A seqüência de codificação está sombreada. O sítio de transcrição putativo foi numerado como +1. Seqüências de consenso para SP1, NRF1 e repressor de transcrição potenciais são mostradas por setas. Muitos *loci* mCpG potenciais estão sublinhados. Um códon AUG extra, à montante do sítio de tradução normal, está em negrito e marcado. Substituições tanto C/A quanto C/T estão marcadas por setas e números.

A Figura 3 fornece uma demonstração de um SNP C/A e de um SNP C/T na região de promotor de TFAM bovino. Esquerda: um homozigoto com CC e CC; Direita: um homozigoto com AA e TT em duas posições separadas por 9 pb inclusive.

A Figura 4 fornece a tipificação de genótipo por OCR-RFLP de dois SNPs no promotor de TFAM bovino. Pistas 1 e 8: escadas de 100 pb. Pistas 2 - 7: um fragmento de 801 pb foi digerido com a enzima de restrição *DpnII*. Pistas 2 e 3: animais TT (55+68+135+241+302 pb); pistas 4 e 5, animais CT (55+68+135+241+302+543 pb); e pistas 6 e 7, animais CC

(55+68+135+543 pb). Pistas 9 - 14: um fragmento de 801 pb foi digerido com a enzima de restrição *HaeIII*. Pistas 9 e 10, animais AA (152+187+462 pb); pistas 11 e 12, animais CA (83+104+152+187+462 pb); e pistas 13 e 14, animais CC (83+104+152+462 pb).

A Figura 5 identifica polimorfismos genéticos nos genes TFAM, TFB1M e TFB2M bovinos. A. Uma terceira mutação de substituição C/T na região de promotor TFAM. B. Duas mutações detectadas no gene TFB1M bovino usando conjuntos de ADN. C. Cinco mutações desenvolvidas no gene TFB2M bovino usando conjuntos de ADN.

A Figura 6A fornece uma sequência de cADN de TFAM de gado bovino (2259 pb) (SEQ ID NO: 2).

A Figura 6B fornece uma sequência de ADN genômico de TFAM de gado bovino (16666 pb) (SEQ ID NO: 3). Éxons estão sombreados, assim como os sítios de mutação. Ver, por exemplo, os Números de Acesso ao GenBank AAFC02110692 e AAFC02019444.

A Figura 7 ilustra um fluxograma da entrada de dados e da saída de resultados a partir da análise e da correlação dos dados pertinentes à criação, aos históricos veterinários e às exigências de desempenho de um grupo de animais, tais como a partir de um rebanho de vacas, e o fluxo interativo de dados a partir do dispositivo auxiliado

por computador para um corpo de estudantes aprendendo a usar o método da invenção.

A Figura 8 ilustra os relacionamento potenciais entre os elementos de dados a serem alimentados ao sistema.

5 Flechas unidirecionais indicam, por exemplo, que um estábulo tipicamente pertence a uma única fazenda, enquanto que uma fazenda pode ser dona de vários estábulos. Similarmente, uma prescrição pode incluir produtos veterinários.

10 A Figura 9A ilustra o fluxo de eventos no uso do sistema baseado em computador portátil para a entrada de dados sobre a criação e manutenção de um rebanho de vacas.

A Figura 9B ilustra o fluxo de eventos através das subrotinas relacionadas à entrada de dados ligadas ao
15 gerenciamento da fazenda.

A Figura 9C ilustra o fluxo de eventos através das subrotinas relacionadas à entrada de dados ligada aos dados específicos de uma companhia.

20 A Figura 10 ilustra um fluxograma da entrada de dados e da saída de resultados a partir da análise e da correlação dos dados pertinentes à criação, aos históricos veterinários e às exigências de desempenho de um grupo de animais.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A prática da presente invenção empregará, a menos se indicado de outra maneira, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, tecnologia de ADN recombinante e imunologia, que estejam dentro da capacidade da técnica. Tais técnicas estão completamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, terceira edição, Cold Spring Harbor Press; DNA Cloning, Vols. I e II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); a série "Methods In Enzymology" (S. Colowick e N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); e "Handbook of Experimental Immunology", Vols. I-IV (D. M. Weir e C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve ser entendido que esta invenção não está limitada a ADN, seqüências de polipeptídeos ou parâmetros de processo em particular, como tais, eles podem, obviamente, variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada aqui é para a finalidade de somente descrever concretizações particulares da invenção, e não se pretende que ela seja

limitante.

A menos se definido de outra maneira, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como entendidos comumente por um técnico especializado no assunto, ao qual a invenção diz respeito. Embora inúmeros métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática da presente invenção, os materiais e métodos preferidos são descritos aqui.

10 Na descrição da presente invenção, os seguintes termos serão empregados e se pretende que sejam definidos conforme indicado abaixo.

O termo "vaca" ou "gado" é usado de maneira genérica para se referir a um animal de origem bovina de qualquer idade. Termos intercambiáveis incluem "bovino", "bezerro", "novilho", "touro", "vitela" e os similares. Ele também inclui um animal individual em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo os estágios embrionário e fetal. Os animais a que se refere aqui podem incluir também

20 indivíduos ou grupos de indivíduos que sejam criados com finalidades diferentes que a da produção de alimentos, tais como, mas, não limitadas a, animais transgênicos para a produção de biofármacos, incluindo anticorpos e outras proteínas e produtos de proteínas.

Pelo termo "complementariedade" ou "complementar" entende-se, para as finalidades do relatório descritivo ou das reivindicações, um número suficiente no oligonucleotídeo de pares de bases complementares em sua
5 sequência para interagirem de maneira específica (hibridizarem-se) com uma sequência de ácidos nucléicos alvo do polimorfismo de gene a ser amplificado ou detectado. Conforme conhecido pelos técnicos especializados no assunto, um grau muito elevado de complementariedade é
10 necessário para especificidade e sensibilidade envolvendo a hibridização, embora ela não necessite que seja de 100%. Portanto, por exemplo, um oligonucleotídeo que seja idêntico em sequência de nucleotídeos a um oligonucleotídeo revelado aqui, exceto por uma mudança ou substituição de
15 bases, pode funcionar de maneira equivalente aos oligonucleotídeos revelados. Um gene de "ADN complementar" ou de "cADN" inclui genes recombinantes sintetizados por transcrição reversa de ARN mensageiro ("mARN").

Uma "reação mediada por polimerase cíclica" se refere
20 a uma reação bioquímica, na qual uma molécula de molde ou uma população de moléculas de molde é copiada de maneira periódica e repetida, para criar uma molécula de molde complementar ou moléculas de molde complementares, por meio do quê se aumenta o número das moléculas de molde ao longo

do tempo.

Pelo termo "porção detectável" entende-se, para as finalidades do relatório descritivo ou das reivindicações, uma molécula de rótulo (isotópica ou não isotópica), que
5 seja incorporada de maneira indireta ou direta, a um oligonucleotídeo, sendo que a molécula de rótulo facilita a detecção do oligonucleotídeo ao qual ela estiver incorporada, por exemplo, quando o oligonucleotídeo estiver hibridizado com seqüências polimórficas de genes
10 amplificadas. Portanto, "porção detectável" é usado de maneira sinônima com "molécula de rótulo". Síntese de oligonucleotídeos pode ser realizada por qualquer um de vários métodos conhecidos pelos técnicos especializados no assunto. Moléculas de rótulo, conhecidas pelos técnicos
15 especializados no assunto como sendo úteis para a detecção, incluem moléculas quimioluminescentes, fluorescentes ou luminescentes. Várias moléculas fluorescentes são conhecidas na técnica, as quais são adequadas para uso para rotular um ácido nucléico para o método da presente
20 invenção. O protocolo para tal incorporação pode variar, dependendo da molécula fluorescente usada. Tais protocolos são conhecidos na técnica para a respectiva molécula fluorescente.

"Amplificação de ADN", conforme usado aqui, se refere

a qualquer processo que aumente o número de cópias de uma sequência de ADN específica, por amplificação de maneira enzimática da sequência de ácidos nucleicos. Uma variedade de processos é conhecida. Um dos mais comumente usados é o

5 processo de reação em cadeia com polimerase (PCR), de Mullis, conforme descrito nas patentes norte-americanas de números 4.683.195 e 4.683.202. Métodos, dispositivos e reagentes, conforme descritos nas patentes norte-americanas de números 6.951.726; 6.927.024; 6.924.127; 6.893.863;

10 6.887.664; 6.881.559; 6.855.522; 6.855.521; 6.849.430; 6.849.404; 6.846.631; 6.844.158; 6.844.155; 6.818.437; 6.818.402; 6.794.177; 6.794.133; 6.790.952; 6.783.940; 6.773.901; 6.770.440; 6.767.724; 6.750.022; 6.744.789; 6.733.999; 6.733.972; 6.703.236; 6.699.713; 6.696.277;

15 6.664.080; 6.664.064; 6.664.044; RE 38.352; 6.650.719; 6.645.758; 6.645.720; 6.642.000; 6.638.716; 6.632.653; 6.617.107; 6.613.560; 6.610.487; 6.596.492; 6.586.250; 6.586.233; 6.569.678; 6.569.627; 6.566.103; 6.566.067; 6.566.052; 6.558.929; 6.558.909; 6.551.783; 6.544.782;

20 6.537.752; 6.524.830; 6.518.020; 6.514.750; 6.514.706; 6.503.750; 6.503.705; 6.493.640; 6.492.114; 6.485.907; 6.485.903; 6.482.588; 6.475.729; 6.468.743; 6.465.638; 6.465.637; 6.465.171; 6.448.014; 6.432.646; 6.428.987; 6.426.215; 6.423.499; 6.410.223; 6.403.341; 6.399.320;

	6.395.518;	6.391.559;	6.383.755;	6.379.932;	6.372.484;
	6.368.834;	6.365.375;	6.358.680;	6.355.422;	6.348.336;
	6.346.384;	6.319.673;	6.316.195;	6.316.192;	6.312.930;
	6.309.840;	6.309.837;	6.303.343;	6.300.073;	6.300.072;
5	6.287.781;	6.284.455;	6.277.605;	6.270.977;	6.270.966;
	6.268.153;	6.268.143;	D445.907;	6.261.431;	6.258.570;
	6.258.567;	6.258.537;	6.258.529;	6.251.607;	6.248.567;
	6.235.468;	6.232.079;	6.225.093;	6.221.595;	D441.091;
	6.218.153;	6.207.425;	6.183.999;	6.183.963;	6.180.372;
10	6.180.349 ;	6.174.670;	6.153.412;	6.146.834;	6.143.496;
	6.140.613;	6.140.110;	6.103.468;	6.087.097;	6.072.369;
	6.068.974;	6.063.563;	6.048.688;	6.046.039;	6.037.129;
	6.033.854;	6.031.960;	6.017.699;	6.015.664;	6.015.534;
	6.004.747;	6.001.612;	6.001.572;	5.985.619;	5.976.842;
15	5.972.602;	5.968.730;	5.958.686;	5.955.274;	5.952.200;
	5.936.968;	5.909.468;	5.905.732;	5.888.740;	5.883.924;
	5.876.978;	5.876.977;	5.874.221;	5.869.318;	5.863.772;
	5.863.731;	5.861.251;	5.861.245;	5.858.725;	5.858.718;
	5.856.086;	5.853.991;	5.849.497;	5.837.468;	5.830.663;
20	5.827.695;	5.827.661;	5.827.657;	5.824.516;	5.824.479;
	5.817.797;	5.814.489;	5.814.453;	5.811.296;	5.804.383;
	5.800.997;	5.780.271;	5.780.222;	5.776.686;	5.774.497;
	5.766.889;	5.759.822;	5.750.347;	5.747.251;	5.741.656;
	5.716.784;	5.712.125;	5.712.090;	5.710.381;	5.705.627;

5.702.884; 5.693.467; 5.691.146; 5.681.741; 5.674.717;
 5.665.572; 5.665.539; 5.656.493; 5.656.461; 5.654.144;
 5.652.102; 5.650.268; 5.643.765; 5.639.871; 5.639.611;
 5.639.606; 5.631.128; 5.629.178; 5.627.054; 5.618.703;
 5 5.618.702; 5.614.388; 5.610.017; 5.602.756; 5.599.674;
 5.589.333; 5.585.238; 5.576.197; 5.565.340; 5.565.339;
 5.556.774; 5.556.773; 5.538.871; 5.527.898; 5.527.510;
 5.514.568; 5.512.463; 5.512.462; 5.501.947; 5.494.795;
 5.491.225; 5.487.993; 5.487.985; 5.484.699; 5.476.774;
 10 5.475.610; 5.447.839; 5.437.975; 5.436.144; 5.426.026;
 5.420.009; 5.411.876; 5.393.657; 5.389.512; 5.364.790;
 5.364.758; 5.340.728; 5.283.171; 5.279.952; 5.254.469;
 5.241.363; 5.232.829; 5.231.015; 5.229.297; 5.224.778;
 5.219.727; 5.213.961; 5.198.337; 5.187.060; 5.142.033;
 15 5.091.310; 5.082.780; 5.066.584; 5.023.171 e 5.008.182
 também podem ser empregados na prática da presente
 invenção. PCR envolve o uso de uma ADN polimerase
 termoestável, seqüências conhecidas como iniciadores e
 ciclos de aquecimento, que separam fitas de ácido
 20 deoxirribonucléico (ADN) replicantes e amplificam de
 maneira exponencial um gene de interesse. Qualquer tipo de
 PCR, tais como PCR quantitativa, RT-PCR, PCR de partida
 quente, LAPCR, PCR multiplex, *touchdown* PCR, etc, pode ser
 usada. De maneira vantajosa, usa-se PCR de tempo real. Em

geral, o processo de amplificação envolve uma reação em cadeia enzimática cíclica para a preparação de quantidades exponenciais de uma sequência de ácidos nucleicos específica. Ela exige uma pequena quantidade de uma
5 sequência para iniciar a reação em cadeia e iniciadores de oligonucleotídeo que se hibridizarão com a sequência. Em PCR, os iniciadores são anelados ao ácido nucleico desnaturado seguido por extensão com um agente de indução (enzima) e nucleotídeos. Isso resulta em produtos de
10 extensão recém-sintetizados. Uma vez que essas sequências recém sintetizadas se tornem moldes para os iniciadores, ciclos repetidos de desnaturação, anelamento de iniciadores e extensão resultam em acumulação exponencial da sequência específica sendo amplificada. O produto de extensão da
15 reação em cadeia será um duplex de ácidos nucleicos discreto com terminais correspondendo às extremidades dos iniciadores específicos empregados.

Pelos termos "amplificar de maneira enzimática" ou "amplificar" entende-se, para as finalidades do relatório
20 descritivo e das reivindicações, amplificação de ADN, isto é, um processo pelo qual sequências de ácidos nucleicos são amplificadas em número. Existem inúmeros meios para se amplificar de maneira enzimática sequências de ácidos nucleicos. Atualmente, o método mais comumente usado é a

reação em cadeia com polimerase (PCR). Outros métodos de amplificação incluem LCR (reação em cadeia com ligase), que utiliza ADN ligase, e uma sonda consistindo em duas metades de um segmento de ADN que seja complementar à sequência do
5 ADN a ser amplificado, enzima Q β replicase e um molde de sequência de ácido ribonucléico (ARN) ligado a uma sonda complementar ao ADN a ser copiado, que é usado para fazer um molde de ADN para a produção exponencial de ARN complementar; amplificação por deslocamento de fita (SDA);
10 amplificação com Q β replicase (Q β RA); replicação auto-sustentada (3SR); e NASBA (amplificação baseada em sequência de ácidos nucleicos), que pode ser realizada em ARN ou ADN como a sequência de ácidos nucleicos a ser amplificada.

15 Um "fragmento" de uma molécula, tal como uma proteína ou ácido nucleico, entende-se que se refere a qualquer porção da sequência de aminoácidos ou genética de nucleotídeos.

Conforme usado aqui, o termo "genoma" se refere a todo
20 o material genético nos cromossomas de um organismo particular. Seu tamanho é, em geral, dado como seu número total de pares de bases. Dentro do genoma, o termo "gene" se refere a uma sequência ordenada de nucleotídeos localizada em uma posição particular em um cromossoma

particular, que codifica um produto funcional específico (por exemplo, uma proteína ou molécula de ARN). Em geral, as características genéticas de um animal, conforme definidas pela sequência de nucleotídeos de seu genoma, são conhecidas como seu "genótipo", enquanto que as características físicas do animal são descritas como seu "fenótipo".

Por "heterozigoto" ou "polimorfismo heterozigoto" entende-se que dois alelos de uma célula ou organismo diplóide em um dado *locus* são diferentes, isto é, que eles têm um nucleotídeo diferente trocado pelo mesmo nucleotídeo no mesmo lugar em suas sequências.

Por "homozigoto" ou "polimorfismo homozigoto" entende-se que dois alelos de uma célula ou organismo diplóide em um dado *locus* são idênticos, isto é, que eles têm o mesmo nucleotídeo por troca de nucleotídeo no mesmo lugar em suas sequências.

Por "hibridização" ou "que se hibridiza", conforme usado aqui, entende-se a formação de pares de bases A-T e C-G entre a sequência de nucleotídeos de um fragmento de um segmento de um polinucleotídeo e uma sequência de nucleotídeos complementar de um oligonucleotídeo. Por complementar entende-se que, no *locus* de cada A, C, G ou T (ou U em um ribonucleotídeo) na sequência de fragmento, o

oligonucleotídeo seqüenciado tem um T, G, C ou A, respectivamente. O fragmento / oligonucleotídeo hibridizado é chamado de um "duplex".

Um "complexo de hibridização", tal como em um ensaio de sanduíche, significa um complexo de moléculas de ácidos nucleicos incluindo pelo menos um ácido nucleico alvo e uma sonda de sensor. Ele também pode incluir uma sonda de âncora.

Conforme usado aqui, o termo "*locus*" ou "*loci*" se refere ao sítio de um gene em um cromossoma. Pares de genes, conhecidos como "alelos", controlam a característica hereditária produzida por um *locus* de gene. Refere-se à combinação de alelos particular de cada animal como o seu "genótipo". Quando ambos os alelos forem idênticos, diz-se que o indivíduo é homozigoto para a característica controlada por aquele par de genes; quando os alelos forem diferentes, diz-se que o indivíduo é heterozigoto para a característica.

Uma "temperatura de fusão" é entendida como a temperatura na qual duplexes hibridizados se desibridizam e retornam a seu estado de fita única. Igualmente, a hibridização não ocorrerá no primeiro lugar entre dois oligonucleotídeos, ou, aqui, um oligonucleotídeo e um fragmento, em temperaturas acima da temperatura de fusão do

duplex resultante. Atualmente, é vantajoso que a diferença de temperaturas de ponto de fusão de duplexes oligonucleotídeo - fragmento desta invenção seja de cerca de 1°C a cerca de 10°C, de modo a ser prontamente
5 detectável.

Conforme usado aqui, o termo "molécula de ácido nucléico" pretende incluir moléculas de ADN (por exemplo, cADN ou ADN genômico), moléculas de ARN (por exemplo, mARN), análogos do ADN ou ARN gerado usando análogos de
10 nucleotídeos, e seus derivados, fragmentos e homólogos. A molécula de ácido nucléico pode ser de fita única ou de fita dupla, mas, de maneira vantajosa, é ADN de fita dupla. "ADN" se refere à forma polimérica de deoxirribonucleotídeos (adenina, guanina, timina ou
15 citosina) ou em sua forma de fita única ou uma hélice de dupla fita. Esse termo se refere somente às estruturas primária e secundária da molécula, e não a limita a quaisquer formas terciárias em particular. Portanto, esse termo inclui ADN de fita dupla encontrado, entre outras, em
20 moléculas de ADN lineares (por exemplo, fragmentos de restrição), vírus, plasmídeos e cromossomas. Na discussão da estrutura de moléculas de ADN de fita dupla particulares, seqüências podem ser descritas aqui de acordo com a convenção normal de se dar somente a seqüência na

direção 5' para 3' ao longo da fita não transcrita de ADN (isto é, a fita tendo uma seqüência homóloga ao mARN). Uma molécula de ácido nucléico "isolada" é uma que esteja separada de outras moléculas de ácido nucléico que estejam presentes na fonte natural do ácido nucléico.

Um "nucleosídeo" se refere a uma base ligada a um açúcar. A base pode ser adenina (A), guanina (G) (ou sua substituta, inosina (I)), citosina (C) ou timina (T) (ou sua substituta, uracila (U)). O açúcar pode ser ribose (o açúcar de um nucleotídeo natural em ARN) ou 2-deoxirribose (o açúcar de um nucleotídeo natural em ADN). Um "nucleotídeo" se refere a um nucleosídeo ligado a um único grupo fosfato.

Conforme usado aqui, o termo "oligonucleotídeo" se refere a uma série de resíduos de nucleotídeos ligados, oligonucleotídeo este tem um número suficiente de bases de nucleotídeos a serem usadas em uma reação de PCR. Uma seqüência de oligonucleotídeo curta pode se basear em, ou ser projetada a partir de, uma seqüência genômica ou de cADN, e é usada para amplificar, confirmar ou revelar a presença de um ADN ou ARN idêntico, similar ou complementar, em uma célula ou tecido em particular. Oligonucleotídeos podem ser sintetizados quimicamente e podem ser usados como iniciadores ou sondas.

Oligonucleotídeo significa qualquer nucleotídeo de mais do que 3 bases de comprimento, usado para facilitar a detecção ou a identificação de um ácido nucléico alvo, incluindo sondas e iniciadores.

5 Uma "polimerase" é uma enzima que catalisa a adição sequencial de unidades monoméricas a uma cadeia polimérica, ou que liga duas ou mais unidades monoméricas para iniciar uma cadeia polimérica. A "polimerase" trabalhará por adição de unidades monoméricas, cuja identidade é determinada por
10 e que é complementar a uma molécula de molde de uma sequência específica. Por exemplo, ADN polimerases, tais como ADN pol 1 e Taq polimerase adicionam deoxirribonucleotídeos à extremidade 3' de uma cadeia de polinucleotídeo de uma maneira dependente de molde, por
15 meio do quê se sintetiza um ácido nucléico que é complementar à molécula de molde. As polimerases podem ser adicionadas ou para estender um iniciador, uma vez ou repetidamente, ou para amplificar um polinucleotídeo por iniciação repetitiva de duas fitas complementares usando
20 dois iniciadores. Uma "polimerase termoestável" se refere a uma enzima ADN ou ARN polimerase que possa resistir a temperaturas extremamente elevadas, tais como aquelas de aproximadamente 100°C. Frequentemente, polimerases termoestáveis são derivadas a partir de organismos que

vivem em temperaturas extremas, tais como *Thermus aquaticus*. Exemplos de polimerases termoestáveis incluem Taq, Tth, Pfu, Vent, deep Vent, ULTma e suas variações e seus derivados.

5 Um "polinucleotídeo" se refere a uma cadeia linear de nucleotídeos conectada por uma ligação de fosfodiéster entre o grupos 3'-hidroxila de um nucleosídeo e o grupo 5'-hidroxila de um segundo nucleosídeo, que, por sua vez, está ligado através de seu grupo 3'-hidroxila ao grupo 5'-
10 hidroxila de um terceiro nucleotídeo e assim por diante, para formar um polímero compreendendo nucleosídeos ligados por uma cadeia principal de fosfodiéster. Um "polinucleotídeo modificado" se refere a um polinucleotídeo, no qual um ou mais nucleotídeos naturais
15 tenham sido parcialmente, substancialmente ou completamente substituídos por nucleotídeos modificados.

Um "iniciador" é um oligonucleotídeo, a sequência de pelo menos uma porção do qual é complementar a um segmento de um ADN de molde, que deve ser amplificado ou replicado.
20 Tipicamente, iniciadores são usados na realização da reação em cadeia com polimerase (PCR). Um iniciador se hibridiza com (ou "se anela" a) o ADN de molde e é usado pela enzima de polimerase como o ponto de partida para o processo de replicação / amplificação. Os iniciadores aqui são

selecionados para serem "substancialmente" complementares a diferentes fitas de uma seqüência de ADN alvo particular. Isso significa que os iniciadores têm que ser suficientemente complementares para se hibridizarem com suas respectivas fitas. Portanto, a seqüência de iniciador não necessita refletir a seqüência exata do molde. Por exemplo, um fragmento de nucleotídeo não complementar pode estar ligado à extremidade 5' do iniciador, com o restante da seqüência de iniciador sendo complementar à fita. Alternativamente, bases ou seqüências mais longas não complementares podem estar interespaçadas no iniciador, contanto que a seqüência de iniciador tenha complementariedade suficiente com a seqüência da fita a se hibridizar com ele e, por meio disso, formar o molde para a síntese do produto de extensão.

"Sondas" se referem a oligonucleotídeos, seqüências de ácidos nucléicos de comprimento variável, usadas na detecção de seqüências de ácidos nucléicos idênticas, similares ou complementares por hibridização. Uma seqüência de oligonucleotídeo usada como uma sonda de detecção pode estar rotulada com uma porção detectável.

Os seguintes são exemplos não limitantes de polinucleotídeos: um gene ou fragmento de gene, éxons, íntrons, mARN, tARN, rARN, ribozimas, cADN,

polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, plasmídeos, vetores, ADN isolado de qualquer seqüência, ARN isolado de qualquer seqüência, sondas de ácidos nucléicos e iniciadores. Um polinucleotídeo pode
5 compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e análogos de nucleotídeos, uracila, outros açúcares e grupos de ligação, tais como fluoro-ribose e tiolato, e ramificações de nucleotídeos. A seqüência de nucleotídeos pode estar adicionalmente
10 modificada depois da polimerização, tal como por conjugação, com um componente de rotulação. Outros tipos de modificações incluídas nessa definição são capeamentos, substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, e a introdução de meios para a
15 fixação do polinucleotídeo às proteínas, íons de metais, componentes de rotulação, outros polinucleotídeos ou suporte sólido.

Um polinucleotídeo ou polipeptídeo "isolado" é aquele que seja substancialmente puro dos materiais com os quais
20 ele esteja associado em seu ambiente nativo. Por substancialmente livre, entende-se pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, vantajosamente pelo menos 70%, pelo menos 75%, mais vantajosamente pelo menos 80%, pelo menos 85%, ainda mais vantajosamente pelo

menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%,
pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos
97%, muitíssimo vantajosamente pelo menos 98%, pelo menos
99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9% livre destes

5 materiais.

Uma molécula de ácido nucléico "isolada" é uma
molécula de ácido nucléico separada e discreta a partir do
organismo como um todo, com o qual a molécula seja
encontrada na natureza; ou uma molécula de ácido nucléico
10 desprovida, no todo ou em parte, de seqüências normalmente
associadas com ela na natureza; ou uma seqüência, como ela
exista na natureza, mas, tendo seqüências heterólogas
(conforme definidas abaixo) em associação com ela.

o termo "polinucleotídeo que codifica uma proteína",
15 conforme usado aqui, se refere a um fragmento de ADN ou
molécula de ADN isolada que codifique uma proteína, ou a
fita a eles complementar; mas, ARN não está excluído, já
que se entende na técnica que timidina (T) em uma seqüência
de ADN é considerada igual à uracila (U) em uma seqüência
20 de ARN. Portanto, seqüências de ARN para uso na invenção,
por exemplo, para uso em vetores de ARN, podem ser
derivadas de seqüências de ADN, por timidina (T) na
seqüência sendo considerada igual à uracila (U) em
seqüências de ARN.

Uma "seqüência que codifica" ADN ou uma "seqüência de nucleotídeos que codifica" uma proteína particular é uma seqüência de ADN que seja transcrita e traduzida em um polipeptídeo *in vitro* ou *in vivo* quando colocada sob o controle de elementos reguladores apropriados. As fronteiras da seqüência codificante são determinadas por um códon de partida no terminal 5' (amino) e um códon de parada de tradução no terminal 3' (carbóxi). Uma seqüência codificante pode incluir, mas, não está limitada a, seqüências procarióticas, cADN a partir de mARN eucariótico, seqüências de ADN genômico a partir de ADN eucariótico (por exemplo, mamífero), e mesmo seqüências de ADN sintéticas. Uma seqüência de terminação de transcrição usualmente estará localizada 3' em relação à seqüência codificante.

"Homologia" se refere à identidade percentual entre duas porções de polinucleotídeo ou duas porções de polipeptídeo. Dois ADN, ou duas seqüências de polipeptídeo, são "substancialmente homólogas" uma em relação à outra quando as seqüências exibirem pelo menos cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, de preferência, pelo menos cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94% e muitíssimo de preferência pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% de identidade de seqüências sobre um

comprimento definido das moléculas. Conforme usado aqui, substancialmente homólogas também se refere às seqüências mostrando identidade completa (100% de identidade de seqüências) em relação ao ADN ou seqüência de polipeptídeo especificados.

A homologia pode ser determinada por hibridização de polinucleotídeos sob condições que formem duplexes estáveis entre regiões homólogas, seguida por digestão com nuclease(s) específica(a) em relação à fita única, e determinação de tamanho dos fragmentos digeridos. Seqüências de ADN, que sejam substancialmente homólogas, podem ser identificadas em um experimento de hibridização *Southern* sob, por exemplo, condições severas, conforme definidas para aquele sistema em particular. A definição de condições de hibridização apropriadas está dentro da habilidade do técnico especializado no assunto. Ver, por exemplo, Sambrook et al. supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

Dois fragmentos de ácidos nucléicos são considerados como sendo "seletivamente hibridizáveis" com um polinucleotídeo se eles forem capazes de se hibridizar de maneira específica com um ácido nucléico ou uma variante dele ou de iniciarem, de maneira específica, uma reação em cadeia com polimerase: (i) sob condições de hibridização e

de lavagem típicas, conforme descrito, por exemplo, em Sambrook et al., supra, e Nucleic Acid Hybridization, supra, (ii) uso de condições de lavagem de reduzida severidade, que permitam no máximo cerca de 25 - 30% de incompatibilidades de pares de bases, por exemplo: 2 x SSC, 0,1% SDS, temperatura ambiente duas vezes, 30 minutos cada; então, 2 x SSC, 0,1% SDS, 37°C uma vez, 30 minutos; então, 2 x SSC temperatura ambiente duas vezes, 10 minutos cada, ou (iii) seleção de iniciadores para uso em reações em cadeia com polimerase (PCR) típicas sob condições padrão (descritas, por exemplo, em Saiki et al. (1988) Science 239:487-491).

O termo "capaz de se hibridizar sob condições severas", conforme usado aqui, se refere ao anelamento de um primeiro ácido nucléico com um segundo ácido nucléico sob condições severas, conforme definidas abaixo. Condições de hibridização severas tipicamente permitem a hibridização de moléculas de ácidos nucléicos tendo pelo menos 70% de identidade de seqüências de ácidos nucléicos com a molécula de ácidos nucléicos sendo usadas como uma sonda na reação de hibridização. Por exemplo, o primeiro ácido nucléico pode ser uma amostra ou sonda de teste, e o segundo ácido nucléico pode ser a fita com sentido ou sem sentido de um ácido nucléico ou um fragmento dele. A hibridização do

primeiro e do segundo ácidos nucléicos pode ser conduzida sob condições severas, por exemplo, elevada temperatura e/ou baixo teor de sal, que tendem a desfavorecer a hibridização de seqüências de nucleotídeos dissimilares.

5 Alternativamente, a hibridização do primeiro e do segundo ácidos nucléicos pode ser conduzida sob condições de severidade reduzida, por exemplo, baixa temperatura e/ou elevado teor de sal, que tendem a favorecer a hibridização de seqüências de nucleotídeos dissimilares. Condições de
10 hibridização de baixa severidade podem ser seguidas por condições de elevada severidade ou por condições de média severidade intermediária para aumentar a seletividade da ligação do primeiro e do segundo ácidos nucléicos. As condições de hibridização podem incluir adicionalmente
15 reagentes, tais como, mas, não limitados a, sulfóxido de dimetila (DMSO) ou formamida, para desfavorecer ainda adicionalmente a hibridização de seqüências de nucleotídeos dissimilares. Um protocolo de hibridização adequado pode envolver, por exemplo, a hibridização em 6 x SSC (em que 1
20 x SSC compreende citrato de sódio 0,015 M e cloreto de sódio 0,15 M), à 65°C em uma solução aquosa, seguida por lavagem com 1 x SSC à 65°C. Fórmulas para calcular condições apropriadas de hibridização e de lavagem, para se conseguir hibridização permitindo 30% ou menos de

incompatibilidade entre duas moléculas de ácidos nucléicos, são reveladas, por exemplo, em Meinkoth et al. (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284; o teor do qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade. Protocolos para técnicas

5 de hibridização são bem conhecidos pelos técnicos especializados no assunto e manuais padrão de biologia molecular podem ser consultados para selecionar um protocolo de hibridização adequado sem experimentação excessiva. Vem, por exemplo, Sambrook et al. (2001)

10 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, terceira edição, Cold Spring Harbor Press, o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Tipicamente, condições severas serão aquelas nas quais a concentração de sal é menor do que cerca de íon sódio 1,5

15 M, tipicamente concentração de íons Na (ou de outros sais) de cerca de 0,01 a 1,0 M, a partir de cerca de pH 7,0 a cerca de pH 8,3 e a temperatura de pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e de pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo,

20 maiores do que 50 nucleotídeos). Condições severas também podem ser conseguidas com a adição de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Exemplos de condições de baixa severidade incluem a hibridização com uma solução de tampão de 30 a 35% de formamida, NaCl 1 M,

SDS (dodecil-sulfato de sódio) à 1%, à 37°C, e uma lavagem em 1 - 2 x SSC à 50 a 55°C. Exemplos de condições de severidade moderada incluem hibridização em formamida à 40 a 45%, NaCl 1 M, SDS à 1% à 37°C, e uma lavagem em 0,5 - 1
5 SSC à 55 a 60°C. Exemplos de condições de elevada severidade incluem hibridização em formamida à 50%, NaCl 1 M, SDS à 1% à 37°C, e uma lavagem em 0,1 SSC à 60 a 65°C.

Materiais e métodos da invenção podem ser usados mais genericamente para avaliar uma amostra de ADN a partir de
10 um animal, tipificar geneticamente um animal individual e detectar diferenças genéticas em animais. Em particular, uma amostra de ADN genômico a partir de um animal pode ser avaliada por referência a um ou mais controles, para determinar se um SNP, ou grupo de SNPs, está(ão)
15 presente(s) em um gene. Qualquer método para a determinação de genótipo pode ser usado para determinação do genótipo na presente invenção. Tais métodos incluem, mas, não estão limitados a, seqüenciamento com amplímero, seqüenciamento de ADN, espectroscopia de fluorescência, análise de
20 hibridização baseada em transferência de energia por ressonância de fluorescência (ou "FRET"), seleção de elevada capacidade, espectroscopia de massa, análise com micro-satélites, hibridização de ácidos nucleicos, reação em cadeia com polimerase (PCR), análise por RFLP e

cromatografia por tamanhos (por exemplo, cromatografia por capilaridade ou em gel), todos os quais são bem conhecidos por um técnico especializado no assunto. Em particular, métodos para a determinação de polimorfismos de

5 nucleotídeos, particularmente polimorfismos de um único nucleotídeo, são descritos nas patentes norte-americanas de números 6.514.700; 6.503.710; 6.468.742; 6.448.407; 6.410.231; 6.383.756; 6.358.679; 6.322.980; 6.316.230 e 6.287.766 e revistos por Chen e Sullivan, *Pharmacogenomics*

10 J 2003;3(2):77-96, as revelações das quais são incorporadas por referência em suas totalidades. Dados genotípicos úteis nos métodos da invenção e métodos para a identificação e seleção de características animais são baseados na presença de SNPs.

15 Um "fragmento de restrição" se refere a um fragmento de um polinucleotídeo gerado por uma endonuclease de restrição (uma enzima que cliva ligações fosfodiéster dentro de uma cadeia de polinucleotídeo), que clive ADN em resposta a um sítio de reconhecimento no ADN. O sítio de

20 reconhecimento (sítio de restrição) consiste em uma sequência específica de nucleotídeos tipicamente de cerca de 4 - 8 nucleotídeos de comprimento.

Um "polimorfismo de um único nucleotídeo" ou "SNP" se refere a uma variação na sequência de nucleotídeos de um

polinucleotídeo, que difira de outro polinucleotídeo por diferença de um único nucleotídeo. Por exemplo, sem limitação, trocando-se um A por um C, G ou T na sequência inteira de polinucleotídeo constitui um SNP. É possível se ter mais do que um SNP em um polinucleotídeo particular. Por exemplo, em uma posição em um polinucleotídeo, um C pode ser trocado por um T, em outra posição, um G pode ser trocado por um A e assim por diante. Ao se referir a SNPs, o polinucleotídeo é muitíssimo freqüentemente ADN.

10 Conforme usado aqui, um "molde" se refere a uma fita de polinucleotídeo alvo, por exemplo, sem limitação, uma fita de ADN que ocorre naturalmente não modificada, que uma polimerase usa como um meio de reconhecimento de qual nucleotídeo ela deve incorporar a seguir a uma fita em
15 crescimento para polimerizar o complemento da fita que ocorre naturalmente. Uma tal fita de ADN pode ser de fita única ou pode ser parte de um molde de ADN de fita dupla. Em aplicações da presente invenção exigindo ciclos de polimerização repetidos, por exemplo, a reação em cadeia
20 com polimerase (PCR), a própria fita de molde pode ser tornar modificada por incorporação de nucleotídeos modificados, contudo, ainda serve como um molde para uma polimerase sintetizar polinucleotídeos adicionais.

Uma "reação termocíclica" é uma reação de múltiplas

etapas, na qual pelo menos duas etapas são realizadas por mudança da temperatura de reação.

Uma "variância" é uma diferença na seqüência de nucleotídeos dentre polinucleotídeos relacionados. A
5 diferença pode ser a eliminação de um ou mais nucleotídeos da seqüência de um polinucleotídeo, comparada à seqüência de um polinucleotídeo relacionado, a adição de um ou mais nucleotídeos ou a substituição de um nucleotídeo por outro. Os termos "mutação", "polimorfismo" e "variância" são
10 usados intercambiavelmente aqui. Conforme usado aqui, o termo "variância", no singular, deve ser construído a incluir múltiplas variâncias; isto é, duas ou mais adições, eliminações e/ou substituições de nucleotídeos no mesmo polinucleotídeo. Um "ponto de mutação" se refere a uma
15 única substituição de um nucleotídeo por outro.

Conforme usados aqui, os termos "características", "características de qualidade" ou "fenótipos" se referem a propriedades vantajosas do animal resultando da genética. Características de qualidade incluem, mas, não estão
20 limitadas a, capacidade genética do animal, de maneira eficiente, de metabolizar energia, produzir carne ou leite, estabelecer gordura intramuscular. Características físicas incluem, mas, não estão limitadas a, carnes marmorizadas, macias ou magras. Os termos podem ser usados

intercambiavelmente.

Um "sistema de computador" se refere aos meios de *hardware*, meios de *software* e meios de armazenamento de dados usados para compilar os dados da presente invenção.

- 5 Os meios de *hardware* mínimos de sistemas baseados em computador da invenção podem compreender uma unidade central de processamento (CPU), meios de entrada, meios de saída e meios de armazenamento de dados. Desejavelmente, um monitor é fornecido para visualizar a estrutura de dados.
- 10 Os meios de armazenamento de dados podem ser RAM ou outros meios para acessar mídias de leitura por computador da invenção. Exemplos de tais sistemas são estações de trabalho de microcomputadores disponíveis a partir de Silicon Graphics Incorporated e Sun Microsystems rodando
- 15 sistemas operacionais baseados em Unix, Linux, Windows NT, XP ou IBM OS/2.

- "Mídias legíveis por computador" se referem a quaisquer mídias, que possam ser lidas e acessadas diretamente por um computador, e incluem, mas, não estão
- 20 limitadas a: mídias de armazenamento magnético, tais como discos flexíveis, mídia de armazenamento rígido e fita magnética; mídias de armazenamento óptico, tais como discos ópticos ou CD-ROM; mídias de armazenamento elétrico, tais como RAM e ROM; e híbridos destas categorias, tais como

mídias magnéticas / ópticas. Pelo fornecimento de tais mídias legíveis por computador, os dados compilados em um animal particular podem ser acessados de maneira rotineira por um usuário, por exemplo, um operador de campo de engorda.

O termo "módulo de análise de dados" é definido aqui para incluir qualquer pessoa ou máquina, individualmente ou trabalhando em conjunto, que analise a amostra e determine as informações genéticas nela contidas. O termo pode incluir uma pessoa ou máquina dentro de um conjunto de laboratório.

Conforme usado aqui, o termo "módulo de coleta de dados" se refere a qualquer pessoa, objeto ou sistema que obtenha uma amostra de tecido a partir de um animal ou embrião. Por exemplo, e sem limitação, o termo pode definir, individualmente ou coletivamente, a pessoa ou máquina em contato físico com o animal quando a amostra for tomada, os recipientes mantendo as amostras de tecido, a embalagem usada para transporte das amostras e os similares. De maneira vantajosa, o coletor de dados é um fazendeiro de criação animal, um criador ou um veterinário.

O termo "interface de rede" é definido aqui para incluir qualquer pessoa ou sistema de computador capaz de acessar dados, depositar dados, combinar dados, analisar

dados, pesquisar dados, transmitir dados ou armazenar dados. O termo é definido de maneira ampla a ser uma pessoa analisando os dados, os sistemas de *hardware* e de *software* eletrônicos usados na análise, os bancos de dados armazenando a análise de dados, e quaisquer mídias de armazenamento capazes de armazenar os dados. Exemplos não limitantes de interfaces de rede incluem pessoas, equipamento de laboratório automatizado, computadores e redes de computadores, dispositivos de armazenamento de dados, tais como, mas, não limitados a, discos, *hard drives* ou *chips* de memória.

O termo "histórico de criação", conforme usado aqui, se refere a um registro da vida de um animal ou grupo de animais, incluindo, mas, não limitado a, a localização, criação, período de abrigo, assim como história genética dos animais, incluindo parentesco e descendência a partir dele(s), genótipo, fenótipo, história transgênica, se relevante, e os similares.

O termo "condições pecuárias", conforme usado aqui, se refere a parâmetros que se relacionem à manutenção de animais, incluindo, mas, não limitados a, temperatura de curral e de abrigo, mortalidade semanal de um rebanho, consumo de água, consumo de ração animal, taxa e qualidade de ventilação, condição de detritos e os similares.

O termo "histórico veterinário", conforme usado aqui, se refere aos dados de vacinação de um animal ou grupo de animais, incluindo, mas, não limitado a, tipo(s) de vacina, número(s) de série de lote de vacina, dose administrada, antígeno alvo, método de administração da vacina ao(s) animal(is) receptores, número de animais vacinados, idade dos animais e o vacinador. Dados relacionados à resposta sorológica ou imunológica induzida pela vacina também podem ser incluídos. "Histórico veterinário" conforme usado aqui, também pretende incluir os históricos de medicação do(s) animal(is) alvo, incluindo, mas, não limitado a, droga e/ou antibióticos administrados aos animais, incluindo o tipo de medicação administrada, quantidade e taxas de dose, por quem e quando administrados, por qual rota, por exemplo, oral, subcutaneamente e as similares, e a resposta à medicação, incluindo seus efeitos desejados e indesejáveis.

O termo "dados diagnósticos", conforme usado aqui, se refere a dados relacionados à saúde do(s) animal(is) diferentes daqueles que detalhem os históricos de vacinação ou de medicação do(s) animal(is). Por exemplo, os dados diagnósticos podem ser um registro das infecções sofridas pelo(s) animal(is) e a resposta dele(s) às medicações fornecidas para tratar tais infecções. Dados sorológicos, incluindo composição em anticorpos ou proteínas do soro ou

de outros biofluidos também podem ser dados diagnósticos úteis para serem alimentados nos métodos da invenção. Dados cirúrgicos em relação ao(s) animal(is) podem ser incluídos, tais como o tipo de manipulação cirúrgica, resultado da
5 cirurgia e complicações surgindo a partir do procedimento cirúrgico. "Dados diagnósticos" também podem incluir medições de parâmetros tais como peso, morbidez e outras características observadas por um serviço veterinário, tais como a condição da pele, patas, etc.

10 O termo "dados de bem estar", conforme usado aqui, se refere ao acúmulo de dados coletivos pertinentes a um animal ou grupo de animais, incluindo, mas, não limitado a, um histórico de criação, um histórico veterinário, um perfil de bem estar, dados diagnósticos, dados de controle
15 de qualidade ou qualquer combinações destes.

O termo "perfil de bem estar", conforme usado aqui, se refere a parâmetros, tais como peso, densidade de carne, níveis de aglomeração nos confinamentos de reprodução ou de criação, comportamento psicológico do animal, taxa de
20 crescimento e qualidade e os similares.

O termo "controle de qualidade", conforme usado aqui, se refere às características desejadas do(s) animal(is). Para animais não avícolas domésticos, tais como gado bovino e ovelhas, por exemplo, tais parâmetros incluem quantidade

e densidade musculares, teor em gordura, maciez da carne, rendimento em e qualidade do leite, capacidade de criação, e os similares.

O termo "parâmetros de desempenho", conforme usado aqui, se refere a fatores tais como rendimento em carne, rendimento em criação, forma de laticínios, qualidade da e rendimento em carne, vida produtiva e os similares, que possam ser os objetivos desejados a partir da reprodução e da criação do(s) animal(is). Parâmetros de desempenho podem ser ou gerados a partir dos próprios animais, ou aqueles parâmetros desejados por um cliente ou o mercado.

O termo "dados nutricionais", conforme usado aqui, se refere à composição, quantidade e frequência de entrega de ração animal, incluindo água, fornecida ao(s) animal(is).

O termo "segurança alimentar", conforme usado aqui, se refere à qualidade da carne a partir de um animal de criação animal, incluindo, mas, limitado a, tempo, local e modo de preparação, armazenamento do produto alimentício, rota de transporte, registros de inspeção, textura, cor, sabor, odor, teor bacteriano, teor parasítico e os similares.

Será evidente para o técnico especializado no assunto que os dados relativos à saúde e à manutenção dos animais podem ser agrupados de maneira variável, dependendo da

fonte ou da intenção do coletor de dados e qualquer grupamento aqui, portanto, não pretende ser limitante.

A menos se definido de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados como comumente entendidos por um técnico especializado no assunto da biologia molecular. Embora materiais e métodos similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou análise da presente invenção, materiais e métodos adequados são descritos aqui.

Em uma concretização, na qual o gene de interesse for TFAM bovino, a sequência de nucleotídeos de TFAM bovino pode ser selecionada a partir de, mas, não está limitada a, às sequências correspondendo aos Números de Acesso no GenBank AAFC0211069 ou AAFC02019444 (SEQ ID NO: 3) ou um fragmento deles ou uma região do genoma bovino que compreenda essas sequências.

A presente invenção, portanto, fornece ácidos nucléicos isolados que possam se hibridizar de maneira específica à sequência de nucleotídeos correspondendo aos Números de Acesso ao GenBank AAFC0211069 ou AAFC02019444 (SEQ ID NO: 3), ou o seu complemento, e que compreende o sítio polimórfico correspondendo às posições de nucleotídeo -1220, -1212 ou -995.

O(s) polimorfismo(s) de nucleotídeo único de interesse pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, um substituição de T por C na
5 posição -1212 no promotor do gene TFAM e uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

O SNP vantajoso na presente invenção está associado com certas características economicamente valiosas e hereditárias, relacionadas à qualidade da carne em bovinos.
10 Portanto, é um objeto da presente invenção determinar o genótipo de um dado animal de interesse, conforme definido pelo SNP de locus de TFAM de acordo com a presente invenção. É também contemplado que o genótipo do(s) animal(is) possa ser definido por SNPs adicionais dentro do
15 gene TFAM ou dentro de outros genes identificados com características desejáveis ou outras características, e, em particular, por um painel ou painéis de SNPs.

Há muitos métodos conhecidos na técnica para a determinação da sequência de ADN em uma amostra, e para a
20 identificação de se uma dada amostra de ADN contém um SNP em particular. Qualquer tal técnica conhecida na técnica pode ser usada na realização dos métodos da presente invenção.

Os métodos da presente invenção permitem que animais

com certas características hereditárias economicamente valiosas sejam identificados, com base na presença de SNPs em seus genomas e, particularmente, com um SNP localizado dentro do promotor do gene TFAM. Os métodos permitem
5 adicionalmente, por métodos auxiliados por computador da invenção, correlacionar as características associadas com SNP com outros dados pertinentes ao bem estar e à capacidade produtiva dos animais ou grupo de animais.

Para determinar o genótipo de um dado animal de acordo
10 com os métodos da presente invenção, é necessário se obter uma amostra de ADN genômico a partir do animal. Tipicamente, aquela amostra de ADN genômico será obtida a partir de uma amostra de tecido ou de células tomada a partir daquele animal. Uma amostra de tecido ou de células
15 pode ser tomada a partir de um animal em qualquer momento no decurso da vida de um animal, mas, antes que a identidade de carcaça seja perdida. A amostra de tecido pode compreender pêlos, incluindo raíz, pele, osso, esfregaços bucais, sangue, saliva, leite, sêmen, embriões,
20 músculo ou quaisquer órgãos internos. Nos métodos da presente invenção, a fonte da amostra de tecido, e, portanto, também, a fonte da amostra de ácido nucléico de teste, não é crítica. Por exemplo, o ácido nucléico de teste pode ser obtido a partir de células dentro de um

fluido corporal do animal, ou a partir de células constituindo um tecido corporal do animal. O fluido corporal em particular, a partir do qual as células são obtidas, também não é crítico para a presente invenção. Por exemplo, o fluido corporal pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em sangue, ascitos, fluido pleural e fluido espinhal. Além disso, o tecido corporal particular, a partir do qual as células são obtidas, também não é crítico para a presente invenção. Por exemplo, o tecido corporal pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em tecido de pele, de endométrio, uterino e cervical. Tecidos tanto normais quanto tumorais podem ser usados.

Tipicamente, a amostra de tecido é marcada com um número de identificação ou com outros indícios que relacionem a amostra com o animal individual a partir do qual a amostra foi tomada. A identidade da amostra, de maneira vantajosa, permanece constante ao longo de todos os métodos e sistemas da invenção, por meio do que se garante a integridade e a continuidade da amostra durante a extração e a análise. Alternativamente, os indícios podem ser modificados de uma maneira regular, que assegure que os dados, e quaisquer outros dados associados, possam ser relacionados de volta ao animal a partir do qual os dados foram obtidos.

A quantidade / tamanho de amostra necessária é conhecida/o pelo técnico especializado no assunto e, por exemplo, podem ser determinados pelas etapas subseqüentes usadas no método e no sistema da invenção e nos métodos de análise específicos usados. Idealmente, o tamanho / volume da amostra de tecido recuperada deve ser tão consistente quanto possível, dentro do tipo de amostra e da espécie de animal. Por exemplo, para gado bovino, exemplos não limitantes de tamanhos de amostra / métodos incluem carne não gordurosa: 0,0002 g - 10,0 g; pele: 0,0004 g - 10,0 g; raízes de pêlos: pelo menos uma e, vantajosamente, mais do que cinco; esfregaços bucais: 15 a 20 segundos de atritamento com pressão modesta na área entre o lábio superior e a gengiva, usando, por exemplo, uma escova de citologia; osso: 0,0002 g - 10,0 g; sangue: 30 μ L a 50 mL.

Em geral, a amostra de tecido é colocada em um recipiente que seja rotulado usando um sistema de numeração portando um código correspondendo ao animal, por exemplo, à etiqueta na orelha do animal. Conseqüentemente, o genótipo de um animal em particular é facilmente rastreável em todos os momentos. O dispositivo e/ou recipiente de amostragem podem ser fornecidos ao fazendeiro, um abatedouro ou varejista. O dispositivo de amostragem, de maneira vantajosa, tira uma amostra consistente e reprodutível a

partir dos animais individuais, enquanto evite, de maneira simultânea, qualquer contaminação cruzada de tecido. Conseqüentemente, o tamanho e o volume de tecidos de amostra derivados a partir de animais individuais seriam
5 consistentes.

ADN pode ser isolado a partir de tecido / células por técnicas conhecidas pelos técnicos especializados no assunto (ver, por exemplo, as patentes norte-americanas de números 6.548.256 e 5.989.431; Hirota et al. (1989) Jinrui
10 Idengaku Zasshi. 34: 217-23 e John et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:408, as revelações dos quais são incorporadas por referência em suas totalidades). Por exemplo, ADN de elevado peso molecular pode ser purificado a partir de células ou tecido usando extração com proteinase K e
15 precipitação com etanol. ADN, entretanto, pode ser extraído a partir de um espécime animal usando-se quaisquer outros métodos adequados conhecidos na técnica.

Em uma concretização, a presença ou a ausência do SNP de qualquer dos genes da presente invenção pode ser
20 determinada por seqüenciamento da região da amostra de ADN genômico que abranja o *locus* polimórfico. Muitos métodos de seqüenciamento de ADN genômico são conhecidos na técnica, e qualquer um de tais métodos pode ser usado; ver, por exemplo, Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, terceira edição, Cold Spring Harbor Press. Por exemplo, conforme descrito abaixo, um fragmento de ADN abrangendo a localização do SNP de interesse pode ser amplificado usando-se a reação em cadeia com polimerase. A região amplificada da forma de ADN pode, então, ser seqüenciada usando-se qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, usando um seqüenciador de ácidos nucleicos automático. A detecção de um dado SNP pode, então, ser realizada usando hibridização de sondas e/ou usando métodos de amplificação baseados em PCR. Tais métodos são descritos em mais detalhes abaixo.

Os métodos da presente invenção podem usar oligonucleotídeos úteis como iniciadores para amplificar seqüências de ácidos nucleicos específicas do gene TFAM, de maneira vantajosa, da região englobando um SNP de TFAM. Tais fragmentos devem ser de comprimento suficiente para permitirem o anelamento ou hibridização específicos à amostra de ácido nucleico. Tipicamente, as seqüências serão de cerca de 8 a cerca de 44 nucleotídeos de comprimento. Seqüências mais longas, por exemplo de desde cerca de 14 a cerca de 50, podem ser vantajosas para certas concretizações. O projeto de iniciadores é bem conhecido de um técnico especializado no assunto.

Moléculas de ácidos nucleicos da invenção incluem

moléculas de ácidos nucléicos tendo pelo menos 70% de identidade ou de homologia ou de similaridade com um gene TFAM ou sondas ou iniciadores derivados dele, tal como pelo menos 75% de identidade ou de homologia ou de similaridade, 5 de preferência, pelo menos 80% de identidade ou homologia ou similaridade, mais preferivelmente, pelo menos 85% de identidade ou homologia ou similaridade, tal como pelo menos 90% de identidade ou homologia ou similaridade, mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade ou homologia 10 ou similaridade, tal como pelo menos 97% de identidade ou homologia ou similaridade. A identidade ou homologia ou similaridade da seqüência de nucleotídeos pode ser determinada usando o programa "Align" de Myers e Miller ("Optimal Alignments in Linear Space", CABIOS 4, 11-17, 15 1988) e disponível em NCBI. Alternativamente ou adicionalmente, os termos "similaridade" ou "identidade" ou "homologia", por exemplo, com respeito a uma seqüência de nucleotídeos, pretendem indicar uma medida quantitativa de homologia entre duas seqüências. A similaridade de 20 seqüências percentual pode ser calculada como $(N_{ref} - N_{dif}) * 100 / N_{ref}$, em que N_{dif} é o número total de resíduos não idênticos nas duas seqüências, quando alinhadas, e sendo que N_{ref} é o número de resíduos em uma das seqüências. Portanto, a seqüência de ADN AGTCAGTC terá uma similaridade

de seqüências de 75% com a seqüência AATCAATC ($N_{ref} = 8$; $N_{dif} = 2$). Alternativamente ou adicionalmente, "similaridade" com respeito às seqüências se refere ao número de posições com nucleotídeos idênticos dividido pelo número de
5 nucleotídeos na mais curta das duas seqüências, sendo que o alinhamento das duas seqüências pode ser determinado de acordo com o algoritmo de Wilbur e Lipman (Wilbur e Lipman, 1983 PNAS USA 80:726), por exemplo, usando um tamanho de janela de 20 nucleotídeos, um comprimento de palavra de 4
10 nucleotídeos e uma penalidade de intervalo de 4, e análise e interpretação auxiliadas por computador dos dados de seqüências, incluindo o alinhamento, podem ser realizadas de maneira conveniente usando programas disponíveis comercialmente (por exemplo, Intelligenetics™ Suite,
15 Intelligenetics Inc. CA). Quando seqüências de ARN são ditas serem similares, ou terem um grau de identidade de seqüências com seqüências de ADN, timidina (T) na seqüência de ADN é considerada igual à uracila (U) na seqüência de ARN.

20 Uma sonda ou um iniciador pode ser qualquer segmento de pelo menos 8, de preferência, de pelo menos 10, mais preferivelmente, de pelo menos 12, 13, 14 ou 15, tal como de pelo menos 20, por exemplo, de pelo menos 23 ou 25, por exemplo, de pelo menos 27 ou 30 nucleotídeos, em um gene

TFAM, que sejam únicos para um gene TFAM. Como para iniciadores ou sondas de PCR ou de hibridização e comprimentos ótimos para eles, também é feita referência a Kajimura et al., GATA 7(4):71-79 (1990).

5 Sequências de ARN dentro do escopo da invenção são derivadas a partir das seqüências de ADN, por timidina (T) na seqüência de ADN sendo considerada igual à uracila (U) nas seqüências de ARN.

10 Os oligonucleotídeos podem ser produzidos por um processo de produção convencional para oligonucleotídeos gerais. Eles podem ser produzidos, por exemplo, por um processo de síntese química ou por um processo microbiano que faça uso de um vetor de plasmídeo, um vetor de fago ou os similares. Além disso, é adequado usar um sintetizador
15 de ácidos nucléicos.

20 Para rotular um oligonucleotídeo com o corante fluorescente, um dos métodos de rotulagem convencionalmente conhecidos podem ser usados (Tyagi & Kramer (1996) Nature Biotechnology 14: 303-308; Schofield et al. (1997) Appl. and Environ. Microbiol. 63: 1143-1147; Proudnikov & Mirzabekov (1996) Nucl. Acids Res. 24: 4532-4535). Alternativamente, o oligonucleotídeo pode ser rotulado com um rótulo radioativo, por exemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , etc. Métodos de rotulação bem conhecidos são descritos, por

exemplo, em Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, terceira edição, Cold Spring Harbor Press. O rótulo é acoplado diretamente ou indiretamente a um componente do oligonucleotídeo de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Cromatografia de fase reversa ou os similares, usados para fornecer uma sonda de ácido nucléico para uso na presente invenção, pode purificar o oligonucleotídeo sintetizado rotulado com um marcador. Uma forma de sonda vantajosa é aquela rotulada com um corante fluorescente na extremidade 3' ou 5' e contendo G ou C como a base na extremidade rotulada. Se a extremidade 5' estiver rotulada e a extremidade 3' não estiver rotulada, o grupo OH no átomo de C na posição 3' da ribose ou deoxirribose da extremidade 3' pode estar modificado com um grupo fosfato ou similar, embora nenhuma limitação seja imposta a este respeito.

Durante a hibridização do alvo de ácido nucléico com as sondas, condições severas podem ser utilizadas, de maneira vantajosa em conjunto com outras condições que afetem a severidade, para auxiliar na hibridização. A detecção por rompimento diferencial é particularmente vantajosa, para reduzir ou eliminar deslize de hibridização entre sondas e alvo, e para promover hibridização mais eficaz. Em ainda outro aspecto, condições de severidade

podem ser variadas durante a determinação de estabilidade de complexo de hibridização, de modo a determinar mais acuradamente ou rapidamente se um SNP está presente na sequência alvo.

5 Um método para determinação o genótipo no *locus* de gene polimórfico engloba a obtenção de uma amostra de ácido nucléico, a hibridização da amostra de ácido nucléico com uma sonda e o rompimento da hibridização para determinar o nível de energia de rompimento necessária, sendo que a
10 sonda tem uma energia de rompimento diferente para um alelo, quando comparado ao outro alelo. Em um exemplo, pode haver uma energia de rompimento mais baixa, por exemplo, temperatura de fusão, para um alelo que abrigue um resíduo de citosina em um *locus* polimórfico, e uma energia
15 necessária mais elevada para um alelo com um resíduo diferente naquele *locus* polimórfico. Isso pode ser conseguido quando a sonda tiver 100% de homologia com um alelo (uma sonda perfeitamente compatível), mas, tiver uma única incompatibilidade com o alelo alternativo. Uma vez
20 que a sonda perfeitamente compatível está ligada mais firmemente ao ADN alvo do que a sonda não compatível, ela exige mais energia para fazer com que a sonda hibridizada se dissocie.

Em uma etapa adicional do método acima, uma segunda

sonda ("âncora") pode ser usada. Em geral, a sonda âncora não é específica a cada um dos alelos, mas, se hibridiza independentemente de qual nucleotídeo esteja presente no locus polimórfico. A sonda âncora não afeta a energia de
5 rompimento necessária para desassociar o complexo de hibridização, mas, ao invés, contém um rótulo complementar para uso com a primeira sonda ("sensor").

A estabilidade da hibridização pode ser influenciada por inúmeros fatores, incluindo termo-regulação, regulação
10 química, assim como controle de severidade eletrônico, ou isoladamente ou em combinação com os outros fatores listados. Embora o uso de condições de severidade, em uma ou ambas das etapas de hibridização de alvo ou de severidade de oligonucleotídeo de sensor, um rápido
15 completar do processo pode ser alcançado. Isso é desejável para se conseguir hibridização indexada de maneira apropriada do ADN alvo, para se atingir o número máximo de moléculas em um sítio de teste com um complexo de hibridização acurado. Por meio de exemplo, com o uso de
20 severidade, a etapa de hibridização inicial pode ser completada em dez minutos ou menos, mais vantajosamente, cinco minutos ou menos, e muitíssimo vantajosamente, dois minutos ou menos. No todo, o processo analítico pode ser completado em menos do que meia hora.

Em um modo, o complexo de hibridização é rotulado e a etapa de determinação da quantidade de hibridização inclui a detecção das quantidades de complexo de hibridização rotulado nos sítios de teste. O dispositivo e o método de detecção podem incluir, mas, não estão limitados a, formação de imagem óptica, formação de imagem eletrônica, formação de imagem com uma câmera de CCD, formação de imagem óptica integrada e espectrometria de massa. Além disso, a quantidade de sonda rotulada ou não rotulada ligada ao alvo pode ser quantificada. Tal quantificação pode incluir análise estatística. A porção rotulada do complexo pode ser o alvo, o estabilizador, a sonda ou o complexo de hibridização no todo. A rotulação pode ser por rotulação fluorescente selecionada a partir do grupo de, mas, não limitada a, Cy3, Cy5, Bodipy Texas Red, Bodipy Far Red, Lucifer Yellow, Bodipy 630/650-X, Bodipy R6G-X e 5-CR 6G. Rotulação colorimétrica, rotulação bioluminescente e/ou rotulação quimioluminescente podem adicionalmente realizar a rotulação. A rotulação pode incluir adicionalmente a transferência de energia entre moléculas no complexo de hibridização por análise de perturbação, *quenching*, transporte de elétrons entre moléculas de doador e de receptor, o último dos quais pode ser facilitado por complexos de hibridização por compatibilidade de fita

dupla. Opcionalmente, se o complexo de hibridização não estiver rotulado, a detecção pode ser realizada por medição de condutância diferencial entre ADN de fita dupla e ADN de fita não dupla. Além disso, a detecção direta pode ser conseguida por interferometria óptica baseada em silício poroso ou por espectrometria de massa. Ao se usar espectrometria de massa, não é necessário rótulo fluorescente ou qualquer outro rótulo. De preferência, é obtida detecção por níveis extremamente elevados de resolução de massa alcançados por medição direta, por exemplo, por tempo de voo (TOF) ou por ionização com *spray* de elétrons (ESI). Quando for contemplada espectrometria de massa, sondas tendo uma sequência de ácidos nucleicos de 50 bases ou menos são vantajosas.

O rótulo pode ser amplificado, e pode incluir, por exemplo, ADN ramificado ou dendrítico. Se o ADN alvo estiver purificado, ele pode estar não amplificado ou amplificado. Além disso, se o alvo purificado for amplificado e a amplificação for um método exponencial, ele pode ser, por exemplo, ADN amplificado ou PCR ou ADN amplificado por amplificação por deslocamento de fita (SDA). Métodos lineares de amplificação de ADN, tais como círculos rodantes ou corrente (*runoff*) transcricional também podem ser usados.

Quando for desejado amplificar um fragmento de ADN que compreenda um SNP de acordo com a presente invenção, os iniciadores para frente e reverso podem ter os segmentos *contigs* de cerca de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou qualquer outro comprimento até e incluindo cerca de 50 nucleotídeos de comprimento. As seqüências com as quais o iniciadores para frente e reverso de anelam estão vantajosamente localizadas de cada lado da posição de nucleotídeo em particular, que esteja substituída no SNP a ser amplificado.

Um rótulo detectável pode ser incorporado em um ácido nucléico durante pelo menos um ciclo de uma reação de amplificação. Meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos ou químicos podem detectar tais rótulos. Rótulos úteis na presente invenção incluem corantes fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, Vermelho do Texas, rodamina, e os similares), rótulos radioativos (por exemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , etc), enzimas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, etc), rótulos colorimétricos, tais como ouro coloidal ou contas de vidro colorido ou de plástico (por exemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc). O rótulo é acoplado diretamente

ou indiretamente a um componente do ensaio de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Conforme indicado acima, uma ampla variedade de rótulos é usada, com a escolha do rótulo dependendo da sensibilidade necessária, da
5 facilidade de conjugação com o composto, das exigências de estabilidade, da instrumentação disponível e das provisões para descarte. Rótulos não radioativos são freqüentemente ligados por meios indiretos. Polimerases também podem incorporar nucleotídeos fluorescentes durante a síntese de
10 ácidos nucléicos.

Reagentes permitindo o seqüenciamento de produtos de reação podem ser utilizados aqui. Por exemplo, nucleotídeos terminadores de cadeia freqüentemente serão incorporados em um produto de reação durante um ou mais ciclos de uma
15 reação. Kits comerciais contendo os reagentes muitíssimo tipicamente usados para esses métodos de seqüenciamento de ADN estão disponíveis e são amplamente usados. Métodos de digestão com éxonuclease de PCR para o seqüenciamento de ADN também podem ser usados. Muitos métodos de
20 seqüenciamento de ADN genômico são conhecidos na técnica, e qualquer tal método pode ser usado; ver, por exemplo, Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, terceira edição, Cold Spring Harbor Press. Por exemplo, conforme descrito abaixo, um fragmento de ADN,

compreendendo a localização do SNP de interesse, pode ser amplificado usando a reação em cadeia com polimerase ou alguma outra reação de amplificação mediada por polimerase cíclica. A região amplificada de ADN pode, então, ser

5 seqüenciada usando qualquer método conhecido na técnica. De maneira vantajosa, o seqüenciamento de ácido nucléico é feito por métodos automatizados (revistos por Meldrum, (2000) *Genome Res.* 10: 1288- 303, a revelação do qual é aqui incorporada por referência em sua totalidade), por

10 exemplo, usando um instrumento Beckman CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Instruments, Inc.). Métodos para o seqüenciamento de ácidos nucléicos incluem, mas, não estão limitados a, seqüenciamento de ADN

15 fluorescente automatizado (ver, por exemplo, Watts & MacBeath, (2001) *Methods Mol Biol.* 167: 153-70 e MacBeath et al. (2001) *Methods Mol Biol.* 167:119-52), eletroforese capilar (ver, por exemplo, Bosserhoff et al. (2000) *Comb Chem High Throughput Screen.* 3 : 455-66), *chips* de seqüenciamento de ADN (ver, por exemplo, Jain, (2000)

20 *Pharmacogenomics.* 1 : 289-307), espectrometria de massa (ver, por exemplo, Yates, (2000) *Trends Genet.* 16: 5-8), piro-seqüenciamento (ver, por exemplo, Ronaghi, (2001) *Genome Res.* 11: 3-11), e eletroforese em gel de camada ultrafina (ver, por exemplo, Guttman & Ronai, (2000)

Electrophoresis. 21: 3952-64), as revelações dos quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. O seqüenciamento também pode ser feito por uma companhia comercial. Exemplos de tais companhias incluem, mas, não
5 estão limitados a, University of Georgia Molecular Genetics Instrumentation Facility (Athens, Georgia) ou Seq Wright DNA Technologies Services (Houston, Texas).

Uma sonda específica de SNP também pode ser usada na detecção do SNP em seqüências de ácidos nucléicos
10 específicas amplificadas do gene alvo, tais como produtos de PCR amplificados gerados usando os iniciadores descritos acima. Em certas concretizações, essas sondas específicas para SNP consistem em fragmentos de oligonucleotídeos. De maneira vantajosa, os fragmentos são de comprimento
15 suficiente para fornecer hibridização específica com a amostra de ácido nucléico. O uso de uma sonda de hibridização de entre 10 e 50 nucleotídeos de comprimento permite a formação de uma molécula de duplex que seja tanto estável quanto seletiva. Moléculas tendo seqüências
20 complementares sobre extensões maiores do que 12 bases de comprimento, são, em geral, vantajosas, a fim de aumentar a estabilidade e a seletividade do híbrido, e, por meio disto, aperfeiçoar a qualidade e o grau de moléculas híbridas particulares obtidas. Em geral, preferir-se-á

projetar moléculas de ácido nucléico tendo extensões de 16 a 24 nucleotídeos, ou ainda mais longas, se desejado. Uma região de nucleotídeo de etiqueta pode ser incluída, como na extremidade 5' do iniciador, que possa fornecer um sítio
5 com o qual um iniciador de seqüenciamento de oligonucleotídeo possa se hibridizar, para facilitar o seqüenciamento de múltiplas amostras de PCR.

A seqüência de sonda têm que abranger a posição de nucleotídeo particular que possa estar substituída no SNP
10 particular a ser detectado. De maneira vantajosa, duas ou mais "sondas específicas quanto ao alelo" diferentes podem ser usadas para análise de um SNP, uma primeira sonda específica quanto ao alelo para a detecção de um alelo, e uma segunda sonda específica quanto ao alelo para a
15 detecção do alelo alternativo.

Será entendido que essa invenção não está limitada aos iniciadores e sondas particulares revelados aqui e que ela pretende englobar pelo menos seqüências de ácidos nucléicos que sejam hibridizáveis com a seqüência de nucleotídeos
20 revelada aqui, o seu complemento ou um seu fragmento, ou que sejam análogos de seqüência funcionais destas seqüências. Contempla-se também que uma característica em particular de um animal possa ser determinada por uso de um painel de SNPs associado com aquela característica. Várias

características economicamente relevantes podem ser caracterizadas pela presença ou pela ausência de um ou mais SNPs e por uma pluralidade de SNPs em genes diferentes. Um ou mais painéis de SNPs podem ser usados nos métodos da invenção para definir o perfil fenotípico do animal em questão.

Homólogos (isto é, ácidos nucleicos derivados de outra espécie) ou outras seqüências relacionadas (por exemplo, parálogos) podem ser obtidos sob condições de hibridização padrão ou severa, com toda ou uma parte da seqüência em particular como uma sonda, usando métodos bem conhecidos na técnica para a hibridização e clonagem de ácidos nucleicos.

Os marcadores genéticos, suas sondas, métodos e kits da invenção são também úteis em um programa de criação, para selecionar a criação daqueles animais tendo fenótipos desejáveis para várias características economicamente importantes, tais como qualidade de e rendimento em carne aperfeiçoados, em particular, a maciez da carne. A seleção e a criação contínuas de animais, tais como animais de criação, que sejam pelo menos heterozigotos e, de maneira vantajosa, homozigotos, para alelos desejáveis dos sítios polimórficos do gene TFAM, associados com características economicamente relevantes de crescimento, ingestão de ração animal, eficiência e/ou mérito de carcaça, conduziriam a

uma raça, linhagem ou população tendo números mais elevados de proles com características economicamente relevantes de crescimento, ingestão de ração animal, eficiência e mérito de carcaça. Portanto, os SNPs de TFAM da presente invenção
5 podem ser usados como uma ferramenta de seleção.

Fenótipos desejáveis incluem, mas, não estão limitados a, ingestão de ração animal, taxa de crescimento, peso corporal, mérito e composição de carcaça e rendimento em leite. Características de carcaça específicas com fenótipos
10 desejáveis incluem, mas, não estão limitadas a, valor de carcaça adicional (valor carc adicional, \$), ganho diário médio (ADG, lb/d), espessura de gordura dorsal (BFAT, in), peso vivo calculado (Calc Lv Wt, lb), grau de rendimento calculado (cYG), dias em ração animal (DOF, d), percentagem
15 de tempero (DP, %), ingestão de matéria seca (DMI, lb), ingestão de matéria seca por dia em ração animal (DMI por DOF, lb/d), peso de carcaça quente (HCW, lb), valor de peso de carcaça quente (valor HCV, \$), teor em gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de marmorização
20 (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em ração animal (MBS/DOF), grau de qualidade, menor do que ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, <Sc vs,> Ch), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por peso percentual HCW

(REA/cwt HCW, $\text{in}^2/100$ lb peso de carcaça quente (HCW) e profundidade de gordura subcutânea (SFD).

Um aspecto da presente invenção fornece o agrupamento de animais e métodos para o gerenciamento de produção de

5 animais de criação compreendendo o agrupamento de animais de criação, tal como gado bovino, de acordo com o genótipo, conforme definido por painéis de SNPs, cada painel compreendendo pelo menos um SNP, um ou mais dos quais estão no gene TFAM da presente invenção. Outros SNPs, que podem

10 ser incluídos em painéis de SNPs, incluem, mas, não estão limitados a, SNPs encontrados no gene de calpastatina, gene GHR, gene FABP4, gene de grelina, gene de leptina, gene NPY, gene ob, gene UASMS1, gene UASMS2, gene UASMS3 e/ou gene UCP2. Os métodos de seleção e de agrupamento genéticos

15 da presente invenção podem ser usados em conjunção com outros métodos de agrupamento fenotípico convencionais, tais como agrupamento de animais por características visíveis, tais como peso, tamanho de estrutura, características raciais, e as similares. Os métodos da

20 presente invenção propiciam a produção de gado bovino tendo características hereditárias aperfeiçoadas, e podem ser usados para otimizar o desempenho de rebanhos de animais de criação em áreas tais como reprodução, ingestão de ração animal, qualidade de carcaça / carne e produção de leite. A

presente invenção fornece métodos de seleção de animais de criação para determinar aqueles mais prováveis de desenvolverem uma condição corporal desejada por identificação da presença ou ausência de um ou mais polimorfismos de genes correlacionados com a qualidade de carne.

Conforme descrito acima, e nos Exemplos, há várias características fenotípicas com as quais os SNPs da presente invenção podem estar associados. Cada uma das características fenotípicas e genéticas podem ser testadas usando os métodos descritos nos Exemplos, ou usando quaisquer métodos adequados conhecidos na técnica. Usando os métodos da invenção, um fazendeiro, um operador de parque de engorda, ou os similares, podem agrupar o gado bovino de acordo com a propensão genética de cada animal para uma característica desejada, tal como taxa de crescimento, ingestão de ração animal ou comportamento de alimentação, conforme determinado por genótipo de SNP. O gado bovino é testado para determinar a homozigosidade ou a heterozigosidade com respeito aos alelos de SNP de um ou mais genes, de modo que eles possam ser agrupados, tal que cada cercado contenha gado bovino com genótipos similares. Cada cercado de animais é, então, alimentado e de outro modo mantido de uma maneira e durante um tempo determinado

pelo operador de parque de engorda, e, então, abatido.

Os dados genotípicos individuais derivados a partir de um painel ou painéis de SNPs, para cada animal ou um rebanho de animais, podem ser registrados e associados com
5 vários outros dados do animal, por exemplo, informações de saúde, parentesco, condições pecuárias, histórico de vacinação, registros do rebanho, dados de segurança alimentar subsequente e os similares. Tais informações podem ser repassadas a uma agência governamental para
10 fornecer rastreabilidade de um animal ou produto de carne, ou elas podem servir como a base para informações de criação, alimentação e *marketing*. Uma vez que os dados tenham ou não tenham sido associados com outros dados, os dados são armazenados em um banco de dados acessível, tal
15 como, mas, não limitado a, um banco de dados de computador ou um *microchip* implantado no animal. Os métodos da invenção podem propiciar uma análise de dados alimentados que possam ser comparados com parâmetros desejados pelo operador. Esses parâmetros incluem, mas, não estão
20 limitados a, aqueles tais como objetivos da criação, objetivos de postura de ovos, níveis de vacinação de um rebanho. Se o desempenho ou propriedades dos animais se desviarem dos objetivos desejados, os métodos baseados em computador podem desencadear um alerta para permitir que o

operador ajuste doses de vacinação, medicamentos, ração animal, etc, de maneira correspondente.

Os resultados da análise fornecem dados que são associados com o animal individual ou com o rebanho, no todo ou em parte, a partir dos quais a amostra foi tomada. Os dados são, então, mantidos em um banco de dados acessível, e podem ou não ser associados com outros dados a partir daquele indivíduo em particular ou a partir de outros animais.

Os dados obtidos a partir de animais individuais podem ser armazenados em um banco de dados que possa ser integrado ou associado com e/ou correlacionados com outros bancos de dados. O banco de dados, em conjunto com os dados associados, oferecem informações sobre o animal individual a serem conhecidas através de cada estágio da vida do animal, isto é, desde a concepção até o consumo do produto animal.

Os dados acumulados e a combinação dos dados genéticos com outros tipos de dados do animal fornecem o acesso às informações sobre parentesco, identificação do rebanho, informações sobre saúde incluindo vacinações, exposição a doenças, localização do parque de engorda, mudanças de dieta e de propriedade. Informações, tais como datas e resultados de testes diagnósticos ou de rotina, são

facialmente armazenados e acessíveis. Tais informações seriam especialmente valiosas para companhias, particularmente, aquelas que busquem linhagens de criação superiores.

5 Cada animal pode ser fornecido com um identificador único. O animal pode ser etiquetado, como em programas de rastreamento tradicionais, ou ter *chips* de computador implantados fornecendo dados armazenados e legíveis ou fornecidos com qualquer outro método de identificação, que
10 associe o animal com seu identificador único.

 O banco de dados contendo os resultados de genótipo baseados em SNP para cada animal ou os dados para cada animal podem ser associados ou ligados a outros bancos de dados contendo dados, por exemplo, que possam ser úteis na
15 seleção de características para o agrupamento ou o subgrupamento de um animal. Por exemplo, e não por limitação, dados pertinentes aos animais tendo protocolos de medicação ou de vacinação particulares, opcionalmente, podem ser ulteriormente ligados com dados pertinentes a
20 animais tendo alimento a partir de certas fontes de alimentos. A capacidade de refinar um grupo de animais é limitada somente pelas características buscadas e os bancos de dados contendo informações relacionadas àquelas características.

Bancos de dados, que possam ser associados de maneira útil com os métodos da invenção, incluem, mas, não estão limitados a, dados científicos específicos ou gerais. Dados específicos incluem, mas, não estão limitados a, linhagens de criação, ancestrais machos nobres, ancestrais fêmeas nobres, e os similares, outros genótipos do animal, incluindo se ou não os outros animais específicos possuem genes específicos, incluindo elementos genéticos transgênicos, localização de animais, que compartilhem características genéticas similares ou idênticas, e as similares. Dados gerais incluem, mas, não estão limitados a, dados científicos, tais como quais genes codificam características de qualidade específicas, dados de associação de criação, dados de ração animal, tendências de criação e as similares.

Um método da presente invenção inclui o fornecimento ao proprietário do animal ou ao cliente de um equipamento de coleta de amostra, tal como bastonetes de algodão e etiquetas, úteis para a coleta de amostras a partir dos quais dados genéticos possam ser obtidos. De maneira vantajosa, a embalagem é codificada com um rótulo com código de barras. As etiquetas são codificadas com os mesmos indícios de identificação, de maneira vantajosa com um rótulo com código de barras de compatibilidade.

Opcionalmente, a embalagem contém meios para o envio das etiquetas para um laboratório de análises. A embalagem opcional é também codificada com indícios de identificação, de maneira vantajosa com um rótulo com código de barras.

5 Opcionalmente, o método inclui um sistema, no qual uma conta em banco de dados é estabelecida quando do pedido do equipamento de amostragem. O identificador da conta em bancos de dados corresponde aos indícios de identificação das etiquetas e da embalagem. Quando do despacho do
10 equipamento de amostragem em cumprimento do pedido, os indícios de identificação são registrados em um banco de dados.

De maneira vantajosa, o identificador é um rótulo com código de barras, o qual é escaneado quando as etiquetas
15 são enviadas. Quando as etiquetas forem devolvidas para a instalação de análise, o identificador é novamente registrado e comparado com as informações previamente registradas no banco de dados quando do despacho do frasco para o cliente. Uma vez que a tipificação do genótipo
20 esteja completa, as informações são registradas no banco de dados e codificadas com o identificador único. Resultados de teste são também fornecidos ao cliente ou ao proprietário do animal.

Os dados armazenados no banco de dados de genótipos

podem ser integrados com ou comparados com outros dados ou bancos de dados para a finalidade de identificação de animais, com base em propensões genéticas. Outros dados ou bancos de dados incluem, mas, não estão limitados a, 5 aqueles contendo informações relacionadas com análise de ADN com base em SNP, vacinação, programa de pré-condicionamento *Sure Health*, cio e resultados de gravidez, níveis de hormônios, segurança / contaminação alimentar, contagens de células somáticas, ocorrência de mastite, 10 resultados de testes diagnósticos, níveis de proteína no leite, gordura no leite, estado de vacinação, registros de saúde, níveis de minerais, níveis de minerais traço, desempenho do rebanho, e os similares.

Portanto, a presente invenção engloba métodos 15 auxiliados por computador para o rastreamento da criação e dos históricos veterinários de animais de criação animal, abrangendo o uso de um sistema baseado em computador compreendendo um computador programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um 20 dispositivo de entrada e um dispositivo de saída, e compreendendo as etapas de geração de um perfil de um animal de criação por entrada, no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados de genótipo do animal, sendo que o genótipo pode ser definido por um

painel de pelo menos dois polimorfismos de um único nucleotídeo, que predigam pelo menos uma característica física do animal, a entrada, no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados de bem estar do animal, a correlação dos dados de bem estar alimentados com o perfil fenotípico do animal usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, e a saída de um perfil do animal ou grupo de animais para o dispositivo de saída.

Os bancos de dados e as suas análises serão acessíveis para aqueles para os quais o acesso tenha sido fornecido. O acesso pode ser fornecido por meio de direitos de acesso ou por assinatura para porções de dados específicas. Por exemplo, o banco de dados pode ser acessado por proprietários do animal, pelo sítio de teste, pela entidade fornecendo a amostra para o sítio de teste, pelo pessoal de parque de engorda, e por veterinários. Os dados podem ser fornecidos em qualquer forma, tais como por acesso a um *website*, *fax*, *e-mail*, correspondência postada, telefone automático, ou outros métodos de comunicação. Esses dados também podem estar codificados em um dispositivo de armazenamento portátil, tal como um *microchip*, que possa ser implantado no animal. De maneira vantajosa, as informações podem ser lidas e novas informações adicionadas sem se remover o *microchip* do animal.

A presente invenção compreende sistemas para a realização dos métodos revelados aqui. Tais sistemas compreendem dispositivos, tais como computadores, conexões à *internet*, servidores e dispositivos de armazenamento para dados. A presente invenção também fornece um método de transmissão de dados compreendendo a transmissão de informações a partir de tais métodos aqui discutidos ou de suas etapas, por exemplo, via telecomunicações, telefone, vídeo-conferência, comunicações em massa, por exemplo, apresentação, tais como, uma apresentação em computador (por exemplo, POWERPOINT), *internet*, *e-mail*, comunicação por documentos, tais como programas de computador (por exemplo, WORD), e os similares.

Sistemas da presente invenção podem compreender um módulo de coleta de dados, que inclui um coletor de dados para coletar dados a partir de um animal ou embrião e transmitir os dados para um módulo de análise de dados, uma interface de rede para recebimento dos dados a partir do módulo de análise de dados, e, opcionalmente, adicionalmente adaptado para combinar dados múltiplos a partir de um ou mais animais individuais, e para transmitir os dados via uma rede para outros sítios, ou para um dispositivo de armazenamento.

Mais particularmente, sistemas da presente invenção

compreendem um módulo de coleta de dados, um módulo de análise de dados, uma interface de rede para o recebimento dos dados a partir do módulo de análise de dados, e, opcionalmente, adicionalmente adaptado para combinar dados múltiplos a partir de um ou mais animais individuais, e para transmitir os dados via uma rede para outros sítios, e/ou um dispositivo de armazenamento. Por exemplo, os dados coletados pelo módulo de coleta de dados conduzem a uma determinação da ausência ou presença de um SNP de um gene no animal ou embrião, e, por exemplo, tais dados são transmitidos quando o regime de alimentação com ração animal do animal for planejado.

Em uma concretização na qual os dados estejam implantados em um *microchip* em um animal particular, o fazendeiro pode otimizar a eficiência de gerenciamento do rebanho porque o fazendeiro é capaz de identificar as predisposições genéticas de um animal individual, assim como tratamentos (por exemplo, vacinações e visitas do veterinário) passados, presentes e futuros. Portanto, a invenção também propicia o acesso a outros bancos de dados, por exemplo, dados de rebanho relativos a testes genéticos e dados realizados por outros, por *link* de dados a outros sítios. Portanto, dados a partir de outros bancos de dados podem ser transmitidos para o banco de dados central da

presente invenção via uma interface de rede para recebimento de dados a partir do módulo de análise de dados dos outros bancos de dados.

A invenção se refere a um sistema de computador e a
5 uma mídia legível por computador para a compilação de dados sobre um animal, o sistema contendo dados alimentados sobre aquele animal, tais como, mas, não limitados a, históricos de vacinação e de medicação, análise de ADN, análise de tiroglobulina, leptina, MMI (Meta Morphix Inc.), diagnose
10 de encefalopatia espongiforme bovina (BSE), vacinação contra brucelose, vacinação contra FMD (doença das patas e da boca), vacinação contra BVD (diarréia viral bovina), programa de pré-condicionamento *Sure Health*, cio e resultados de gravidez, tuberculose, níveis de hormônios, segurança /
15 contaminação alimentar, contagens de células somáticas, ocorrência de mastite, resultados de testes diagnósticos, níveis de proteína no leite, gordura no leite, estado de vacinação, registros de saúde, níveis de minerais, níveis de minerais traço, desempenho do rebanho, e os similares.
20 Os dados do animal também podem incluir tratamentos prévios, assim como tratamento sob medida sugerido dependendo da predisposição genética daquele animal em face de uma doença em particular.

A invenção também fornece um método auxiliado por

computador para o aperfeiçoamento de produção animal compreendendo o uso de um sistema de computador, por exemplo, um computador programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um
5 dispositivo de entrada e um dispositivo de saída, as etapas de entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo dados de criação, veterinários, de medicação, diagnósticos e os similares, de um animal, de correlação de uma
10 característica física predita pelo genótipo usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, de saída, para o dispositivo de saída, da característica física correlacionada ao genótipo, e de alimentação do animal de uma dieta baseada na característica física, por
15 meio do quê se aperfeiçoa a produção de criação animal.

A invenção fornece adicionalmente um método auxiliado por computador para a otimização da eficiência de parques de engorda para animais de criação, compreendendo o uso de um sistema de computador, por exemplo, um computador
20 programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um dispositivo de entrada e um dispositivo de saída, e as etapas de entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um histórico veterinário, de criação, de um

animal, de correlação dos históricos veterinário, de criação, usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, de saída, para o dispositivo de saída, da característica física correlacionada ao genótipo, e de
5 alimentação do animal com uma dieta baseada na característica física, por meio do quê se otimiza e eficiência de parques de engorda para animais de criação.

A invenção compreende adicionalmente métodos de fazer negócios, por fornecimento de acesso a tais mídias legíveis
10 por computador e/ou sistemas de computador e/ou dados coletados a partir de animais, a usuários; por exemplo, a mídia e/ou dados em sequência podem estar acessíveis a um usuário, por exemplo, em uma base de assinatura, via a *internet* ou uma rede de comunicações / computadores global;
15 ou, o sistema de computador pode estar disponível a um usuário, em uma base de assinatura.

Em uma concretização, a invenção fornece um sistema de computador para gerenciamento de animais de criação compreendendo características físicas e bancos de dados
20 correspondendo a um ou mais animais. Em outra concretização, a invenção fornece mídias legíveis por computador para o gerenciamento de animais de criação compreendendo características físicas e históricos veterinários correspondendo a um ou mais animais. A

invenção fornece adicionalmente métodos de fazer negócios para o gerenciamento de animais de criação compreendendo o fornecimento, a um usuário, do sistema de computador e mídia descritos acima ou características físicas e históricos veterinários correspondendo a um ou mais animais. A invenção engloba adicionalmente métodos de transmissão de informações obtidas em qualquer método ou suas etapas aqui descritas ou quaisquer informações aqui descritas, por exemplo, via telecomunicações, telefone, comunicações de massa, mídias de massa, apresentações, *internet*, *e-mail*, etc.

A invenção engloba adicionalmente kits úteis para a seleção de ácidos nucleicos isolados a partir de um ou mais bovinos individuais por variação alélica de qualquer um dos genes de fator de transcrição mitocondrial, e, em particular, por qualquer dos SNPs descritos aqui, sendo que os kits podem compreender pelo menos um oligonucleotídeo que se hibridiza, de maneira seletiva, com um ácido nucleico compreendendo qualquer um dos um ou mais dos quais são seqüências de TFAM aqui descritas, e instruções para uso do oligonucleotídeo para detectar variação no nucleotídeo correspondendo ao SNP do ácido nucleico isolado.

Uma concretização desse aspecto da invenção fornece um

oligonucleotídeo que se hibridize de maneira específica com a molécula de ácido nucléico isolada deste aspecto da invenção, e sendo que o oligonucleotídeo se hibridiza com uma parte da molécula de ácido nucléico isolada
5 compreendendo qualquer um dos sítios polimórficos nas seqüências de TFAM aqui descritas.

Outra concretização da invenção é um oligonucleotídeo, que se hibridize de maneira específica sob condições de elevada severidade com qualquer um dos sítios polimórficos
10 do gene TFAM, sendo que o oligonucleotídeo é de entre cerca de 18 nucleotídeos e cerca de 50 nucleotídeos.

Em outra concretização da invenção, o oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo central que se hibridiza de maneira específica com um sítio polimórfico de gene TFAM da
15 porção da molécula de ácido nucléico.

Outro aspecto da invenção é um método de identificação de um polimorfismo de TFAM em uma amostra de ácido nucléico compreendendo o isolamento de uma molécula de ácido nucléico que codifica TFAM ou um fragmento dele, e a
20 determinação do nucleotídeo no sítio polimórfico.

Outro aspecto da invenção é um método de seleção de gado bovino, para determinar aqueles bovinos mais prováveis de exibirem uma diferença biológica de qualidade de carne compreendendo as etapas de obtenção de uma amostra de

material genético a partir de um bovino; e a avaliação quanto à presença de um genótipo no bovino, que esteja associado com a qualidade de carne, o genótipo caracterizado por um polimorfismo em qualquer um dos genes
5 de fator de transcrição mitocondrial.

Em outras concretizações desse aspecto da invenção, a etapa de avaliação é selecionada a partir do grupo consistindo em: análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), mini-seqüenciamento, MALD-
10 TOF, SINE, análise de heteroduplex, polimorfismo conformacional de fita única (SSCP), eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) e eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE).

Em várias concretizações da invenção, o método pode
15 compreender adicionalmente a etapa de amplificar uma região do gene TFAM ou uma porção dele que contenha o polimorfismo. Em outras concretizações da invenção, a amplificação pode incluir a etapa de seleção de um iniciador de seqüência para frente e de um iniciador de
20 seqüência reversa capazes de amplificar uma região do gene TFAM.

Outro aspecto da invenção é um método auxiliado por computador para a predizer quais animais de criação animal possuem uma diferença biológica em qualidade de carne,

compreendendo: o uso de um sistema de computador, por exemplo, um computador programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um dispositivo de entrada e um dispositivo de saída, as etapas

5 de: (a) a entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um genótipo de TFAM de um animal, (b) a correlação de uma qualidade de crescimento, de ingestão de ração animal, de eficiência ou de mérito de carcaça preditos pelo genótipo de TFAM usando

10 o processador e o sistema de armazenamento de dados e (c) a saída, para o dispositivo de saída, da qualidade de carne correlacionada ao genótipo de TFAM, por meio do quê se prediz quais animais de criação animal possuem uma qualidade particular de crescimento, de ingestão de ração

15 animal, de eficiência ou de mérito de carcaça.

Ainda outro aspecto da invenção é um método de fazer negócios para o gerenciamento de animais de criação compreendendo o fornecimento, a um usuário, de um sistema de computador para o gerenciamento de animais de criação

20 compreendendo características físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais ou uma mídia legível por computador para o gerenciamento de animais de criação compreendendo características físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais ou características

físicas e genótipos correspondendo a um ou mais animais.

A invenção será, agora, descrita adicionalmente por meio dos seguintes exemplos não limitantes.

EXEMPLOS

5 Exemplo 1:

Esse Exemplo fornece seqüências de ADN, polimorfismos genéticos e associações significativas com marmorização e profundidade de gordura subcutânea em cruzamentos Wagyu x Limousin F₂ para o gene de fator A de transcrição
10 mitochondrial (TFAM).

Fator A de transcrição mitocondrial (TFAM), uma proteína codificada no núcleo desempenha um importante papel na iniciação de transcrição e de replicação de ADN mitocondrial (mtADN). A expressão diminuída de genes
15 mitocondriais codificados no núcleo tem sido associada com o início de obesidade em ratos. Portanto, postulou-se que variantes genéticas em gene TFAM influenciam a biogênese mitocondrial, afetando, conseqüentemente, a deposição de gordura corporal e o metabolismo de energia. Na presente
20 invenção, seqüências tanto de cADN (2259 pb) quanto de ADN genômico (16666 pb) são geradas para o gene TFAM bovino usando uma combinação de clonagem *in silico* com amplificação por PCR de região dirigida. O alinhamento de seqüências tanto de cADN quanto genômicas conduziram à

determinação de organização e caracterização genômicas da região de promotor do gene TFAM bovino. Infelizmente, nenhum polimorfismo foi detectado na região codificante, mas, dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) A/C e C/T ligados proximamente foram encontrados no promotor TFAM bovino. Esses dois SNPs tiveram seus genótipos tipificados em 237 animais F₂ Wagyu x Limousin com fenótipos registrados com relação à marmorização e profundidade de gordura subcutânea (SFD). A análise estatística demonstrou que ambos os SNPs estavam associados com a marmorização ($P = 0,0153$ para A/C e $P = 0,0026$ para C/T) e SFD ($P = 0,0200$ para A/C e $P = 0,0039$ para C/T), respectivamente. Uma busca por elementos reguladores transcricionais usando MatInspector indicou que ambos os SNPs conduzem a um ganho/perda de seis sítios de ligação putativos para genes relevantes para deposição de gordura e metabolismo de energia. Comparado a relatos prévios sobre genes de tiroglobulina, leptina e diacilglicerol O-transferase, o gene TFAM teve os maiores efeitos tanto sobre a marmorização quanto sobre SFD nessa população, indicando o seu potencial como um novo alvo para seleção auxiliada por marcador na indústria de carne bovina.

Fator A de transcrição mitocondrial (TFAM), um membro de uma família de proteínas de grupo de elevada mobilidade

e o fator de transcrição mitocondrial identificado pela primeira vez (Fisher e Clayton, 1988), é essencial para a manutenção e a biogênese de mtADN. Em primeiro lugar, TFAM desempenha um papel similar à histona na mitocôndria, uma vez que ela está firmemente associada com mtADN como um componente principal do nucleóide (Kanki et al., 2004a). Evidências mostraram que uma molécula de mtADN está empacotada com cerca de 900 moléculas de TFAM em média (Alam et al., 2003), o que faz com que mtADN não mais esteja desnudo. Em segundo lugar, TFAM regula o número de cópias de mtADN em mamíferos. Investigação utilizando uma combinação de camundongos com super-expressão de TFAM e deficiência (*knockout*) de TFAM demonstrou que o número de cópias de mtADN é diretamente proporcional ao nível de proteína de TFAM total em embriões de camundongo (Ekstrand et al., 2004). A interferência de ARN da expressão de TFAM endógeno em células HeLa também indicou que a quantidade de mtADN está correlacionada em paralelo com a quantidade de TFAM (Kanki et al., 2004b). Em terceiro lugar, TFAM estimula a transcrição de mtADN. A proteína de TFAM possui dois domínios de grupo de elevada mobilidade tandem, o que faz com que TFAM se ligue a, libere e dobre ADN sem especificidade de seqüência e, portanto, facilite a iniciação de transcrição de mtADN (Gaspari et al., 2004).

Evidências mostraram que a importação de wt-TFAM para as mitocôndrias do fígado a partir de ratos com hipotireoidismo aumentou a síntese de ARN de maneira significativa em até 4 vezes (Garstka et al., 2003).

5 Já é sabido há muito anos que o tecido adiposo desempenha um papel central na regulação e na manipulação de metabolismos de energia por meio do armazenamento e rotatividade de triglicerídeos e por meio da secreção de fatores que afetem a saciedade e a utilização de
10 combustível. Entretanto, muitos aspectos chave da adipogênese são acompanhados pela estimulação de biogênese mitocondrial (Wilson-Fritch et al., 2003). Por exemplo, o principal sítio de β -oxidação de ácidos graxos ocorre em mitocôndrias (Reichert e Neupert, 2004), o que pode
15 fornecer intermediários chave para a síntese de triglicerídeos via a ação de piruvato carboxilase (Owen et al., 2002). Além disso, uma massa mitocondrial relativamente grande é necessária para gerar acetil-CoA para a ativação de ácidos graxos antes da esterificação
20 para formar triglicerídeos. Todos esses estudos demonstraram o papel e a função essenciais das mitocôndrias no metabolismo de lipídeos.

Para se explorar adicionalmente o mecanismo de mitocôndrias envolvidas em adipogênese, Wilson-Fritch e

colaboradores (2003 e 2004) estudaram a diferenciação de células 3T3-L1 (representativas de adipócitos brancos) por uso de abordagens tanto proteômicas quanto genômicas. A análise proteômica revelou um aumento de 20 a 30 vezes na
5 concentração de inúmeras proteínas mitocondriais, enquanto que a análise genômica com a perfilação de expressão de genes, usando Affymetrix GeneChips, detectou um aumento estatisticamente significativo na expressão de muitos genes mitocondriais codificados no núcleo durante a adipogênese.
10 Em particular, os inventores constataram uma profunda diminuição de aproximadamente 50% nos níveis de transcritos para genes mitocondriais codificados no núcleo acompanhando o início de obesidade (Wilson-Fritch et al., 2004). Uma vez que TFAM é um dos genes mitocondriais codificados no
15 núcleo, postulou-se que ele desempenha um importante papel na lipogênese ou deposição de gordura via seu papel na biogênese mitocondrial. Aqui, é apresentada evidência a suportar a hipótese relatando-se associações significativas de polimorfismos de promotor de TFAM bovino com
20 classificações de marmorização e medições de SFD em cruzamentos de raças Wagyu x Limousin.

Uma geração F_1 de um cruzamento Wagyu x Limousin foi desenvolvido na Washington State University e transferido para o Fort Keogh Livestock and Range Research Laboratory,

ARS, USDA, no outono de 1998, incluindo 6 touros F_1 e 113 fêmeas ancestrais. Cruzamentos entre si desses animais F_1 produziram 71 progenias F_2 em 2000, 90 em 2001 e 109 em 2002, respectivamente. Cada bezerro foi pesado dentro de 24 horas depois do parto e novamente no desmame, quando os bezerros tinham, em média, aproximadamente 180 dias de vida. Depois do desmame, os bezerros foram retornados ao pasto em fileira nativo e foram suplementados com 0,7 Kg por bezerro por dia tanto de torta de cevada quanto de péletes de alfafa. Em meados de janeiro, os bezerros foram transferidos das fileiras e foram alimentados com ensilagem e feno picado para alcançarem ganhos antecipados de 0,5 a 0,8 Kg por dia. Então, eles foram colocados em dieta de acabamento durante aproximadamente 150 dias, seguido por abate. Dados de taxa de crescimento e de qualidade de carcaça e de carne foram coletados em todos os bezerros F_2 . As classificações de marmorização variaram desde 4 = Leve⁰ a 9,5 = Moderadamente Abundante⁵⁰ (DP = 1,00) e medições de SFD variaram desde 0,1 a 1,3 polegadas (SD = 0,18) nesta população F_2 . A classificação de marmorização é uma medição subjetiva da quantidade de gordura intramuscular no músculo *longissimus*, com base em padrões USDA (<http://www.ams.usda.gov/>). SFD foi medida na interface das 12^a e 13^a costelas perpendicular à superfície externa, em

um ponto a três quartos do comprimento do músculo *longissimus* a partir de sua extremidade de osso lombar. O ADN foi extraído a partir de amostras de sangue. Com base na disponibilidade tanto de dados quanto de amostras de
5 ADN, 246 observações foram usadas no presente estudo.

Infelizmente, seqüências tanto de cADN quanto de ADN genômico não estavam disponíveis para o gene TFAM bovino quando o projeto foi iniciado. Entretanto, o projeto de mapeamento de genoma bovino tem avançado de maneira
10 significativa recentemente. Em particular, mais do que 500.000 ESTs (etiquetas de seqüências expressas) bovinas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e seqüências de genoma bovino 3X (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>) foram liberadas para os bancos de dados públicos. Portanto,
15 uma combinação de uma abordagem por clonagem comparativa *in silico* com uma abordagem por clonagem alvo de PCR foi desenvolvida e usada para determinar as seqüências tanto de cADN quanto de ADN genômico do gene bovino (Figura 1). O procedimento incluiu três etapas: 1), buscas BLAST em face
20 dos bancos de dados públicos usando uma seqüência de cADN de comprimento completo do gene TFAM humano como uma referência para recuperar todas as seqüências bovinas que fossem ortólogas em relação ao gene humano; 2), anotação das seqüências tanto de ESTs quanto de ADN genômico, a fim

de projetar iniciadores para a amplificação de região alvo para fechar intervalos, se houver; e 3), alinhamento de seqüências de cADN e de seqüências de ADN genômico, para determinar a seqüência de cADN de comprimento completo e a
5 organização genômica do gene TFAM bovino.

Dois pares de iniciadores foram projetados para fechar dois intervalos para a seqüência de ADN genômico do gene TFAM bovino (Tabela 1). Reações PCR foram realizadas usando 25 ng de ADN genômico bovino como molde, em um volume final
10 de 10 µL contendo 12,5 ng de cada iniciador, dNTPs 200 µM, MgCl₂ 1,5 - 3 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM e 0,2 U de polimerase Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA). As condições de PCR foram implementadas como se segue: 94°C durante 2 minutos, 32 ciclos de 94°C durante 30 segundos,
15 63°C durante 30 segundos e 72°C durante 30 segundos, seguidos por uma extensão adicional de 5 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram, a seguir, examinados por eletroforese através de um gel de agarose à 1,5% com tampão TBE 1X, para determinar a qualidade e a quantidade para o
20 seqüenciamento de ADN. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador ABI 3730 no Laboratory for Biotechnology and Bioanalysis (Washington State University). As seqüências desses dois produtos amplificados por PCR, compreendendo as regiões de intervalo, e três *contigs* de seqüências

genômicas, derivadas a partir do projeto de sequência de genoma de gado bovino, foram, então, montadas para formar uma sequência de ADN genômico completa para o gene TFAM bovino.

5 **Tabela 1. Iniciadores projetados para o fechamento de intervalo genômico e detecção de mutação no gene TFAM bovino.**

Região alvo	Sequências de iniciador (5' -3')	Tamanho (pb)	Anelamento TM	SEQ ID Nº
Promotor	Para frente: GTTGTTGCAGAATCAGCTAAAATG	801	61°C	4
	Reverso: CATCCACTGAGACTATCGCTGAACT			5
Éxon 1	Para frente: CGCCTCCTAGCTAATCGGAAGTTAG	405	61°C	6
	Reverso: GTCGGAATCACAGGGCTAAGTCAGT			7
Éxon 2	Para frente: TTCCCCTGGATAGGACAGGATTTTA	421	61°C	8
	Reverso: TACAGGCCATCACACAGAATGGTTA			9
Éxon 3	Para frente: GAGCTAATGGATTATTCTTTAATGA	407	57°C	10

Região alvo	Sequências de iniciador (5'-3')	Tamanho (pb)	Anelamento TM	SEQ ID N°
	Reverso: ATGTGTTATCCAAGGTGAAGGTCTA			11
Éxon 4	Para frente: TTATAAGTGGGATTTTCAGAGTGCAT	459	57°C	12
	Reverso: AACTGAAGTCATTCTCTACCACGTC			13
Éxon 5	Para frente: AACAATCGCATACTCATAATGTTCA	392	57°C	14
	Reverso: TGGTAAGAAAAAGGATTTTGTAGGTC			15
Intervalo de íntron 5	Para frente: GCACAAACAAAGGAACCATCAA	222	57°C	16
	Reverso: TTCCCTGACAATGATGTTGAGC			17
Éxon 6	Para frente: TACAGCTCAGAGTTTTGAGGAGTCT	408	57°C	18
	Reverso: CACTAAGTTACGAGGGACACTGTTT			19
Intervalo de íntron 6 e éxon 7	Para frente: TGAAAACCTGGAAAATCTCTCTA	736	57°C	20
	Reverso: AACAGCTTCCGGTATTGAGACCT			21

Iniciadores foram projetados para se dirigirem à região de promotor e a todas as regiões codificantes, a fim de selecionarem polimorfismos genéticos no gene TFAM bovino (Tabela 1). Quatro conjuntos de ADN foram formados, um a partir de todos os seis touros F_1 , um a partir de 30 fêmeas ancestrais F_1 selecionadas aleatoriamente, um a partir de 30 progenias de elevada marmorização de F_2 e um a partir de 30 progenias de baixa marmorização de F_2 . Os produtos de PCR para cada par de iniciadores foram amplificados nesses quatro conjuntos de ADN e seqüenciados de maneira direta em seqüenciador ABI 3730, conforme descrito acima. Polimorfismos de nucleotídeos foram identificados por comparação de padrões de seqüência entre esses quatro conjuntos de ADN. Infelizmente, nenhum polimorfismo foi detectado nas seqüências codificantes, mas, dois SNPs, isto é, substituição C/A e substituição C/T, foram encontrados na região de promotor de TFAM bovino.

Esses dois SNPs na região de promotor bovino tiveram, então, seu genótipo tipificado em animais F_2 de Wagyu x Limousin, que tenham tanto amostras de ADN quanto dados de desempenho para classificação de marmorização e medições de SFD. Usando a abordagem por PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), essas duas mutações foram reveladas por digestão à 37°C durante três horas de

amplicons de PCR com 2 U de *HaeIII* para a substituição C/A e com 2 U de *DpnI* para a substituição C/T, seguida por análise em géis de agarose à 4%. Os dados fenotípicos relativos às classificações de marmorização e medições de SFD foram ajustados para efeitos de ano de nascimento, gênero e idade de coleta (linear) antes de se avaliar os efeitos dos genótipos usando o procedimento de GLM (modelo linear geral) de SAS v9.1 (SAS Institute, Inc., Gary, NC) para avaliar os efeitos de grupo contemporâneo e de genótipo no *locus* de gene TFAM.

As buscas BLAST, usando o cADN de TFAM humano (NM_003201) como uma referência, recuperaram oito seqüências de EST ortólogas bovinas a partir do banco de dados ESTs_others no National Center for Biotechnology Informatics (NCBI) e três contíguos genômicos a partir da montagem de genoma 3X de gado bovino no Baylor College Medicine. Três ESTs (DN286575, DN285251 e CN793484) foram escolhidos para formar uma seqüência de cADN de consenso inicial do gene de TFAM bovino, mas, eles deixaram um intervalo no 3'UTR (região não traduzida) (Figura 1). No entanto, o alinhamento inicial dessas seqüências de EST com a seqüência de ADN genômico revelou que o intervalo de seqüência de cADN poderia ser facilmente fechado usando a seqüência de ADN genômica correspondendo à região de 3'UTR.

O comprimento total da sequência de mRNA montada é de 1129 pb para o gene TFAM bovino. Os *contigs* de ADN genômico (contig45319, contig729099 e contig138856) aparentemente não tiveram superposição. A orientação desses três *contigs* 5 genômicos para uma direção 5'-3', correspondendo à sequência de mRNA tornou impossível projetar iniciadores para fechar dois intervalos entre eles (Figura 1). Dois produtos de PCR de 222 pb e 736 pb (Tabela 1) foram amplificados e sequenciados. A montagem dos três *contigs* 10 genômicos e desses dois produtos de PCR tornou possível formar uma sequência de ADN genômica de 16666 pb para o gene de TFAM bovino (Figura 1).

Todos os oito ESTs, que eram ortólogos ao gene TFAM humano, são 99 - 100% idênticos à sequência de mRNA de 15 consenso montada. A sequência codificante completa putativa do gene TFAM bovino é de 741 pb de comprimento, a qual é idêntica àquela no ser humano (NM_003201, D'Errico et al, Gene 362, 125-132 (2005)), porém, 6 pb e 9 pb mais longa do que aquele em rato (NM_031326, Piantadosi e Suliman, J. 20 Biol. Chem. 281 (1), 324-333 (2006)) e em camundongo (NM_009360, Noack et al., Biochim. Biophys. Acta 1760 (2), 141-150 (2006)), e 48 pb mais curta do que aquela em galinha (NM_204100, Caldwell et al., Genome Biol. 6 (1), R6 (2005)), respectivamente. A sequência de aminoácidos

traduzida, codificada pelo gene TFAM bovino, mostrou 91% de identidade com porco (AY923074), 71% com ser humano (NM_003201), 65% com rato (NM_031326), 63% com camundongo (NM_009360) e 43% com galinha (NM_204100), respectivamente.

5 A estrutura global do gene TFAM bovino foi determinada por comparação da sequência de ADN genômica com a sequência de cADN completa determinada no estudo (Figura 1). Como aquela no ser humano, camundongo, rato e galinha, a organização genômica do gene TFAM bovino consiste em sete éxons e seis
10 introns (Figura 1).

Estima-se que o genoma bovino seja similar em tamanho aos genomas de seres humanos e de outros mamíferos, contendo aproximadamente 3 bilhões de pares de bases de ADN. O seqüenciamento do genoma bovino começou em dezembro
15 de 2003 e a montagem inicial baseada em cobertura de 3,3 vezes do genoma bovino foi liberada em 06 de outubro de 2004, a qual pode ser agora acessada por meio do GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) no NCBI. Além disso, mais do que 500.000 ESTs bovinos também foram liberados ao público e
20 podem ser acessados por meio do GenBank no NCBI. Tanto ESTs bovinos quanto seqüências de genoma nos fornecem valiosos recursos para revolucionar a pesquisa de genoma em gado bovino. Na presente patente, uma ferramenta que combine uma abordagem por clonagem comparativa *in silico* com uma

abordagem por clonagem alvo de PCR foi desenvolvida e usada para clonar seqüências tanto de cADN quanto de ADN genômica do gene TFAM bovino. Essa abordagem é muito direta, simples, rápida e barata. Portanto, essa abordagem pode servir como uma das ferramentas modelo em identificação, mapeamento e entendimento da função de genes em gado bovino, que avançarão adicionalmente a pesquisa em biologia básica.

A Figura 2 mostra as seqüências de nucleotídeos para a região à montante de 5' e o éxon 1 completo do gene TFAM bovino. Análise usando o programa MatInspector (Quandt et al., 1995) revelou um sítio de ligação ao fator 1 respiratório nuclear (NRF1) potencial e um sítio de ligação à proteína 1 de estimulação (SP1) na região de promotor de TFAM bovino (Figura 2). No entanto, o promotor de TFAM bovino carece de sítios de ligação putativos para fator 2 de respiração nuclear (NRF2). Na região de promotor de TFAM humano, os sítios de ligação tanto a NRF1 quanto a NRF2 foram encontrados, enquanto que somente sítios de ligação a NRF2 em promotores de TFAM de rato e de camundongo (Scarpulla, 2002). Além dos sítios de ligação ao NRF1 a à SP1, o promotor de TFAM bovino contém um sítio de ligação a repressor transcricional, que se liga a elementos encontrados predominantemente em genes que participam do

metabolismo de lipídeos (Figura 2). Embora não esteja claro se as ilhas CpG estão metiladas *in vivo*, muitos *loci* de CpG metilados potenciais estão presentes no promotor de TFAM bovino (Figura 2).

5 De maneira muito interessante, o promotor de TFAM bovino pode ser um dos poucos promotores que contêm códon AUG que ocorre naturalmente à montante do sítio de início de tradução normal (Figura 2). Esse códon AUG extra foi também confirmado por seqüenciamento com iniciadores

10 compreendendo promotor parcial, éxon 1 inteiro w íntron 1 parcial (ver a descrição abaixo) no relatório descritivo. A regra geral de Kozak é que, na maioria dos casos, o códon AUG mais próximo da extremidade 5' é o único sítio de iniciação de tradução, porque esse "efeito positivo" é

15 visto em casos nos quais uma mutação cria um códon AUG à montante do sítio de início normal e a tradução se desloca para o sítio à montante (Kozak, 2002). Entretanto, essa primeira regra pode ser violada quando o triplete AUG proximal a 5' estiver seguido de maneira curta por um códon

20 de terminação, que torna possível o reinício em um códon AUG à jusante (Kozak, 1995). Observa-se que esse códon AUG extra, no promotor de TFAM bovino, não está na estrutura (Figura 2). Se ele traduziu, ele apenas geraria um peptídeo de 12 aminoácidos como MQWRFSGAYGAC (SEQ ID NO: 22). Se e

como esse triplete de AUG proximal a 5' interfere com a tradução normal permanece desconhecido. Portanto, o gene TFAM bovino seria um modelo de gene natural para a investigação de mecanismos envolvidos no início da tradução de genes mamíferos.

Um total de oito pares de iniciadores foram projetados e usados para selecionar polimorfismos genéticos no gene TFAM bovino. Um par de iniciadores tem por alvo a região de promotor, e os iniciadores restantes amplificam sete éxons com um par de iniciadores por éxon. No entanto, o último par de iniciadores foi usado tanto para fechamento de intervalo quanto para a amplificação de éxon 7 (Tabela 1). A fim de se ter cada região de éxon completamente amplificada e seqüenciada, pelo menos 100 pb de seqüências a partir de cada lado flanqueante foram incluídos nos produtos. Nenhum polimorfismo foi encontrado em todas as seqüências codificantes do gene TFAM bovino, embora a população de referência inclua duas raças de gado bovino criadas de maneira divergente: um Wagyu de origem asiática e um Limousin de origem européia, que têm características que são muito diferentes umas das outras. Todavia, dois SNPs foram detectados na região de promotor (Figura 2 e Figura 3). Esses dois SNPs estão localizados apenas a 9 pb de distância um do outro, uma substituição C/A e outra

substituição C/T. Amos os SNPs foram revelados por digestão com *Hae*III e *Dpn*I, respectivamente, em um fragmento de 801 pb (Figura 4).

Como o fragmento possui três sítios de restrição *Hae*III, a digestão fornece duas bandas invariáveis de 152 pb e 462 pb, e uma banda de 187 pb, que pode ser, dependendo do nucleotídeo na posição -1220 (Figura 2), clivada ulteriormente em duas bandas de 83 pb e 104 pb (Figura 4). Portanto, animais homozigotos com alelo A têm dois sítios de *Hae*III, e revelam, depois de digestão completa, três bandas: 152 pb, 187 pb e 462 pb, animais homozigotos com alelo C ganharam um sítio de *Hae*III adicional nessa posição e resultam quatro bandas (83 pb, 104 pb, 152 bp e 462 pb) depois de digestão completa. Entretanto, animais heterozigotos mostraram cinco bandas depois de digestão com *Hae*III (Figura 4). Esses dois sítios de *Hae*III comuns foram considerados como controles internos da digestão com enzima.

Em comparação, o fragmento contém quatro sítios de restrição de *Dnp*II, incluindo um sítio polimórfico. Portanto, a digestão com *Dpn*II fornece três bandas invariáveis de 55 pb, 68 pb e 135 pb, e três bandas polimórficas de 241 pb, 302 pb e 543 pb, respectivamente (Figura 4). Animais homozigotos com alelo T têm quatro

sítios de *DpnII*, e revelam, depois de digestão completa, cinco bandas: 55 pb, 68 pb, 135 pb, 214 pb e 302 pb, enquanto que animais homozigotos com alelo C perderam um sítio de *DpnII* na posição -1212 (Figura 2) e resultam em 5 quatro bandas (55 pb, 68 pb, 135 pb e 543 pb) depois de digestão completa. No entanto, animais heterozigotos mostraram seis bandas depois de digestão com *DpnII* (Figura 4). Esses três sítios de *DpnII* comuns também serviram como controles internos da digestão com enzima.

10 A tipificação de genótipo de 237 animais de F₂ para SNPs tanto de C/A quanto de C/T, revelou 75 animais homozigotos CC, 45 animais homozigotos AA e 117 animais heterozigotos CA, para o primeiro SNP, e 84 animais homozigotos CC, 33 animais homozigotos TT e 120 15 heterozigotos CT, para o último SNP (Tabela 2). Para a substituição C/A, as freqüências de alelo C e de alelo A na população eram 0,56 e 0,44, respectivamente. A freqüência de alelo C aumentaram ligeiramente para 0,61 para a substituição C/T. No entanto, ambas as distribuições de 20 genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise de modelo linear geral indicou claramente que o efeito do genótipo em cada SNP alcançou significado estatístico (para a substituição C/A, $P = 0,0019$ para classificação de marmorização e $P = 0,0200$ para medição de

SFD; e para a substituição C/T, $P = 0,0011$ para classificação de marmorização e $P = 0,0039$ para medição de SFD) (Tabela 2). Para a substituição C/A, o gado bovino como o genótipo homozigoto (CC) teve um adicional de 0,047 polegadas em gordura subcutânea e 0,482 de classificação de marmorização comparado aos homozigotos AA ($P < 0,05$). No entanto, as diferenças entre dois homozigotos CC e TT foram adicionalmente aumentadas para a substituição C/T. A espessura de gordura subcutânea era 0,073 polegadas mais espessa do que e a classificação de marmorização era 0,634 maior em gado bovino com o genótipo homozigoto (CC) do que os homozigotos TT ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Somente cinco haplótipos entre esses dois polimorfismos de promotor foram observados em animais F_2 Wagyu x Limousin, incluindo 75 CCCC, 108 CACT, 33 AATT, 12 AACT e 9 CACC, respectivamente. Devido a relativamente poucas amostras, ambos os haplótipos, AACT e CACC, foram excluídos de análise estatística ulterior. Conforme indicado na Tabela 2, haplótipo teve efeitos significativos sobre a marmorização e SFD na população de referência ($P = 0,0004$ para marmorização e $P = 0,0029$ para SFD). A classificação de marmorização era 0,655 diferente entre animais CCCC e AATT e 0,518 diferente entre animais CCCC e CACT ($P < 0,05$). Para medições de SFD, o gado bovino com

haplótipo CCCC teve um adicional de 0,079 e 0,073 polegadas em gordura subcutânea comparado aos animais CACT e AATT ($P < 0,05$), respectivamente. O haplótipo CCCC parece estar associado com um aumento da deposição de gordura corporal integral em gado bovino.

Tabela 2. Associações dos SNPs de promotor de TFAM bovino com marmorização e SFD em cruzamentos F_2 de Wagyu x Limousin*.

SNP	Genótipo	Nº de animais	Marmorização (class.)		SFD (pol.)	
			Média±SE	VP**	Média±SE	VP**
C/A	CC	75	6,245±0,115 ^a	0,0019	0,44, ±0,018 ^a	0,02
	CA	117	5,748±0,094 ^b		0,376±0,015 ^b	
	AA	45	5,763±0,147 ^b		0,394±0,023 ^b	
C/T	CC	84	6,220±0,108 ^a	0,0011	0,447±0,017 ^a	0,0039
	CT	120	5,822±0,091 ^b		0,375±0,015 ^b	
	TT	33	5,586±0,172 ^b		0,374±0,021 ^b	
Am	CCC	75	6,250±0,113 ^a	0,0004	0,444±0,0	0,00

SNP	Genótipo	N° de animais	Marmorização (class.)		SFD (pol.)	
			Média±SE	VP**	Média±SE	VP**
bos					18 ^a	29
	CACT	108	5,732±0,097 ^b		0,365±0,0 15 ^b	
	AATT	33	5,595±0,171 ^b		0,371±0,0 27 ^b	

*Médias dentro de uma coluna com diferentes sobrescritos são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

**VP = Valor P

Esforços prévios identificaram genes candidatos
 5 responsáveis por marmorização e/ou SFD em carne bovina.
 Barendse e colaboradores (1997) identificaram um
 polimorfismo TG5, que ocorre na região de promotor de 5' do
 gene de tiroglobulina (TG). Esse marcador tinha uma
 associação genotípica com a classificação de marmorização
 10 em gado bovino de alimentado há longo prazo. Leptina é uma
 proteína de 16 KDa produzida pelo gene de obesidade (ob).
 Mutações no gene de leptina (LEP) fazem com que a carne de
 gado bovino chegue ao peso de abate mais cedo e desenvolva
 mais marmorização na carcaça (Buchanan et al., 2002). Uma
 15 substituição K232A não conservativa no gene DGAT1
 (diacilglicerol O-aciltransferase) mostrou-se a afetar a

deposição de gordura intramuscular (marmorização) em carne bovina (Thaller et al. 2003). A tipificação de genótipo de um SNP no gene TG, uma mutação C/T no gene LEP e um polimorfismo A/C no gene DGAT1 também foram realizadas
5 nessa população de cruzamento Wagyu x Limousin (De et al., 2004 e Wu et al., 2005, no prelo). Análise de variância usando um modelo linear generalizado não mostrou quaisquer diferenças significativas entre os genótipos no gene LEP. No entanto, o gene DGAT1 teve um efeito aditivo
10 significativo em SFD ($P = 0,036$), enquanto que gene TG mostrou um efeito dominante sobre a marmorização que se aproximou de significado ($P = 0,061$).

De e colaboradores (2004) observaram que, no gene TG, as diferenças de genótipo entre homozigotos CC e TT eram
15 classificação de $-0,074 \pm 0,093$ para marmorização e de $-0,002 \pm 0,015$ polegadas para SFD ($P > 0,05$ para ambas as características), enquanto que no gene DGAT1, animais homozigotos AA eram superiores a animais homozigotos CC em
classificação de $0,092 \pm 0,095$ para marmorização ($P > 0,05$)
20 e de $0,032 \pm 0,015$ polegadas para SFD ($P < 0,05$), respectivamente. No gene LEP, as mesmas figuras para diferenças de genótipo entre animais CC e TT eram de classificação de $0,075 \pm 0,116$ para marmorização e de $0,019$

± 0,018 polegadas para SFD ($P > 0,05$ para ambas as características), respectivamente. Obviamente, estudos recentes sobre o gene TFAM bovino indicaram que as diferenças de genótipo entre dois homozigotos em cada
5 posição excederam quaisquer diferenças observadas nos genes TG, DGAT1 e LEP bovino, respectivamente. Em particular, as diferenças de genótipo entre homozigotos CC e TT no gene TFAM bovino são responsáveis pelo desvio padrão de 0,634 em marmorização e pelo desvio padrão de 0,402 em SFD, já que
10 esses animais F_2 Wagyu x Limousin tiveram um desvio padrão de 1 de classificação para marmorização e um desvio padrão de 0,18 polegadas para SFD. Portanto, esses quatro genes candidatos estudados tão amplamente na população de referência, os resultados mostraram que o gene TFAM teve os
15 maiores efeitos tanto sobre marmorização quanto sobre SFD, indicando um gene importante para ambas as características.

Uma busca por elementos reguladores transcricionais usando o programa MatInspector (<http://www.gsf.de/>) indicou que ambos os SNPs no promotor de TFAM bovino, conjuntamente
20 ou separadamente, conduzem a um ganho / perda de seis sítios de ligação putativos para 1), heterodímero de tal-1alfa/E47; 2), proteína 1 de ligação a elemento que responde a cAMP; 3), heterodímeros dos fatores de transcrição de bHLH HAND2 (Thing2) e E12; 4), fator nuclear

1; 5), receptor de órfão relacionado a RAR alfa 1 e 6), proteína de dedo de zinco RP58 (ZNF238), que está associada de maneira preferencial com heterocromatina. Reusch e Klemm (2002) relataram que a proteína de ligação a elemento de resposta a cAMP de fator de transcrição (CREB) participa de adipogênese, com formas constitutivamente ativas de CREB induzindo a diferenciação de adipócitos e formas negativas dominantes de CREB bloqueando esse processo. Evidência mostrou que o fator nuclear 1 é essencial para a expressão de gene de estearoil-CoA desaturase 1 durante a diferenciação de pré-adipócitos (Singh e Ntambi, 1998). O receptor órfão relacionado à RAR alfa 1, ou ROR α 1, forma uma parte dos mecanismos reguladores multifuncionais que controlam a expressão do gene PPARG γ , que tem sido extensivamente estudado durante a década passada principalmente devido a seu papel central na promoção e na manutenção do fenótipo de adipócito (Sundcold e Lien, 2001). Entretanto, como esses dois SNPs no promotor de TFAM bovino afetam a eficiência de ligação para esses genes, como essas alterações de ligação regulam os padrões de expressão de gene TFAM subsequentes e como esses padrões de expressão estimulam a biogênese mitocondrial de maneira diferente e, portanto, conduzem às diferenças em deposição de gordura e metabolismos de energia, necessita ser

adicionalmente explorado.

Referências:

Alam et al. Nucleic Acids Res. 2003; 31:1640-5.

Barendse, 1997. Pedido de patente de número WO9923248

5 PCT/AU98/00882.

Buchanan et al. Genet Sel Evol. 2002; 34:105-16.

De et al. Proceedings, Western Section, American
Society of Animal Science. 2004; 55:95-98.

Ekstrand et al. Hum MoI Genet. 2004; 13:935-44.

10 Fisher e Clayton, Mol Cell Biol. 1988; 8:3496-509.

Garstka et al. Nucleic Acids Res. 2003; 31:5039-47.

Gaspari et al. 2004; 1659:148-52.

Kanki et al. Mol Cell Biol. 2004; 24:9823-34.

Kanki et al. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1011 :61-8.

15 Kozak, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:2662-6.

Kozak, Gene. 2002; 299:1-34.

Owen et al. J Biol Chem. 2002; 277:30409-12.

Quandt et al. Nucleic Acids Res. 1995; 23:4878-84.

Reichert e Neupert, Trends Genet. 2004; 20:555-62.

20 Reusch e Klemm, 2002, J Biol Chem. 277, 1426-1432.

Savell et al. (1986) Journal of Food Science 51, 838.

Scarpulla, 2002. Biochim. Biophys. Acta. 1576: 1-14.

Singh e Ntambi, 1998. Biochim Biophys Acta 1398, 148-

156.

Sundvold e Lien, 2001. Biochem Biophys Res Commun. 287, 383-390.

Thaller et al. Anim Genet. 2003 Oct;34(5):354-7

Wilson-Fritch et al. Mol Cell Biol. 2003; 23:1085-94.

5 Wilson-Fritch et al. J Clin Invest. 2004; 114:1281-9.

Wu et al. Genetica. 2005 Sep;125(1):103-13.

Exemplo 2

Esse Exemplo descreve genes de transcrição mitocondrial codificados no núcleo basais e a qualidade de carne em gado bovino de corte.

Evidência mostrou que a maquinaria de transcrição mitocondrial basal dirige a biogênese mitocondrial e a expressão de gene, e, portanto, ela pode desempenhar um importante papel na deposição de gordura corporal e no metabolismo de energia. Aqui, os inventores relatam compilação de seqüências, desenvolvimento de marcador genético e análise por associação de genes TFAM, TFB1M e TFB2M com marmorização e profundidade de gordura subcutânea (SFD) em gado bovino usando uma população de referência de cruzamentos F₂ de Wagyu x Limousin. Análise estatística revelou que o gene TFAM bovino estava associado de maneira significativa com a marmorização ($F = 3,84$, $P = 0,0229$) e SFD ($F = 3,56$, $P = 0,0301$). Os marcadores genéticos desenvolvidos no estudo podem ser usados para determinar

ulteriormente como esse complexo mitocondrial é importante para aperfeiçoar a qualidade de carne na indústria de carne bovina.

Devido à sua limitada capacidade de codificação de
5 proteína, a iniciação e a regulação de expressão de gene em
ADN mitocondrial (mtADN) se baseia fortemente em um
conjunto relativamente pequeno de proteínas reguladoras
mitocondriais codificadas no núcleo (Gleyzer et al., 2005).
A maquinaria de transcrição mitocondrial básica consiste em
10 ARN polimerase mitocondrial (POLRMT) e em fator A de
transcrição mitocondrial (TFAM), fator B1 de transcrição
mitocondrial (TFB1M) e fator B2 de transcrição mitocondrial
(TFB2M). TFAM, um membro de um grupo de famílias de
proteínas de elevada mobilidade e o fator de transcrição
15 mitocondrial identificado pela primeira vez (Fisher e
Clayton, 1988). Tanto TFB1M quanto TFB2M são fatores de
transcrição mitocondrial recém identificados e eles
interagem diretamente com POLRMT para formar um
heterodímero (Falkenberg et al., 2002). Por outro lado,
20 mitocôndrias realizam um grande número de reações em
células eucarióticas, incluindo a β -oxidação de ácidos
graxos, que fornece intermediários chave para a síntese de
triglicerídeos via a ação de piruvato descarboxilase (Owen
et al., 2002). Uma vez que a maquinaria de transcrição

mitocondrial básica dirige a biogênese mitocondrial e a expressão de genes, vislumbrou-se que a maquinaria pode desempenhar um importante papel na deposição de gordura corporal e no metabolismo de energia. Aqui, a compilação de 5 seqüências, o desenvolvimento de marcador genético e a análise por associação de genes TFAM, TFB1M e TFB2M com marmorização e profundidade de gordura subcutânea (SDF), usando uma população de referência de cruzamentos F₂ de Wagyu x Limousin, são relatados.

10 Os procedimentos de bioinformática usados para recuperar seqüências tanto de cADN quanto de ADN genômica desses três genes bovinos empregou uma abordagem de três etapas. Primeiro, seqüências de cADN dos ortólogos humanos foram usadas como referências para recuperar os ESTs 15 ortólogos em face do banco de dados do GenBank "est_others" com uma opinião de espécie limitada a *Bos taurus*. Segundo, vários ESTs foram escolhidos e montados para formar uma seqüência de cADN primária para cada gene de gado bovino, que, então, foi usada para realizar uma busca de ESTs 20 específica quanto à espécie em face do mesmo banco de dados, a fim de expandir a seqüência primária para uma seqüência de cADN de comprimento completo. Finalmente, a seqüência de cADN de comprimento completo foi usada para procurar por seqüências de ADN genômicas do mesmo gene em

face do banco de dados de seqüências de genoma bovino 6X e, portanto, determinar a sua organização genômica.

Iniciadores foram projetados para atingirem regiões de promotor e todos os éxons codificantes para os três genes
5 bovinos, com base nas seqüências de ADN genômicas. Para se assegurar que cada região de éxon fosse completamente amplificada e seqüenciada, pelo menos 100 pb de seqüências flanqueantes foram incluídas nos produtos. Para facilitar a descoberta de polimorfismos genéticos nesses genes, dois
10 conjuntos de ADN foram formados: um a partir de 6 ancestrais machos (*sires*) de F₁ de Wagyu x Limousin e um a partir de 113 ancestrais fêmeas (*dams*) de F₁ de Wagyu x Limousin. As reações de PCR foram realizadas nesses dois conjuntos de ADN e seqüenciados em um seqüenciador ABI 3730
15 no Laboratory for Biotechnology and Bioanalysis (Washington State University), usando um protocolo padrão. Polimorfismos de nucleotídeos foram identificados por comparação de padrões de seqüências entre esses dois conjuntos de ADN. Um total de dez polimorfismos de um único
20 nucleotídeo (SNPs) foram detectados, incluindo 3 no gene TFAM, 2 no gene TFB1M e 5 no gene TFB2M.

Somente um SNP no gene TFAM, dois SNPs no gene TFB1M e um SNP no gene TFB2M bovino foram escolhidos para a tipificação de genótipo usando técnicas de CR-RFLP e Bi-

PASA. Os animais usados no estudo foram progenia F_2 a partir de cruzamento entre si de 6 ancestrais machos de F_1 de Wagyu x Limousin e 113 ancestrais fêmeas de F_1 de Wagyu x Limousin, conforme descritos acima. As classificações de marmorização variaram desde 4 = Leve⁰ a 9,5 = Moderadamente Abundante⁵⁰ (DP = 1,00). A SFD foi medida na interface das 12^a e 13^a costelas perpendicular à superfície externa, em um ponto a três quartos do comprimento do músculo *longissimus* a partir de sua extremidade de osso lombar, a qual variou desde 0,1 a 1,3 polegadas (DP = 0,18) nessa população de F_2 . Os dados fenotípicos para classificações de marmorização e SFD foram analisados com um modelo linear misto usando o módulo PROC MIXED em SAS v9.1. A fonte de variação incluiu ano de nascimento, gênero, idade na coleta e genótipo de cada marcador de gene, já que efeitos fixos e um efeito aleatório são responsáveis por antecedentes de poligenes. A estrutura de covariância do efeito de poligenes foi definida por um relacionamento numérico calculado a partir de *pedigree* usando a macro de SAS LORG. O efeito residual foi assumido a ter distribuição independente idêntica com variância desconhecida. Os componentes de variância genética aditiva e de variância residual foram estimados usando o algoritmo de Newton-Raphson estabilizado em cadeia para a estimativa de

probabilidade máxima restrita (REML). Testes de efeitos de marcador foram realizados usando o método de Kenward-Roger para o cálculo de graus de liberdade de denominador. Esse método usa um estimador ajustado de matriz de covariância para reduzir tendência de amostra pequena. Comparações aos pares de médias de mínimos quadrados foram realizadas usando o procedimento de teste t de diferença significativa mínima (LSD) protegida de Fisher.

A busca BLAST com base em ortólogos humanos recuperou mais do que 20 ESTs para cada um dos genes bovinos TFAM, TFB1M e TFB2M, a partir do banco de dados de GenBank "est_others". Vários ESTs que se sobrepõe foram escolhidos e montados para formar seqüências de cADN primárias para esses genes. A seqüência de cADN primária foi, então, usada como uma referência para procurar por ESTs do mesmo gene, em particular para sua expansão de seqüência flanqueando 5' e 3', que foram perdidos pela busca de ortólogos humanos devido à baixa similaridade de seqüências nestas regiões. A montagem final produziu uma seqüência de cADN de comprimento completo de 2259 pb para o gene bovino TFAM, de 2617 pb para o gene bovino TFB1M e de 1991 bp para o gene bovino TFB2M, respectivamente. Usando essas seqüências de cADN de comprimento completo como referências, buscas BLAST em face do banco de dados de seqüências de genoma de gado

bovino 6X recuperaram três *contigs* genômicos de 16666 pb para TFAM, quatro *contigs* genômicos de 108966 pb para TFB1M e um *contig* genômico de 53542 pb para TFB2M, respectivamente. Como no ser humano, cão, camundongo e
5 rato, os genes bovinos tanto TFAM quanto TFB1M consistem em sete éxons, enquanto que o gene bovino TFB2M contém oito éxons.

Além de dois SNPs de A/C e C/T ligados de maneira próxima, descritos no Exemplo 1, uma terceira mutação com
10 uma transição de C/T foi também detectada na região de promotor de TFAM bovino (Figura 5A). Um ensaio de Bi-PASA foi desenvolvido para tipificar o genótipo desse marcador em indivíduos. O seqüenciamento direto de produtos de PCR em dois conjuntos de ADN revelou duas mutações no gene
15 TFB1M (Figura 5B) e cinco mutações no gene TFB2M (Figura 5C), respectivamente. Os amplicons de PCR foram digeridos com 2 U de *MspI* e *BanI* para a tipificação de genótipo de SNPs de T/G e de G/C no gene TFB1M bovino. A tipificação de genótipo inicial de 48 amostras usando três dos cinco
20 polimorfismos no gene TFB2M bovino revelou que eles estão fixados em dois haplótipos. Portanto, somente um SNP foi escolhido para a tipificação de genótipo por digestão com enzima de restrição *AciI*.

A análise estatística revelou que o gene TFAM bovino

estava associado de maneira significativa com a marmorização ($F = 3,84$, $P = 0,0229$) e SFD ($F = 3,56$, $P = 0,0301$). Entretanto, nenhum dos marcadores tanto em TFB1M quanto em TFB2M afetaram as características medidas de maneira significativa ($F < 1,70$, $P > 0,1842$). O efeitos aditivo e de dominância de cada marcador foram estimados e estão listados na Tabela 3. Somente o efeito aditivo do gene TFAM bovino sobre a marmorização alcançou um nível significativo ($P = 0,0059$) e os efeitos aditivos do TFAM e TFB2M sobre SFD se aproximaram da significância ($P = 0,0651$ para TFAM e $P = 0,1118$ para TFB2M) (Tabela 3). Os resultados indicam que o envolvimento desses três genes na promoção da iniciação de transcrição do genoma mitocondrial pode ser específica quanto ao tecido ou relevante. Em outras palavras, TFAM contribuiu de maneira significativa tanto para a marmorização quanto para SFD, enquanto que TFB1M não teve efeito em qualquer característica. No entanto, TFB2M contribuiu mais para SFD, mas, quase nada para a marmorização.

Tabela 3. Efeito aditivo e de dominância dos marcadores bovinos TFAM, TFB1M e TFB2M sobre a marmorização e a SFD.

Efeito Genét.	Marmorização	SFD (polegadas)

Efeito Genét.	Marmorização			SFD (polegadas)		
	Estimativa± SE	t	Pr> t	Estimativa± SE	t	Pr> t
C/T no gene TFAM bovino						
Aditivo	- 0,384±0,138	-2,78	0,0059	- 0,036±0,019	-1,85	0,065 1
Dominância	0,117±0,088	1,27	0,2066	- 0,007±0,013	-0,56	0,578 0
G/T no gene TFB1M bovino						
Aditivo	- 0,206±0,160	-1,28	0,2003	- 0,007±0,022	-0,33	0,745 1
Dominância	-0,017±0,1	0,17	0,8646	- 0,003±0,014	-0,23	0,820 9
C/G no gene TFB1M bovino						
Aditivo	0,017±0,186	0,09	0,9273	- 0,005±0,026	-0,19	0,852 8
Dominância	0,074±0,118	0,63	0,5288	- 0,023±0,017	1,41	0,161 2
C/T no gene TFB2M bovino						
Aditivo	0,121±0,120	1	0,3188	- 0,028±0,018	1,6	0,111 8
Dominância	- 0,112±0,079	-1,41	0,1588	0±0,011	-0,03	0,979 8

Tanto a marmorização quanto SFD atraíram uma grande

quantidade de publicidade e de interesse durante muito anos, uma vez que elas são as duas principais características quantitativas que afetam a qualidade de carcaça e a eficiência de produção em gado bovino de corte.

5 Os marcadores genéticos desenvolvidos pelos inventores podem ser usados para determinar adicionalmente como esse complexo mitocondrial é importante para aperfeiçoar a qualidade de carne na indústria de carne bovina.

Referências:

- 10 Falkenberg et al. (2002) Nat Genet. 31:289-94.
 Fisher e Clayton (1988) Mol Cell Biol. 8:3496-3509.
 Gleyzer et al. (2005) Biochem Biophys Res Commun. 334:516-23.
 Owen et al. J Biol Chem. 2002 Aug 23;277(34):30409-12.

15 Exemplo 3

Esse Exemplo fornece associações entre marcadores TFAM-1, TFAM-2 e FABP4 e características de carcaça em novilhos e novilhas de parque de engorda comercial.

Os seguintes marcadores foram avaliados: (1) uma
 20 substituição de C por A na posição de nucleotídeo 1220 no promotor de gene de fator A de transcrição mitocondrial (TFAM-1), (2) uma substituição de C por T na posição de nucleotídeo 1212 no promotor TFAM-2 e (3) uma substituição de G por C na posição de nucleotídeo 7516 do gene de

proteína 4 de ligação a ácido graxo (FABP4). Resultados prévios indicam que os marcadores afetam a marmorização e a gordura dorsal.

Inicialmente, houve 1589 registros a partir de 5 novilhos e novilhas. O ponto final alvo era de 12,2 mm de gordura dorsal. A data de coleta foi o ponto final econômico ótimo previsto por animal. Grupos contemporâneos incluíram fonte e sexo. Assumiu-se que o tipo de raça se confundiu com a fonte. O conjunto de dados final incluiu o 10 número de registros com base em fenótipos e genótipos disponíveis para cada característica.

As características testadas são: peso de carcaça quente (HCW, lb), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por peso percentual de HCW (REA/cwt HCW, 15 in²/100 lb de peso de carcaça quente (HCW), valor de peso de carcaça quente (valor de HCW, \$), peso vivo calculado (Calc Lv Wt, lb), ingestão de matéria seca (DMI, lb), dias em ração (DOF, d), ingestão de matéria seca por dia em ração (DMI por DOF, lb/d), ganho diário médio (ADG, lb/d), 20 percentagem de tempero (DP, %), espessura de gordura dorsal (BFAT, in), grau de rendimento calculado (cYG), grau de qualidade, menor do que ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, < Se vs, > Ch), teor em gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de

marmorização (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em ração (MBS/DOF), valor de carcaça adicional (valor carc adicional, \$), retorno líquido ajustado -- todos os custos removidos (retorno líquido ajust. -- todos os custos removidos, \$) e retorno líquido ajustado -- valor animal inicial não removido (retorno líquido ajust, -- valor animal inicial não removido, \$).

Os modelos de análise eram genótipo, sendo que genótipos foram ajustados como efeitos fixados e aditivos ou substituição de alelo, que mostraram regressão em número de alelos (0, 1, 2). Ambos os modelos se ajustam com combinações de 2 marcadores. Outro modelo de análise é haplótipo, que mostra regressão em haplótipo (esperado) quando do ajuste de múltiplos marcadores TFAM. Associações de marcador único significativas são apresentadas na Tabela 4, e combinações de 2 marcadores significativas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4: Análises de Marcador Único para TFAM-1, TFAM-2 & FABP4

Marcador	Caract.	N	Substituição de Alelos				Modelo				Genótipo fixado modelo				Genótipo			
			Estimativa	DP	Valor	P	Valor	P	Ad.	Est.	DP	Valor	P ad.	Dom	Est.	DP	Valor	P dom.
FABP4	QG Ch	1528	-0,065	0,019	0,0007	0,0027	-0,057	0,023	0,0156	0,020	0,030	0,5161						
	(1,2,5,9,20)																	
TFAM-1	REA/cwt HCW	1528	0,00016	0,00009	0,0558	0,0345	0,00027	0,00010	0,0102	0,00023	0,00013	0,0795						
	Calc Lv Wt	1539	10,629	3,578	0,0030	0,0122	10,794	3,731	0,0039	0,816	5,178	0,8748						
	P.Carc.Quente	1539	5,929	2,402	0,0137	0,0478	5,894	2,504	0,0187	-0,172	3,476	0,9606						
	Valor HCW	1539	0,274	0,192	0,1535	0,0073	0,432	0,200	0,0308	0,776	0,277	0,0052						
	Class. Marm.	1125	0,906	0,358	0,0115	0,0354	0,962	0,373	0,0099	0,281	0,516	0,5865						
TFAM-2	MBS/DOF	1125	0,006	0,003	0,0452	0,0892	0,007	0,003	0,0296	0,004	0,004	0,3641						
	Calc Lv Wt	1503	-9,607	3,590	0,0075	0,0099	-10,145	3,608	0,0050	-7,321	5,070	0,1490						
	P.Carc.Quente	1503	-5,931	2,418	0,0143	0,0270	-6,208	2,431	0,0107	-3,775	3,416	0,2693						
	Valor HCW	1503	-0,453	0,193	0,0191	0,0104	-0,415	0,194	0,0326	0,520	0,273	0,0567						
	Class. Marm.	1097	-0,845	0,366	0,0210	0,0557	-0,872	0,368	0,0179	-0,345	0,512	0,5005						

		Modelo										
		Substituição de Alelos					Genótipo fixado modelo					Genótipo
Área Filé	1503	-0,142	0,058	0,0139	0,0439	-0,139	0,058	0,0165	0,037	0,082	0,6503	

Costela

Ajuste de marcadores para substituição de alelos: A para TFAM1; C para TFAM2 & FABP4

Faixa de classificações de marmorização a partir de 10 a 99; 10 = PD0 = Std. 99 = A90 = Iniciador

GG Ch(1,2,5,9,20) implica em Ch ou melhor - inclui Iniciador, Ch, CAB, *Sterling Silver* & *Angus Pride*;

Alternativa incluiu Se, No Roll, *Dark cutter* & *Hard boné*

Tabela 5: Análises com dois marcadores para TFAM-1, TFAM-2 & FABP4

				Substituição de Alelos				Modelo				Genótipo				
		Marcador 1		Marcador 2				Marcadores 1*2				Marcador 1		Marcador 2		
Marcador 1	Marcador 2	Caract.	N	Estimativa	DP	Valor P	Estimativa	DP	Valor P	Estimativa	DP	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P	
TFAM-1	FABP4	Adj NR w/o	1526	-1.383	4.007	.7300	-.416	3.786	.9124	5.003	.9013	.4996	.2159	.0404		
		Calc LV Wt	1526	12.076	4.388	.0060	-4.194	4.146	.3119	5.478	.5691	.0153	.2933	.6539		
		Hot Carcass	1526	7.092	2.948	.0163	-2.672	2.785	.3374	3.680	.5435	.0393	.1629	.5571		
		Wt														
		IME%	377	-.046	.078	.5526	-.056	.072	.4345	.095	.6598	.4765	.9997	.0372		
		MBS/DOF	1117	.007	.003	.0299	-.001	.003	.8048	.004	.4059	.0426	.8568	.6798		
		Marbling	1117	1.069	.429	.0128	-.334	.408	.4140	-.317	.543	.5594	.0282	.4454	.8402	
		score														
		QG	1526	-.004	.021	.8403	-.072	.020	.0003	.034	.026	.2028	.6912	.0016	.6534	
		Ch(1,2,5,9,20)														
TFAM-1	TFAM-2	Adj NR w/o	1501	8.151	5.602	.1459	11.913	5.791	.0398	-2.564	5.312	.6294	.1528	.0868	.3998	
		init val														
		DMI	1501	22.819	25.853	.3776	-2.520	26.725	.9249	-12.727	24.514	.6037	.0152	.0230	.0388	
		DMI/DOF	1501	.208	.179	.2457	.034	.185	.8555	-.022	.170	.8989	.0142	.0171	.0479	
		HCW Value	1501	-.466	.328	.1561	-.928	.339	.0058	.650	.311	.0368	.3637	.9102	.6043	
		QG	1501	-.042	.030	.1558	-.066	.031	.0302	.033	.028	.2388	.2871	.5127	.2949	
		Ch(1,2,5,9,20)														
		YG	1434	.080	.039	.0019	.059	.041	.1481	-.040	.037	.2760	.4031	.5462	.7033	
		Calc LV Wt	1495	-11.350	4.367	.0094	-5.556	4.050	.1703	4.329	5.306	.6147	.0113	.1017	.6175	
		DOF	1495	-.381	.475	.7010	-.672	.441	.1274	.209	.577	.7175	.9786	.0398	.0189	
TFAM-2	FABP4	Hot Carcass	1495	-6.424	2.943	.0292	-3.431	2.729	.2690	1.235	3.576	.7299	.0530	.0614	.8073	
		Wt														
		Marbling	1093	-.990	.433	.0223	-.372	.403	.3568	.311	.529	.5568	.0726	.8003	.0134	
		score														
		QG	1495	-.017	.021	.4248	-.053	.020	.0014	-.025	.026	.3308	.8411	.0051	.2986	
		Ch(1,2,5,9,20)														
		REA/cwt HCW	1495	-.00002	.00009	.8546	.00018	.00009	.0385	-.00011	.00011	.3377	.8702	.0523	.2467	

Ajuste de marcadores para substituição de alelos: A para TFAM1; C para TFAM2 & FABP4

Faixa de classificações de marmorização a partir de 10 a 99; 10 = PD0 = Std. 99 = A90 = Iniciador

GG Ch(1,2,5,9,20) implica em Ch ou melhor - inclui Iniciador, Ch, CAB, *Sterling Silver & Angus Pride*;

Alternativa incluiu *Se, No Roll, Dark cutter & Hard boné*

Exemplo 4

5 A Figura 7 mostra um fluxograma da entrada de dados e da saída de resultados a partir da análise e da correlação dos dados pertinentes à criação, aos históricos veterinários e às exigências de desempenho de um grupo de animais, tais como a partir de bovinos. O fluxograma
10 ilustrado na Figura 7 indica adicionalmente o fluxo interativo de dados a partir do dispositivo auxiliado por computador para um corpo de estudantes aprendendo a usar o método da invenção e a correlação de tais dados interativos para apresentar uma saída como um diagrama de torta
15 indicando o progresso da classe. O fluxograma indica adicionalmente as modificações do método da invenção de acordo com as informações recebidas dos estudantes para avançar o processo de ensinamento ou otimizar o método para satisfazer às necessidades dos estudantes.

20 A Figura 8 ilustra os relacionamentos potenciais entre os elementos de dados a serem alimentados ao sistema. Flechas unidirecionais indicam, por exemplo, que um estábulo tipicamente pertence a uma única fazenda, enquanto que uma fazenda pode ser dona de vários estábulos.

Similarmente, uma prescrição pode incluir produtos veterinários.

A Figura 9A ilustra o fluxo de eventos no uso do sistema baseado em computador portátil para a entrada de dados sobre a criação e manutenção de um rebanho de vacas.

A Figura 9B ilustra o fluxo de eventos através das subrotinas relacionadas à entrada de dados que dizem respeito ao gerenciamento da fazenda.

A Figura 9C ilustra o fluxo de eventos através das subrotinas relacionadas à entrada de dados que dizem respeito aos dados específicos de uma companhia.

A Figura 10 ilustra um fluxograma da entrada de dados e da saída de resultados a partir da análise e da correlação dos dados pertinentes à criação, aos históricos veterinários e às exigências de desempenho de um grupo de animais.

A invenção é adicionalmente descrita pelos seguintes parágrafos numerados:

1. Um método para o subgrupamento de animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um polimorfismo similar em um gene de fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM"), compreendendo:

(a) a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de polimorfismo de

um único nucleotídeo no gene TFAM, e

(b) a segregação de animais individuais em subgrupos, sendo que cada animal em um subgrupo tem um polimorfismo similar no gene TFAM.

5 2. Um método para o subgrupamento de animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um polimorfismo similar no gene TFAM, compreendendo:

(a) a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de polimorfismo(s)
10 de um único nucleotídeo de interesse no gene TFAM, e

(b) a segregação de animais individuais em subgrupos dependendo de se os animais têm, ou não têm, o(s) polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse no gene TFAM.

15 3. O método, de acordo com os parágrafos 1 ou 2, no qual o(s) polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse é(são) selecionado(s) a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, em uma
20 substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e em uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

4. O método para o subgrupamento de animais de acordo com o genótipo, no qual os animais de cada subgrupo têm um

genótipo similar no gene TFAM compreendendo:

(a) a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, de uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e de uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM, e

(b) a segregação de animais individuais em subgrupos dependendo de se os animais têm, ou não têm, uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

5. Um método para a identificação de um animal tendo um fenótipo desejável quando comparado à população geral de animais daquela espécie, compreendendo a determinação da presença de polimorfismo de um único nucleotídeo no gene TFAM do animal, sendo que o polimorfismo é selecionado a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, em uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e em uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene TFAM, polimorfismo de um único nucleotídeo é indicativo de um fenótipo desejável.

6. O método, de acordo com o parágrafo 5, no qual o fenótipo desejável é ingestão de ração animal, taxa de crescimento, peso corporal, mérito e composição de carcaça, rendimento em leite ou uma combinações destes.

5 7. O método, de acordo com os parágrafos 5 ou 6, no qual o fenótipo desejável é valor de carcaça adicional (valor carc adicional, \$), ganho diário médio (ADG, lb/d), espessura de gordura dorsal (BFAT, in), peso vivo calculado (Calc Lv Wt, lb), grau de rendimento calculado (cYG), dias
10 em ração (DOF, d), percentagem de tempero (DP, %), ingestão de matéria seca (DMI, lb), ingestão de matéria seca por dia em ração (DMI por DOF, lb/d), peso de carcaça quente (HCW, lb), valor de peso de carcaça quente (valor HCV, \$), teor em gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de
15 marmorização (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em ração (MBS/DOF), grau de qualidade, menor do que ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, <Sc vs,> Ch), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por peso percentual HCW
20 (REA/cwt HCW, in²/100 lb peso de carcaça quente (HCW), profundidade de gordura subcutânea (SFD) ou qualquer combinação destes.

8. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 7, no qual o animal é um bovino.

9. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, no qual o gene TFAM de um gene TFAM bovino.

10. Um método auxiliado por computador interativo para o rastreamento de criação de animais de criação bovinos, compreendendo o uso de um sistema de computador compreendendo um computador programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um dispositivo de entrada, um dispositivo de saída e um dispositivo interativo, as etapas de: (a) entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um histórico de criação de um bovino ou rebanho de bovinos, (b) entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um histórico veterinário de um bovino ou rebanho de bovinos, (c) a correlação dos dados veterinários com o histórico de criação do bovino ou rebanho de bovinos usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, e (d) a saída, para o dispositivo de saída, do histórico de criação e do histórico veterinário do bovino ou rebanho de bovinos.

11. O método, de acordo com o parágrafo 10, no qual o sistema de computador é um sistema interativo, por meio do qual modificações para a saída do método auxiliado por computador podem ser correlacionadas de acordo com a

entrada a partir do dispositivo interativo.

12. O método, de acordo com o parágrafo 10 ou 11, compreendendo adicionalmente as etapas de entrada no computador programado de dados diagnósticos relacionados à
5 saúde da vaca ou rebanho de vacas; e a correlação dos dados diagnósticos aos históricos de criação e veterinário da vaca ou rebanho de vacas.

13. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 12, no qual os dados veterinários compreendem um
10 registro de vacinação para uma vaca ou rebanho de vacas.

14. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 13, no qual os dados de saúde são selecionados a partir do grupo consistindo em dados de condição pecuária, histórico do rebanho e dados de segurança alimentar.

15. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 14, compreendendo adicionalmente pelo menos uma etapa adicional selecionada a partir do grupo consistindo em
15 entrada no computador programado de dados relacionados ao controle de qualidade do bovino ou rebanho de bovinos e a correlação dos dados de controle de qualidade aos
20 históricos de criação e veterinário da vaca ou rebanho de vacas, a entrada no computador programado de parâmetros de desempenho da vaca ou rebanho de vacas; e a correlação dos parâmetros de desempenho necessários do bovino ou rebanho

de bovinos a um requisito de desempenho específico de um cliente, a correlação dos dados de vacinação aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação do rebanho aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação de dados de segurança alimentar aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação de dados de condição pecuária aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a entrada no computador programado de dados relacionados aos dados nutricionais do bovino ou rebanho de bovinos; e a correlação dos dados nutricionais aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, e o alerta de mudanças indesejáveis nos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos.

16. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 15, compreendendo adicionalmente as etapas de entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um genótipo de um bovino; a correlação de uma característica física predita pelo genótipo usando o processador e o sistema de armazenamento de dados; e a saída, para o dispositivo de saída, da característica física correlacionada ao genótipo para um bovino ou população de bovinos, e a alimentação do(s) animal(is) com uma dieta baseada na característica física,

por meio do quê se aperfeiçoa a produção de bovinos.

17. O método auxiliado por computador, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 16, para otimizar a eficiência de parques de engorda para animais de criação compreendendo a saída, para o dispositivo de saída, dos históricos de criação e veterinário do bovino ou rebanho de bovinos e a alimentação do(s) animal(is) com uma dieta baseada em seus históricos de criação e veterinário, por meio do quê se otimiza a eficiência de parques de engorda para o bovino ou rebanho de bovinos.

18. Um método de transmissão de dados compreendendo a transmissão de informações, a partir dos métodos tais de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 16, selecionado a partir do grupo consistindo em telecomunicação, telefone, vídeo conferência, comunicação em massa, uma apresentação, uma apresentação em computador, uma apresentação em POWERPOINT™, internet, e-mail e comunicação por documentos.

19. Um sistema de computador interativo, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 16, para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de vacas, compreendendo dados de criação e veterinários correspondendo a um bovino ou rebanho de bovinos, e sendo que o sistema de computador é configurado para permitir a

seu operador trocar dados com o dispositivo ou um banco de dados remoto.

20. O sistema de computador interativo, de acordo com o parágrafo 19, no qual os dispositivos de entrada e de saída são um assistente digital pessoal ou um computador de bolso.

21. Um método de se fazer negócios para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de animais de criação, compreendendo dados de criação e veterinários correspondendo a um ou mais animais de criação, compreendendo o fornecimento, a um usuário, do sistema de computador de acordo com o parágrafo 19.

22. Um método de se fazer negócios para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de animais de criação, compreendendo dados de criação e veterinários correspondendo a um ou mais animais de criação, compreendendo o fornecimento, a um usuário, do sistema de computador de acordo com o parágrafo 20.

23. O método de se fazer negócios, de acordo com o parágrafo 21, compreendendo adicionalmente o fornecimento ao proprietário do animal ou ao cliente de equipamento de coleta de amostras, tais como bastonetes com algodão e etiquetas úteis para a coleta de amostras, a partir das quais dados genéticos possam ser obtidos, e sendo que as

etiquetas são opcionalmente embaladas em um recipiente que está codificado com indícios de identificação.

24. O método de se fazer negócios, de acordo com qualquer um dos parágrafos 10 a 16, no qual o sistema de computador compreende adicionalmente uma pluralidade de dispositivos interativos e sendo que o método compreende adicionalmente as etapas de recebimento de dados a partir dos dispositivos interativos, a compilação de dados, a saída de dados para indicar a resposta de um estudante ou classe de estudantes a uma pergunta com relação à operação do método auxiliado por computador, e opcionalmente a modificação da operação do método auxiliado por computador de acordo com a indicação da resposta.

25. O método, de acordo com qualquer um dos parágrafos 8 a 24, no qual os dados compreendem a presença ou a ausência de um ou mais polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse no gene TFAM.

26. O método, de acordo com o parágrafo 25, no qual o(s) polimorfismo(s) de um único nucleotídeo de interesse é selecionado a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição de nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, em uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e em uma substituição de T por C na posição -995 no promotor do gene

TFAM.

Portanto, tendo-se descrito em detalhes as concretizações preferidas da presente invenção, deve ser entendido que a invenção definida pelos parágrafos acima
5 não deve estar limitada aos detalhes em particular descritos no relatório descritivo acima, uma vez que muitas variações evidentes da mesma são possíveis sem se desviar do objeto ou do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a identificação de um animal tendo peso vivo calculado desejável (Calc Lv Wt, lb), grau de rendimento calculado (cYG), dias em alimentação (DOF, d), ingestão de matéria seca (DMI, lb), ingestão de matéria seca por dia em alimentação (DMI por DOF, lb/d), peso de carcaça fresca (HCW, lb), valor de peso de carcaça fresca (valor HCV, \$), teor de gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de marmorização (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em alimentação (MBS/DOF), grau de qualidade, menor ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, < Se vs, > Ch), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por cento de peso de HCW (REA/cwt HCW, in²/100 lb de peso de carcaça fresca (HCW), ou uma combinação destes quando comparado à população geral de animais daquela espécie **caracterizado pelo** fato de compreender a determinação da presença de um único polimorfismo de nucleotídeos em um gene de fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM"), a presença de um único polimorfismo de nucleotídeos no gene TFAM do animal, sendo que o único polimorfismo de nucleotídeos é indicativo de peso vivo calculado desejável (Calc Lv Wt, lb), grau de rendimento calculado (cYG), dias em alimentação (DOF, d), ingestão de matéria seca (DMI,

lb), ingestão de matéria seca por dia em alimentação (DMI por DOF, lb/d), peso de carcaça fresca (HCW, lb), valor de peso de carcaça fresca (valor HCV, \$), teor de gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de marmorização (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em alimentação (MBS/DOF), grau de qualidade, menor ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, < Se vs, > Ch), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por cento de peso de HCW (REA/cwt HCW, in²/100 lb de peso de carcaça fresca (HCW), ou uma combinação destes.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de compreender adicionalmente o subgrupamento de animais de acordo com o genótipo, sendo que os animais de cada subgrupo têm um polimorfismo similar no gene TFAM, o método compreendendo:

(a) a determinação do genótipo de cada animal a ser subgrupado por determinação da presença de um único polimorfismo de nucleotídeos no gene TFAM; e

(b) a segregação de animais individuais em subgrupos dependendo de se os animais têm, ou não têm o único polimorfismo de nucleotídeos de interesse no gene TFAM.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o(s) único(s) polimorfismo(s) de nucleotídeos de interesse é (são) selecionado(s) a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição do nucleotídeo -1220 no
5 promotor do gene TFAM, em uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e em uma substituição de T para C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1,
10 **caracterizado pelo** fato de que o animal é um bovino.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo de que o gene TFAM é um gene TFAM bovino.

6. Método auxiliado por computador interativo para o
15 rastreamento de criação animais domésticos bovinos **caracterizado pelo** fato de compreender o uso de um sistema de computador compreendendo um computador programado compreendendo um processador, um sistema de armazenamento de dados, um dispositivo de entrada, um dispositivo de
20 saída e um dispositivo interativo, as etapas de: (a) entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um histórico de criação de um bovino ou rebanho de bovinos e um genótipo de um bovino; a correlação de uma característica física prevista

pelo fenótipo, usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, (b) entrada no computador programado, por meio do dispositivo de entrada, de dados compreendendo um histórico veterinário de um bovino ou rebanho de bovinos, (c) a correlação dos dados veterinários com o histórico de criação do bovino ou rebanho de bovinos usando o processador e o sistema de armazenamento de dados, e (d) a saída, para o dispositivo de saída, do histórico de criação, do histórico veterinário do bovino ou rebanho de bovinos e da característica física correlacionada ao genótipo para um bovino ou população de bovinos,

sendo que a característica física é peso vivo calculado desejável (Calc Lv Wt, lb), grau de rendimento calculado (cYG), dias em alimentação (DOF, d), ingestão de matéria seca (DMI, lb), ingestão de matéria seca por dia em alimentação (DMI por DOF, lb/d), peso de carcaça fresca (HCW, lb), valor de peso de carcaça fresca (valor HCV, \$), teor de gordura intramuscular (IMF%, %), classificação de marmorização (MBS, 10 a 99), classificação de marmorização dividida por dias em alimentação (MBS/DOF), grau de qualidade, menor ou igual a selecionar versus maior do que ou igual a escolher (QG, < Se vs, > Ch), área de filé de costela (REA, in²), área de filé de costela por cento de peso de HCW (REA/cwt HCW, in²/100 lb de peso de carcaça

fresca (HCW), ou uma combinação destes, quando comparado à população geral de bovinos, e o fenótipo é um único polimorfismo de nucleotídeos em um gene TFAM.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6,
5 **caracterizado pelo** fato de que o sistema de computador é um sistema interativo por meio do qual modificações para a saída do método auxiliado por computador podem ser correlacionadas de acordo com a entrada a partir do dispositivo interativo.

10 8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de compreender adicionalmente as etapas de entrada no computador programado de dados diagnósticos relacionados à saúde da vaca ou rebanho de vacas e a correlação dos dados diagnósticos aos históricos
15 de criação e veterinário da vaca ou rebanho de vacas.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que os dados veterinários compreendem um registro de vacinação para uma vaca ou rebanho de vacas.

20 10. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que os dados de saúde são selecionados a partir do grupo consistindo em dados de condição pecuária, histórico do rebanho e dados de segurança alimentar.

11. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender pelo menos uma etapa adicional selecionada a partir do grupo consistindo em entrada no computador programado de dados relacionados ao controle de qualidade do bovino ou rebanho de bovinos e a correlação dos dados de controle de qualidade aos históricos de criação e veterinário da vaca ou rebanho de vacas, a entrada no computador programado de parâmetros de desempenho da vaca ou rebanho de vacas e a correlação dos parâmetros de desempenho necessários do bovino ou rebanho de bovinos a um requisito de desempenho específico de um cliente, a correlação dos dados de vacinação aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação do rebanho aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação de dados de segurança alimentar aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, a correlação de dados de condição pecuária aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, entrada no computador programado de dados relacionados aos dados nutricionais do bovino ou rebanho de bovinos; e a correlação dos dados nutricionais aos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos, e o alerta de mudanças indesejáveis nos parâmetros de desempenho do bovino ou rebanho de bovinos.

12. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que o(s) único(s) polimorfismo(s) de nucleotídeos de interesse é (são) selecionado(s) a partir do grupo consistindo em uma substituição de A por C na posição do nucleotídeo -1220 no promotor do gene TFAM, em uma substituição de T por C na posição -1212 no promotor do gene TFAM e em uma substituição de T para C na posição -995 no promotor do gene TFAM.

13. Método de transmissão de dados **caracterizado pelo** fato de compreender a transmissão de informações a partir dos métodos descritos na reivindicação 6, selecionado a partir do grupo consistindo em telecomunicação, telefone, vídeo-conferência, comunicação em massa, uma apresentação, uma apresentação em computador, uma apresentação em POWERPOINT™, internet, e-mail e comunicação por documentos.

14. Sistema de computador interativo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de servir para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de vacas, compreendendo dados de criação e veterinários correspondendo a um bovino ou rebanho de bovinos, e sendo que o sistema de computador é configurado para permitir a seu operador trocar dados com o dispositivo ou um banco de

dados remoto.

15. Sistema de computador interativo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de que os dispositivos de entrada e de saída são assistentes digitais pessoais ou computadores de bolso.

16. Método de realização de negócios para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de animais domésticos **caracterizado pelo** fato de compreender dados de criação e veterinários correspondendo a um ou mais animais domésticos, compreendendo o fornecimento do sistema de computador como descrito na reivindicação 14.

17. Método de realização de negócios para o rastreamento de históricos de criação e de bem-estar de animais domésticos **caracterizado pelo** fato de compreender dados de criação e veterinários correspondendo a um ou mais animais domésticos, compreendendo o fornecimento do sistema de computador como descrito na reivindicação 14.

18. O método de realização de negócios, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** fato de compreender adicionalmente o fornecimento, ao proprietário do animal ou ao cliente, de equipamento de coleta de amostras, tais como bastonetes com algodão e etiquetas úteis para a coleta de amostras, a partir das quais dados genéticos possam ser obtidos, e sendo que as etiquetas são opcionalmente

embaladas em um recipiente que está codificado com indícios de identificação.

19. Método de realização de negócios, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado pelo** fato de que o sistema de computador compreende adicionalmente uma pluralidade de dispositivos interativos e sendo que o método compreende adicionalmente as etapas de recebimento de dados a partir dos dispositivos interativos, a compilação de dados, a saída de dados para indicar a resposta de um estudante ou classe de estudantes a uma pergunta com relação à operação do método auxiliado por computador, e opcionalmente a modificação da operação do método auxiliado por computador de acordo com a indicação da resposta.

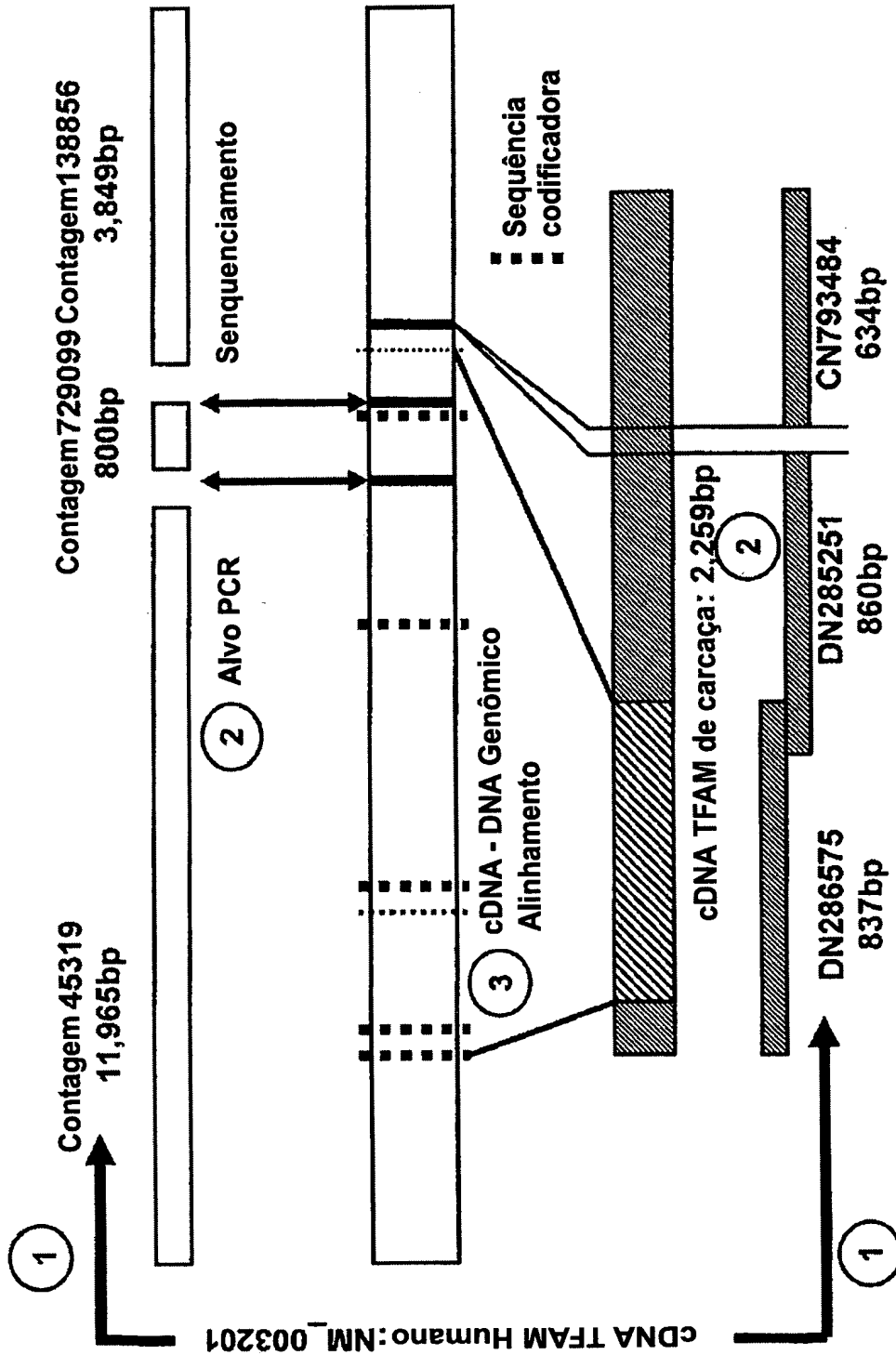


FIGURA 1

-1699 TAGATCAGATTTTATAAGAACTTTATAGCAAGGCTTATCAAATGACACTTTAAAACAACA
-1539 AAGACTTTAAATATTCAAAAAAATTTTTTATATCTATCAAACGCTCTGAAAGAATAAAAAAC
-1479 ACTCTAGAAAAATGTAAGAAAAAGTTGTTGCAGAAATCAGCTAAAATGTAATTATAAGGA
-1419 ATTCTATCCCATACTTTTAGCTTGACATTGTAGTGTAACCTGTTTCATTTCTTTGCCTCTGC
-1359 CACTAGACTTCATGGGCGGTGAAAAGAAGGCTGTGTTTTTATCTAAGTTTGTGGCCTTG
-1299 TACATAATGTGTACTCAGAAAATAATCAACAACAAAATCCAACCCTGTTTCTTCCATG
-1220 -1212

-1239 ACAGAGTGAGAGATTTGGACAGATGATCTAAAAGGTCCCTTTCAATACTGAGAATTTTTG
C C
-1179 AAAAGGAAGTGGTGATAGTTGCTTACCACCTAGAAGTGGGCTTGGTGGTCCGCACTCAACG
-1119 GGCCAGTGAAAGACTCTCAGCTCAATATGACACTAGTAAGAATTTTCTTACAAACCTATC
-1059 CAACAGAGAAAAAGCTGTTTCAGGAAGTGGCTCTTTGAAATAAATGGAACCTGAGAGCTA
- 999 GAAGTGTCTTAGATAGCTTTAGATAAGGTTATCCTAATCTTTTTTCATGCCATTGTCCA
- 939 CATGGAAAATGGCGGTACTGCACATCGATCAATATCTCAAGGCATAATTGTCACAGGTTT
- 879 TCAGAGCTTTGGTTGGGAAATGATCTCGTCCAACATCCTCGTCTGCAAGTGGGGGAAATTA
- 819 AATCTTACAGCGGGGAAGTGACATTTCCAGATCAAGACGTTAATGCAAATGATGGAGCTA
- 759 GAACTCTAGTCTCCGACAGATAACTAGTCAGTCTCCTCCCCACAAAGTAAGCAGGGTTG
- 699 GATGTCAAGCTTGCCGATTAGGTGAGCGATAGTCTCAGTGGATGGGGCTATGGTCTGGAT
- 639 CTGTGTTGCTTTAAATGTGGTCCCATACCACCTGGCATCAGAGCTTGTTAAACCTTGAGG
- 579 AACTTGTTAAGATAGCTGAGACATGGGACCCACACAAACACCGGAATCAGGCTCTGCGGCA
- 519 AGGCCCGGGAATCTGCATTTTAAGGTTAGAAACCGTGATCCATCCCACCTCCTCTACGGT
- 459 AATTTTGGACTACCGCTCCGACTTGAAC TGAGGGA CTCTGCTGGGCGCATATCGCCAG
- 399 CAACCTGACCTCAGAGCAGCGTGGGCGGCACGGCTACCGCGGTTCTAGCCGTAAACTGTC
- 339 TGTTACGTACTAGCCCTTCCAGTCGTCACAAACCAGCCAGGGCCCCATCCGTGTGAGGAC
SP1

- 279 ACCGCCGTGCCTCCAATCAGCCTCCTGGCCGGGCGGCTGAGCAGGCTGCCGGGGGGGTGG
- 219 GGGGGTGGGGTTGGGACAGAGGCGGCTCAGCTTCGCCCCCTCGAGGCCAGGTCCCTCCGC

Transcription repressor

- 159 AGGCTAGCCGGGTTGCAGTTTCCCTTCTCCGCTCCGAGCGCCTTTTTCTTCGTAGTCCC
NRF1

- 99 GCCACCAAGGAAGCCAGTACAGCGCTGCGCTTCTACCTTGCCCCGCTCCTAGCTAA

+1 (Putativo)

- 39 TCGGAAGTTAGCCGATTTCCCATAGTGCCCCGCGAGTGGCGGGCATGATAGTAAATCCGG
+ 22 TAGGCTCTCTGGCGGGTTTAAGTCGGCTTTGTTGCGGTTTCTCTTGTGCCAGGGCGCTGT
ATG Exon 1
+ 82 AGGGAATTGGGGCTGGTCAGTGCTTTGTCTGCGGATGCAATGGCGCTTCTCCGGGGCGT
+ 142 ATGGGGCGTGCTGAATGCGCTGGGAAAGTCAGGAGCGGATCTCTGCGGGGCTGTGGCAG
+ 202 TCGACTGCGCTCTCCCTTTAG

FIGURA 2

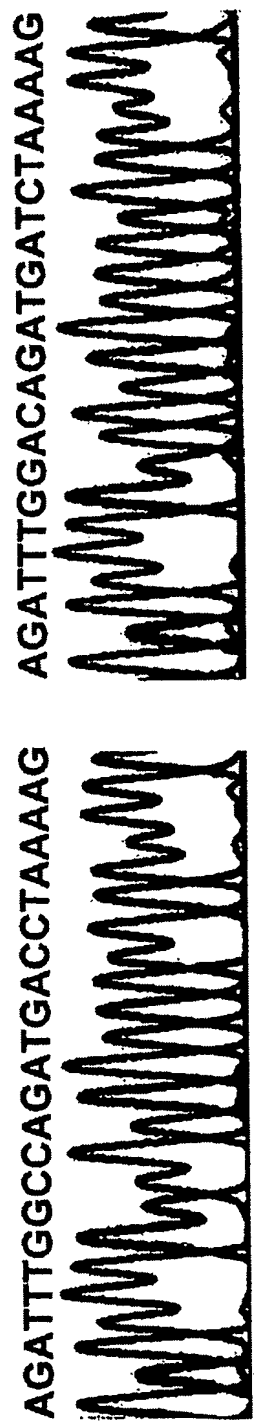


FIGURA 3

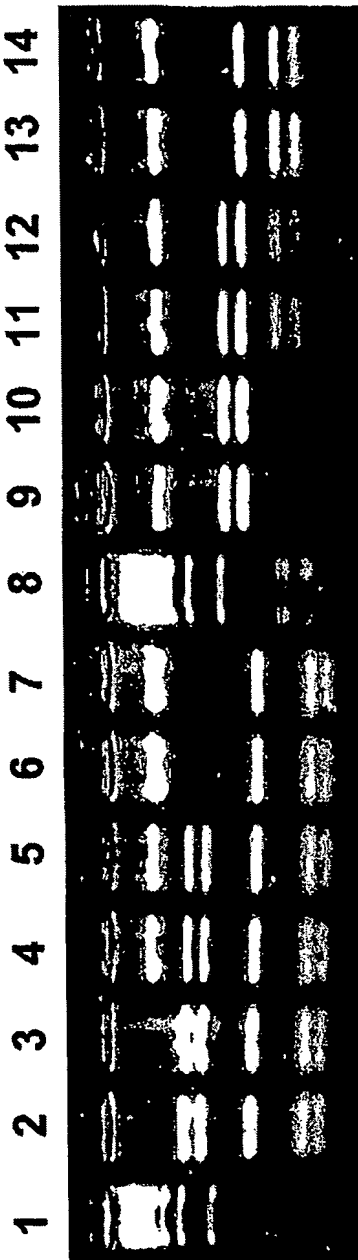
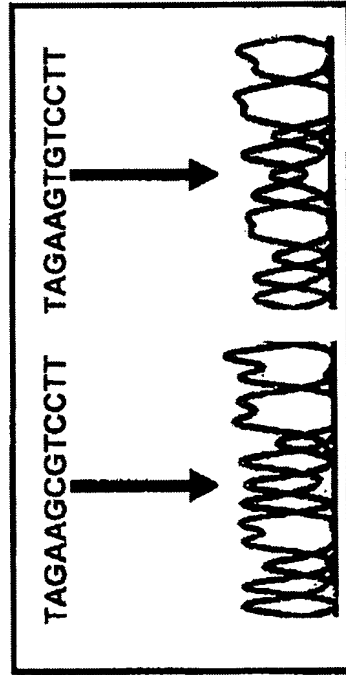
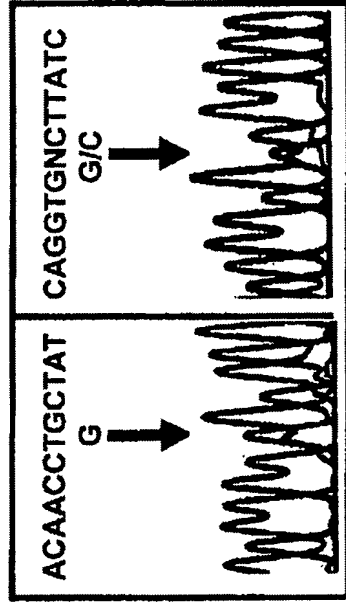


FIGURA 4

A. Uma terceira mutação detectada na região promotora TFAM bovina



B. Duas mutações detectadas no gene TFBM1 bovino



C. Cinco mutações detectadas no gene TFB2M bovino

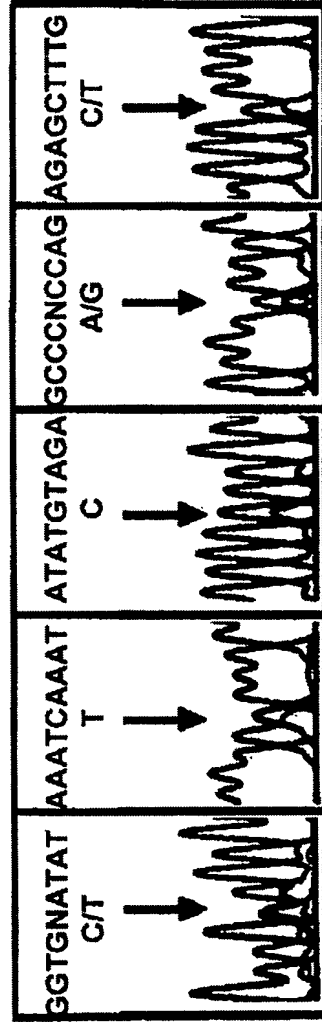


FIGURA 5

CGGGCATGATAGTAAATCCGGTAGGCTCTCTGGCGGGTTTAAAGTCGGCTTTGTTGCGGGTCTCTTGT
 GCCAGGGCGCTGTAGGGAATTGGGGCCTGGTCAGTGCTTTGTCTGCGGATGCAATGGCGCTTCTCCGG
 GCGGTATGGGGCGTGCTGAATGCGCTGGGAAAGTCAGGAGCGGATCTCTGCGCGGGCTGTGGCAGTCCG
 ACTGCGCTCTCCCTTTAGTTTTGCGTATGTTCCAAAATGGTTTTTCATCCAGCTTGAGTGGTTATCCAA
 AGAAGCCCATGACTTCATACGTTTCGATTTTCTAAAGAACAGCTGCCCATATTTAAAGCTCAGAACCCA
 GATGCAAAAAATTCAAGACTAATTAATAAAATTGCCAAGCTATGGAGGGAACCTTCCTGATTTCAGAGAA
 AAAGATATATGAAGATGCTTACAGGGCAGACTGGCAGGTATACAAGGAAGAGATAAACAGAAATTCAG
 AACAACTAACTCCAAGTCAAATGGTATCTTTGGA AAAAGAAATCATGCAGAAACGTTTAAAAAAGAAA
 GCGTTAATAAAAAAGAGAGAGTTAAACAATGCTTGGAAAAACCGAAAAGACCTCGCTCAGCTTATAACAT
 TTTTATAGCTGAACGTTTTT CAGGAAGCTAGGGATGGCACATCACAGGTAAAGCTGAAAGCTATAAATG
 AAAACTGGAAAAATCTCTCTAATTCTCAAAGCAAGTATATATTTCAGCTTGCTAAAGATGATAAAAT
 CGTTATTATAACGAAATGAAATCTTGGGAGGAACAAATGATGGAAGTTGGACGAGAAGATCTTATACG
 TCGCTCAATTAATAACCCAGCAAAAAATGACCCTGAGAAGTTTTAAATAGAAAGATTGAGTTATGTTCT
 ATAATGGATAGACATAAGAAACCAACTAGGTCTCAATACCGGAAGCTGTTGTAAAATTAGAATGGATA
 AAGTTGGTGAACATTTATATTTAATTCCTTTCTGTAGCCCATGGACTTCTGCCAGCCAATTCATATC
 ATTTTGTATTGGTGTCTTGCTTTTGAAAACCCAAACAGATAAGACTTCATGTGGAATTTATTTTGTGT
 TTAGGAACCTACTGAGCATCAAAATAATCCATGAAATGTAGCAGTGAATCATTTTACCTTTGATAAAGG
 TAAATCAGACTGTGAAGTTTTTTTATACTTGGTGATTATGGAAAAAATATTCTTGTTTCTCTATATTA
 TGGGAAGCAGGAGTTTCTTATTCATAAGTATCTCAAAGTTTGTAGAAGCCATAGTGTTCTATGATATAA
 CTGCATTTTTTAAAGAGCATCCAGAACTCATGCTGGTAAATTCCAAATCCTGGGTATAATTCATATTA
 TAATCAGACTTGATGGTTGTACATGTGAGGAATTTCTGGTATCAGTTGCAGCTTTTATAAAAGGTATA
 GATTTATAAACCTTTTCTCTCATTATCTTTTCTCTAAATTA AAAACTAAAAAATTATGTACCAATCTA
 TGCATATTGTTTTATATTGCATAGAATAAAAAATTATGTGTTTCTTAATTATGTTTTAAGGTGAAACAT
 TCATTTTATAGCTTTCTGGGATTTTTGTTTGTTTTTTAAACAAAGTAGGAGTTTGTATACTGAATTA
 TTTTTTCTCTTATGTAAATATATTTATCCAGAAAGTAGAGAACTTATTTGGTGTAAGTTTTAAATGA
 GAGATCTAAAAAATCATGTCTCCAAAGTCTCTCAAATTTGGAACTTATAATTTTTAAACATTTGCATA
 ACATATAAAAGCCTGTATAATAATTAATAGCCAGTTCTAGCCTGATGCCACATCCAGCCCACTGCCT
 GCTTTTCTTGGCCTTGTCAACTAAGAATTGTTACAGTTTTAAATAGTTAAAAAATAAGCATACT
 TCAAGACACATGAAATTAATATGAAATTCAGTGTCATAAAAAATGTTTTATTGGAACACAGCCAC
 ACTCATCGATTATGGCTGTTTTTGTACAATAGTGCAGTTGACTTGGTTGCTACAGAGAGGTGCAGCCT
 GCAAAGACTGACCCGTATAGTGTGGAATGAGATGCTCTTAAGTTACTTGCTGTGGCTCAGTAAAATAC
 ATCTTAACAGTTTTCCAGTTAGCATTTAAACCTTACCCCTTCTAGCATTTGATTATCTTCTTAACAAG
 AGTCAAAGGTTTTTCAAATCCACACCACCTTTTTTGAGCAAAATATTCAACTGTCATCATCAGTTTAC
 ATGAATTTATAACTC

FIGURA 6A

TAGATCAGATTTATAAGAACTTTATAGCAAGGCTTATCAAAATGACACTTTAAAACAACAAAGACTTT
 AAATATTCAAAAAATTTTTATATCTATCAACGCTCTGAAAGAATAAAAACTCTAGAAAAATGTA
 AAGAAAAGTTGTTGCAGAAATCAGCTAAATGTAATTATAAGGAATCTATCCCATACTTTTAGCTTG
 ACATTGTAGTGTAAGTGTTCATTTCTTTGCCCTCTGCCACTAGACTTCATGGGCGGTGAAAAGAAGGCT
 GTGTTTTTATCTAAGTTTGTGGCCTTGACATAATGTGTACTCAGAAAAATATCAAACAAACAAAAT
 CCAACCTGTTTTCTTCCATGACAGAGTGAGAGATTTGGACAGATGATCTAAAAGGTCCCTTTCAATAC
 TGAGAAATTTTGAAGAAGGAGTGGTGATAGTTGCTTACCACCTAGAAAGTGGGCTTGGTGGTGCCTC
 AACGGGGCCAGTGAAAGACTCTCAGCTCAATATGACACTAGTAAGAATTTTCTTACAAACCTATCCAAC
 AGAGAAAAAGCTGTTTCAGGAAGTGGCTCTTTGAAATAAATGGAACCTGAGAGCTAGAAGTGTCTTA
 GATAGCTTTAGATAAGGTTATCCTAATCTTTTTTCATGCCATTGTCCACATGGAAAAATGGCGGTACTG
 CACATCGATCAATATCTCAAGGCATAATTGTACAGGTTCTCAGAGCTTTGGTGGGAAATGATCTCG
 TCCAACATCCTCGTCTGCAGTGGGGGAAATTAATCTTACAGCGGGGAAGTGACATTTCCAGATCAAG
 ACGTTAATGCAAATGATGGAGCTAGAAGTCTAGTCTCCGGACAGATAACTAGTCAGTCTCCTCCCCAC
 AAAGTAAGCAGGGTTGGATGTCAAGCTTGCCGATTAGGTGAGCGATAGTCTCAGTGGATGGGGCTATG
 GTCTGGATCTGTGTTGCTTTAAATGTGGTCCCATAAACCACTGGCATCAGAGCTTGTTAAACCTTGAGG
 AACTTGTTAAGATAGCTGAGACATGGGACCCACACAAACCGGAATCAGGCTCTGCGGCAAGGCCCGG
 GAATCTGCATTTTAAGGTTAGAAACCGTGATCCCCACCTCCTCTACGGTAATTTTGGACTACGCG
 CTCCGACTTGAACTGAGGGACTCTGCTGGGCGCATATCGCCAGCAACCTGACCTCAGAGCAGCGTGG
 GCGGACCGGCTACCGCCGTTCTAGCCGTAAGTGTCTGTTACGTACTAGCCCTTCCAGTCTGCACAAA
 CCAGCCAGGGCCCCATCCGTGTGAGGACACCGCGTGCCTCCAATCAGCCTCCTGGCCGGGCGGCTGA
 GCAGGCTGCCGGGGGGTGGGGGGTGGGGTTGGGACAGAGGCGGCTCAGCTTCGCCCCCTCGAGGCC
 AGGTCCCTCCGAGGCTAGCCGGGTTGCAGTTTCCCTTCTCCGCTCCGAGCGCTTTTCTTCTCGTAG
 TCCCGCCACCAAGGAAGCCAGTACAGCGCTGCGCCTTCTACCTTGCCCCGCTCCTAGCTAATCGG
 AAGTTAGCCGATTTCCCATAGTGCCCCGCGAGTGGCGGGCATGATAGTAAATCCGGTAGGCTCTCTGG
 CGGGTTTAAGTCGGCTTTGTTGCGGTTTCTCTTGTCAGGGCGCTGTAGGGAATTGGGGCTGGTCA
 GTGCTTTGTCTGCGGATGCAATGGCGCTTCTCCGGGGCGTATGGGGCGTGTGAATGCGCTGGGAAAG
 TCAGGAGCGGATCTCTGCGCGGGCTGTGGCAGTGCAGTCTGCGCTCTCCCTTTAGGTAAGCTTGCTGCC
 TGCACCTTCGAGGCGGAAGGTTTCAGGACGCTTGGGGTTAGAATGTAGACGCTGTTCTCCGCTTTC
 TGACCCCTCGAAATGGTCAGGACTGACTTAGCCCTGTGATTCCGACCTCGACCTTGCCAAGGGGATG
 ATAGCTTTGAGACGAGGCCTTACTGCTTCAGTACCCCTTGCTTCTTCCGGTCACCTTTCCCTCCT
 CCCGCTCCCTCCTCATTCTCGTACCTTGGAGCACCGGTTCTGTTGTCCCTGCGAAGTCGCGGCAAAGT
 CTCCTGCCCTCATCTAGCCATTGAGGCGAAGCCAGGAGCTGGAGATACATGCTTTCTTCACTCTCT
 GCCCTTGCTAGGGGTTAGGGCTTTTGAGACTTCAGTTTTGCAAGCTCTTTCCCTGGATAGGACAGG
 ATTTTAAATATCATTAGTGTTCTTGCCGAAGGTGTTAGGTGTGAGATATGTAGCATCTTGATATCTTG
 CTTGGCATCTGTGTGCACGTAATTATGAATACAGGTACTTAAATGTTTAACTGGTTATTTCTTTT
 TATTTATATGTAGTTTTGCGTATGTTCCAAATGGTTTTTCATCCAGCTTGAGTGGTTATCCAAAGAAG
 CCCATGACTTCATACGTTGATTTTCTAAAGAACAGCTGCCCATATTTAAAGCTCAGAAGCCAGGTAA
 GGAGTTTGGGTATATACTCTTCTGTGATGTACTAAAGATGCCACTAAGCAGTTAAATTGCAGACTTG
 ATTTTCAGTATCAAGGCATCTGTTGAATGCAGAAACATAACCATTCTGTGTGATGGCCTGTAAATAG
 ATATAACATGGGCTTGTATGAAAGCCACCTGCCAATGCAGGAGACATAGGAGTCGCGGGTTCAATCCC
 TGGGTAGGGAAGATCCCCTAGAAAAGGGAATGGTGACCCGCTCCTTTATTCTGGCCTGGAAAATTATG
 GACAGAGGAGCCTGGCAGGCCACAGTCCATGGATTGCGAATCAGACACGACTGAAGCGACCTAGCA
 GGCATGCATAAGGAATCAGTGTAAGCACAGCAGTAAGGTAATTTTACCAATAAAAATGCTTTAAATG
 TAATTGAGAACTGGTGAAAGCTATTTTAAAAATAGCATGTAGAATGCAAAGTACTTAGGAAAGAGGAT
 AAAAAAGCTGAATTTGGGGCCTTGTGGCCATTGCCCCAGAGGACCATTGACGAATCATTTTACCTCTT
 GCTTAGCTCCTGCTTCTCCCACTGCAAATTATTAATAAAGTTGCAGTGAAATAATTTATGTGGATGTG
 TTGCATAAAGCTTGAAGCTGAATACAGGTTATTGTTAATTTTAAAGAGCTTTTGACTGAAAGCCAGTT
 GAATTTCTGAAAGATTCCAGTTAGGTTTGTGACTCCCTAGAAAGACTGGGTCTTTATTTGGGGCTGT
 AGTGTAAGATAGTGACCAAATTAGTAATTGCTGAGCTTTTCTTATAATTCTAAAGCTTTTTCATAT
 GCATTATATCACAGGGCACTTATGAAATCATGTGAGCTGTAATAGTCACGTAAAGAACTGGTTTAAAG

FIGURA 6B

AGACATGCTTCAGTACTCACATCTTTTGAAATGTAGGAGTTGAACTAACAAGTAGTTTGTAAATCA
 TTTATACCTTGTTCATTCAGTTAAGATGGGAAGGAAATGGAGAAAAATTATTTGGTTTTAGATAAATT
 TAGCTTGTGGTTCAGGTTTTATGAACTTGGTCATTCCCTGAAAGACTTGAAAAAATGTTTTTGATTGA
 AATATGAAGTAGAAAACTTGTAGACACTGATTCCTCAATTTGCTTTAACTTAGTAATCAATTCCTGAGG
 ACCATTTTGGTGGTAAGTGGTACTATTCTTAATTTAATCATTAGATAATAGACTTTAATAATGTTAG
 ATAAAATATTAAATTATTTATGTACTTAAATTAGTTGGTTAAAGAAAACTAAATAATTTTAAGTTG
 TGTGTGGTAAATGTCTGTAAAAATACTTAATTTTAGAGCTAATGGATTATTCTTTCCTGAAAGTCTT
 TAGAAATTGATCCAGAGATGTAAATGGTGATACCAATTTTTATTTCATTTTATAGATGCAAAAAATT
 CAGAACTAATTAAAAAAATGCCAAGCTATGGAGGGAACCTCCTGATTTCAGAGAAAAAGGTAAGCATA
 TAAATTTTAAACATTGCTGACCAGTTACTTTGCAGGTAAGGACAACCTGTCTATGTCCTTTAAGGAAAA
 GATGACCCAGAGTTTTTTTTTTTAAACGTTTGTATCTCAAGGAATGTCATACTTTCTCATCCACATA
 AATGATGAGAATATGGATAAATGGCAGTGGTGATGAAGCGTTGGTTTTGAAGCAATTTGAAGTTGGA
 GGCCAGTTGCTAGACCTTCACCTTGGATAACACATTTGAAGAACACGTGATTATAAGTGGGATTTCAG
 GAGTCATTTTCCACTTGGTGGTTGCTGAGTTTGTGAAAGTACGCAGTTGCTCCTTCCCGTCAGGT
 GTGCTATGTTTTAATTAGCCAGCAATAGTTTATCAACTTCTTATTTGGATTTTTTATAGATATATGAA
 GATGCTTACAGGGCAGACTGGCAGGTATACAAAGGAAGAGATAAAACAGAATTCAAGAACAACCTAACC
 AAGTCAAATGGTATCTTTGAAAAAGAAATCATGCAGAAACGTTTAAAAAGAAAGCGTTAATAAAAA
 AGAGAGTGAGTATGGTTGGCATAAACTGAAATTTGGCAAAAACTGAAATTTATATATCTATAAATA
 CAGGTTTGCTTTTTTTTCTTTGGCAAAAACTGAAATTTATGTATCTATAAATACAGGTTTTTTTCCCT
 TGTTTTGGTGACGTGGTAGAGAATGACTTCAGTTAGGAAAAATAGGATAGTTTCTTCTGCCACTAG
 GACCACGTGCCTTTGAGTATGTTGTAAACCGTTTTTGCTCCTTTTGGATGTGTCTGAGTTCGAGATAC
 ATAATTAGGACTGGTGTGAAAGCTGTAGGAACAGAGTTAGGAAACAGGAAGATCAGGAATAGCAAAAG
 TCTTGATTCTCTGTCATTTCTAGAGTACCTTACTGATTTGAATGTCTATAGGTGATGGTGAATTTG
 ATTCTGAATATTGCTGAATGGAATGGAATTCATTAACCTTATCAATGTTTTAAAAATACCTATTGTAGAT
 AATAAAATTAAAGTGCCTTTAGGATGAAATTCATTTTTCTCATTAAAAATCCACATGGTTCAAAA
 TTAGTGGCTTCCAGTTTAAAGGTATTAGTCCATATAAAATCTATTTGTTTGACAGACTACATCTTCCAT
 ACTATTAGGTGTGAGGTGGTGAACCTGCTGATCCAGTATATATACCATAAAAAATGATCATCAGAGCA
 AAAGCTTACTTCTCTGAAAAAGTAGATTCCAGCCTTTAGTATGAAGTGATGGAATCTCTCTTCTGAT
 CGCTGTGTCTTAAGCCCTCTAGCTCTTGGGTTGAGGACTCACCAATTTCAAGTCAATGATAGTAAT
 CGGAGACTGCTAATCCAATCAGTAAAAGGAAGCCAGAAAAAATAGGGATGGTATTTGGAGGGTGGAAA
 ACTAGGGTTTATTCTCTCTGAGCTCTCCCTTGCTCTTTAATGCACCCAACTAGTACTTTGAGTGGGG
 AGGACCAGAAATGAAGATTGAGCAGATATAAGGAGTTTCTTATTCAGGTATTTCTGTTCTTTCTCTG
 TTGTATTCCAGTTCAGTTCAGTTGCTCAGTTGTGTCTGACTCTTTGGTACCCCATGGACTGCAGCATG
 GCAGGCCTCCCTGTCCATTAGCAACTTCTGGAGGTTACTCAAACCTCATGTCCATTGAGTTGGTGATGC
 CATCCAACCATCTCATCTCTGTCTATCCCTTCTCTCTTCACTTCAATCAGGCTCTTTCCAGTGAG
 TCAGTTCTTCGTACCAGATGGCCAAAGTATTGGAGTTTTCAGCTTCAGCATCAGTCCCTCCAGTGAATA
 TTCAGGACTGATTTCTTTTAGGATGGACTGGTTGAATCTTCTTGGAGTCCAAGGGGCTCTCAAGAGTC
 TTCTCCAACACCACAATTCAAGACATCAATTCTTGAGCGCTCAGCTTTGTTTATGATCCAACCTCAACA
 TCCATACATGACTACTGGAAAAACCATAGCCTTGACTAGAGAGACCTTTGTTAGCAAAGTAATGTCTC
 TGGCTTTTTAATATGCTGTCTAGGTTGGTCATAACTTTCTTCCAAGGAGCAAGCATCTTTTAATTTT
 ATGGCTGCAATCACCATCTGCAGTGATTTTGGAGCCCAAAAAATAAAGTCTGACACTGTTTCCACTG
 TTTCCCATCTATTTCCCATGAAGTGATGGGACCATATGCCATGATCTGTTTTCTGAATGTTGAGTTT
 TAAGTCAACTTTTTCACTCTCTCTTTCACTTTCTTCAAGAGGCTCTTTAGTCTTTACCTTCTGCCA
 TAAGGGTGGTCTCATTGGCATATCTGAGGTTAATGATATTTCTCCAGCAGTCTTGATTCCAGCTTGT
 GCTTCATCCAGCCAGCGTTTCTCTTGCTGTGTCTATACATATTGTAGTTGTCCAGTAGGGGTTGG
 ATGTTCTTTTTTTTTCTCTTCTCAGTCTTTGTTCTCTCTTTTACTTTTCGGATTTTCGAGGATTTTTTTT
 TTTTTCAGCATGCTGTGTGGCTTTTGGGATCTTAGTCCCTTGACCAGGGATTGAATGTGTGCCCCCTG
 CAGTGAAGGTTGGAGTCTTAACCACTGGACTGCCAGGGAATCCCTTTATCTCCAGCACTTCTTTTG
 GGTTCTTTCTTATGATTTCCCTCTGCTTACAATGCCTGTTCTTGACAGGCTGTCTAGAATCCTTACCAT

FIGURA 6B

ATTAATCACAGTTGTTTTAAATCCTGGTCTGATAATTTTGTATCCCTGCCAGTTCTGATGCTTGTTT
 TGTTTCTTTATGTTAGGCTTTTTGTCTTTTAGTATGCTTTGGGATTTTTTTCTTGATAGTTAGACAT
 ATGATGTGCTGGGTAAGGAAGTCTGTATATGGGCCTTCGTAATGTGGTAAGGCATGGGGCAGGGG
 AAGCATTCTACAATCTTATGATTAGGTCTTGGTCCTTTAATAAGGGCTTCCTTGGAGACTCATTGGTA
 AAGAATACACCTGCCAATGCAGAAGACCAGTCGGGAAGATCCCCGACAAAGGAAACGGCTGCCACT
 CTAGTATTCTTGCCTGGGAAATCCCGTAGACAGAGGAGCCTGGTGGGCTACAGTCCCTGGGGTTGCAA
 AAGAGTCAGATATGAGTTAGCAGTTAAACACAAAAACCTTTAATGAGCCTGTAGCTTTGTGCTTA
 GGTGGTACAGGATGGCTAAAGTGAGCTGCAGTCTAGTATTTCCCTTCATTGAGGTCTTTTAGGCTCTT
 GATAGTATACCAGCAGGTTAGGTTCTTAATGTTTATTTGTGTGTTTATTTTTATTTGACTGCACCAG
 ATCATTAGTTGCAACACGTGGGATCTAGTGTCAGCCATAGATTGAATCCCAACCCCTGCATTGGG
 AGCACAGTCTTAACCGGTAACCACCAGGGAAGTCCCAGCAGATTAGGTTCTGATTAAGTACTAGTTCCC
 TTGAGGGCAGGCCTTGTTAAGAATAATAAAGTACTCTGGCATTTCGAAATGATTCCCTTTCTTCTCTGC
 TGAAAGCAAGAGGGGTTTTTTTTTCCCTTGATATTTACTGTGGGAATCTGGTCAAGTTCCTGGAGAAA
 AACCTCACAGTATTATGAGGCTTCCCTATGAGTGGTGGTAGCTCTCAGAGCTGTCCACATGGAGCTTC
 CAGCAGTTAGTCAGCTGTGGTTCAGTTTCCCTCCACACCAGTGGTTCCATTCCCTCTATCTGTTCCAGT
 AAGTCTCGACTCCCTGTGTTACCTGTCTGTGTCTGTCTCCAATCTTGAGAGCAGCACTTCACCCTGT
 GTCCCTCTTCAGTGGATCCAAGAGAGTTGATTTTGAGTCTGATCAGCTTTATACTTATTGGATGGA
 GTGCTGACTTCCAACTCCTTACATGTAGAACCAGAACTTAGAAGTCTGAGTGACTTTTCCGTAAGA
 CTCCATTTGCTCTCCCTGTTGGAATTTTTCTTCCATTAGATTCCAGTTCAGCTACTTGCAGTTT
 AGGTGAGAGGTGGGGGCCAGGCAGTTGCAAGTGAAGCACCTGGAAGAAATAGCTAGCAGTGGCTCTAG
 AAACAGAAGGGGAGATGCCCTCTCTCCGAGGGGCTCAGGGCTGAGAGAGTGACCTCCATATGTAAAT
 CAGAGGAGCCCTGCTTATGAATGAAAGTTGGGTTGCTTATTGACTGTAAACCAAATTGCCATTAAAC
 CCCCATCGTTTTATAAATTTCTATCTAAGTTCAGAACTCAGTAGGTTAGGATGAGGCAGTGGCCTTC
 ATTAGACAATGCAGCAAATGCGCCAATGTTCTTGAGTTGTCAAGTGGGAGTACGTAGTGCTTTGTCCA
 AGGAGAAGTGGTGCCCTTACAAGGATAAAACGGGTTTTTTTTTAAATGTTTAAAAAGATTTTGTACATCC
 TGCTCATTTATTTCAGTTTCATGGAGACCATAAACATAATATGTAAAGGAAATGTTTCTGTATGAAAGT
 AACTTATAAAATCTATTAGGATTTTCAAAACAGTACTAATCAAAATTTCTGATCCCAAGAGGGAACAA
 TCGCATACTCATAATGTTTCATTTTAAAGAATATTCTGTAATTCATGGTAGTGAATGAAGTTTCTCTAG
 GTAAATTTAAGTATCATAGAGTTTAAACTTTTATCTCACCTTTTCATTTTTTTTACTCAGGAGTTAACA
 ATGCTTGGAACCGGAAAGACCTCGCTCAGCTTATACATTTTTATAGCTGAACGTTTTTCAGGAAGC
 TAGGGATGGCACATCACAGGTAAACAACTCTGTATGTTTTTAAATGTTTACTCTAATTTTTTAA
 ATAATATAGACAGGAACTTTAGGGGTGCAACCTGTCAAGTGGTGAAAAAAGTGGTAAATTACTATA
 AAGAAATAGTATATATAAATAAGACCTAAAAATCCTTTTTCTTACCACATAAAATGTTTAAATTTGA
 ATGTGTTATATATACATATTCAGCCATGTATATACATAGTCAACTTTTTAAATTAAAAACAAATTT
 TCACCTTTATAGGAGTGTTCAAGTCTGGAGACTTTTTCTTATCCAGCACTTCTGAATGGTTTTACAAT
 CACTGGGAAAGAATGAGAGAGAGAGGTATAATGTTTCATACTGGGATTTGAGTGTGGCTTCATGTTAC
 GCCCTTTAAACATTTTTGGTTATCCCATGGGAATGTATTATATTACACATATGAATGGTATCTATGTC
 TGCAGAAAGAAGAAACAGCTTGTCATTCTTGCTGTGGCTTAGTCTTCTCTTTATTTCTTTTTTAGAG
 GCTCCAAATTGTTAGTTGTACTATTCTCTTTTAAATATGCCATGGTAAGAAAAGTTGTCTGCTCGGAT
 TCCTAATTTCTGTGAGTGTGAGATGGAGGTTTTTGCCACTCTGATTCTTTGGGTTATTTAGATCTGTA
 GTTCATTTTCACAGATCCTGTTGGACATATGATTAAATGATGTGTATATGTAACGTATTTTTCTGGCTA
 TATATGATTTCACTGACTACTTCCCTTGGGATTTTTATTTTCTTTTTGAAAAAGTAGTACCATTTTTATTT
 AGTGTGTAGGACATCGTAGGTTACTTCTGAAAAACAAAAAGGGGATCTTCTCGGACCAGGGATTGAA
 CCCATGTCTCCTGCATTGGCAGGTGGATTCTTAGCACTGAGCCACCAGGGAAGCCCTGGATTTTAAAT
 TTAGTTTCCATGGCCCTACATTACTAAAACAGCAAGCCTGTTTATTTTTTTAGTTGGAATTTGCTCAG
 TCACTAACTAACTTTGGATTTCATTTTATTAGTATAAGAAGGTTTTGTGTTAGAGAATCCTTCTGAAT
 CAGTAGTTCTCAACTCTGACTGCATCTTGGGAATCACCTCAGAAGCTTCCTGGCTGGCCTTTATCTCTG
 AAATTTAAATTAATTTAATTTCTATCATTTTTATTTCATGTAAAAAGTGCACTCTCATAGTTTTAAAGA
 ATCAATGAGGCTTGTTATGAAGACACAAGTTTCCCTGTGCCGTCATGTTCTCTCACTCCAGAAGCAA

FIGURA 6B

ATGCACTTCTGTTTTAGTTGATTCTTGTAGTATTTACCCCCATGTCTCTAAAGTAATGTTCCCTCCATTGT
CACGTCCTGATTTTTCTAAAATTCTAAGCGTTACCTATATTTTAGGCATTCCCTCTCACTGTGTAAGG
TGAGCGTTAACTCTGTCTCATCGCACTGTTCACTCTTCTGTCACTCTGCCTCCCAATATAGTTACATA
ATTTGGGTTAGATCAGTATTGAGTACTTAATACTATGATGTGTGCATGCTAATTTGCTTTAGTCATAT
CCGACTCTTTGTGACCTGTGGACTGTAGCCTTCCAGGCTCCTCTGTCCATGGGATTCTAGAGACAAG
AATACTGGAGTGGGTTGCCATGCCCTCCTCCAGGGGATCTTCTGACCCAGGGATCAAACCAGTGTCT
CTTAAATCTCCTGCATTGGCAGGTGGATTCTTTACCACCTAACGCCATCTGGGAAGCTCAGTGGCTCAG
CCAGTAAAGAATCTGCCTGGAGAGGAGAGCCGGGTTTGATCCCTGGGTGAGAAAGAATCCCTGGGGA
AAGCAATGGCTACCTACCCAGTATTCTTGCTGGAGAGTGCCAGGGACAGAGGAGCCTGGAAGGCTA
TGGTCCATCGGGTTGCAGAGTTGGACGCAACTAAGCGACTAACGCTTTCTGCACCTAGAGCGTGGAAT
TAGCTCTGCTTTTCTGCTCCCCAATGCTGTGTTGGTAGTGTCTTTCTATTGTCTTTGTGCTGTG
GATTTTATGCCTTTAGAAATTTAGTTGTGTTAATTAAAAAAATAAATCACAGAAATGAATTGCTTAC
AGTCTGAAGGTTAAAAAGTCCAGACTCAAGGCCACATCTGGTGAGGGCCCTGTTCTCTGCTTCATAGCT
GGCACCTTCTCTCTGTGTCTCCTCACATGGGTGTGAGTGCTCATTTAATGTGATTTTAGATAGCACCAG
AAGTAAATACCTTCCCATCCCTTTAATTTGTTTTCCATGAATTAGTTTTTTAGGTGAAAGATTGTTTA
TGCAATGCAGCTTCATAAAATTATTGTTTAAACACACTGAATATGAAACTTGTGGATTAAATATAAGCAAA
AAGATACGTTATGAAAGAACTAAAAGCATGAAAGCAATTCTTTCCAAAGCTAAGAGAGCAGTTATTTA
ATGAGTAACCATCCCTGAATATACCTAGATGATTTTATAAAGGGAAGCTTAAATACTCAAATAGGCT
CAGATACCATCTGGGTACCTCACTTTTTGTTGATAGGAAAAAAAATTAGTGAAAGTTCTGGTCAG
ATAGTGAAGTTAATAGTTCTAACTCTACTTCTTAAATCACTGATGATATCCTCCTGCCCTTAATAGG
CACTTTTCATCCCCCTCTCCCTCACATCTCTCCGCTCTCTCTCTCCTTCTTCTCTGCTCCTCATTCTC
CACCCGCCCATTTTCTCTTCACTCTTTGCTCTCCGGTAGCAGCACCACAGGCTGTGTGAGGTGTACT
CACTGTCTCTCTGCTCTCCTCCAAATATGGGATTCTCGCATCCCTTTAATTTTATAGATTAAAGCTC
CCAAGCCTAAGGGAGGTCATAGAATTTTTCCGGGTCACATAGTTAAGCTCAGCTGTGTAGGAGGAGA
ATCGGCGCTCTGTGTGCTCCTGTGGTGACAACCTGAAACACAGTGCACAGACATGAGGCTCAGAGAGCA
CTTAAGCCACAGAGGAGAGACAAAACAGTATTTGAGGCTAGTCTGTGACAGAGTAGCTTATATTTGAATA
TTAATATCTTTGAATTCAAAAAGATAAATATCTGCACAACAAAGGAACCATCAACAAAATGAAAAGT
AATCCTACCAATGGGAGAAAAATAATTTGCAAATAATTTAGAGAACTCATATGACTCATTCCCCACC
CCCGAAGAAAAAATCTGATTAAAAAATGGGCAAAGGATCCGAATAGATATTTTCCCAAAGAAGACTT
AGAGATGGCTAACAAGTATATGAAAAGGTGCTCAACATCATTGTGAGGGAATGTAAAGCAAACTAC
AATGAAGTACTCCCTCATATTTCTTAGAATGGCTCTTATAAAAAACAAGTACTACTGAAGCTGCAGTA
GAAGGGGAACCTTTGTGCTGAAACAGTAACTCAGAACACATAGACACGAGCAACACGTTGGTGACTGC
GCCAGTTGCTGGGTGGGGTGGGAGGGTGAATGGGCAAAGGTGGTGAAGGGGCACAGACTTCACAAGC
GCTGCACTGCACACCTGAATGTATTGTTACATGTTAGTTACAGCTCAGAGTTTTGAGGAGTCTTTGCC
TGTGATTCTTGATATCTGAGTGTGTGTTGGTGGGAATGAATAATAAAACAGCATCTTTCTTCAATCACT
GAAGTCCCTGTATCTGGTACTTAAGTGTATATTGTTTTACAGGTAAAGCTGAAAGCTATAAATGAAAA
CTGGAAAAATCTCTTAATTTCTCAAAAGCAAGTAAGTAGTATGGTTTTAGTCCCAAGTCCCTAGTTAG
AGTATCTGTGAGAAATATATCAGGGCAAGGCTGATTGATGTGAAAAACAACCTTATATTACACAGTTGT
TFAAATCATTGTCAATATTCTTGGAAACCAGTTGGCTTTTTCTTTTGGTAGTTTTTGAATCCATATC
AAACGGGTATTTAAAAACAGTGTCCCTCGTAACTTAGTGTCAATCATATCCAGTAATGATCACACCCTGC
CCCTGTTGCTTTTCCCACTCCAAACCTGAAATTGTAGCGACTTCATGAATACCTAAAAACCTTTAT
CTCTTATCTGTTTCTCATCTAATTTTTATCTCACAAGAATATTTCTTTCCAGCCCCCTTAAACATAT
AGAATAGTAAAAATAATTTCTAGAATATTTTTGGAGAGCATCCAGAAATTAAGTCAAGATTCTCTCT
AAAGAAATCATTTTAAACAATTACACTCTTTCTCAGGTATATATTACAGCTTGCTAAAGATGATAAAAT
CGTTATTATAACGAAATGAAATCTTGGGAGGAAACAAATGATGGAAGTTGGACGAGAGATCTTATACG
TCGCTCAATTAAATACCCAGCAAAAAATGACCCCTGAGAAGTTTTTAAATAGAAGATTGAGTTATGTTT
ATAATGGATAGACATAAGAAACCAACTAGGCTCAATACCGGAAGCTGTTGTAAATTAGAATGGATA
AAGTTGGTGAACATTTATATTTAATTCCTTTTCTGTAGCCCATGGACTTCGCGCAACCAATTCAATAC
ATTTTGTATTGGTGTCTTTGCTTTTGAACCCCAACAGATAGACTTCATGTGGAATTTATTTTGTGT
TAGGAACTACTGAGCATCAAAATATCCATGAAATGTAGCAGTGAATCATTTTACCTTTGATAAAGG

FIGURA 6B

TAAATCAGACTGTGAAGTTTTTTTATACTTGGTGATTATGGAAAAATATTCTTGTTCCTTATATTA
 TGGAAGCAGGAGTTTCTATTTCATAAGTATCTCAAAGTTGTAGAAGCCATAGTGTCTATGATATAA
 CTGCATTTTTTAAAAGAGCATCCAGAACTCATGCTGGTAAATTCAAATCCTGGGTATAATTCATATTA
 TAATCAGACTTGATGGTTGTACATGTGAGGAATTTCTGGTATCAGTTGCAGCTTTTATAAAAAGGTATA
 GATTTATAAACCTTTTCTCATTATCTTTTCTCAAATTA AAAAATAAAAATATGTACCAAATCTA
 TGCATATTGTTTTATATTGCATAGAAATAAAAATATGTGTTTTCTTAATTATGTTTTAAGGTGAAACAT
 TCATTTTATAGCTTTCTGGGATTTTTGTTGTTTTTTTTAAACAAAGTAGGAGTTTGTATACTGAATTA
 TTTTTTCTCTATGTAAATATATTTATCCAGAAAGTAGAGAACTTATTTGGTGTAGTTTTAAATGA
 GAGATCTAAAAAATCATGTCTCCAAAGTCTCTCAAATTGGAACCTATAATTTTTAAACATTTCGATA
 ACATATAAAGCCTGTATAAATAATTAAGCCAGTTCTAGCCTGATGCCACATCCAGCCCAGTGCCT
 GCTTTTCTTGGCCTTGTCAACTAAGAATTGTTTACAGTTTTTAAATAGTTAAAAAAAATAAGCATACT
 TCAAGACACATGAAAAATTAATATGAAATTCAGTGTCCATAAAAAATGTTTTATTGGAACACAGCCAC
 ACTCATCGATTATGGCTGTTTTTGTACAATAGTGCAGTTGACTTGGTTGCTACAGAGAGGTGCAGCCT
 GCAAAGACTGACCCGTATAGTGTGGAATGAGATGCTCTTAAGTTACTTGCTGTGGCTCAGTAAAATAC
 ATCTTAACAGTTTTTCCAGTTAGCATTAAACCTTACCCCTTCTAGCATTGATTATCTTCTTAACAAG
 AGTCAAAGGTTTTTCAAATCCACACCCTTTTTGAGCAAATATTCAAAGTGTATCATCAGTTTAC
 ATGAATTTATAACTCAAATTTATATATTTACTTTGTATTTTGCAAAAATATGCAAAAAAATAAAAA
 GTGTATATTCTACATCTCCAGAAAGAGATTTTTGAAGTTTGTGGATAGAAAAATAAGTAAAAAGAAATCA
 CTA AAAATGACTTGTTTACGTACTGAACTTGGCAAAGGTGAGACTGTAGGGAAAACTACAACTTAAG
 AGGACTAGCCTAAGATTTAAATATATGAGCTGTTTGAAGTTTTCAGGCGGCTTTGCTCTCTGAATGG
 TAATGCAGGACACAGCCTGCCAGTATGTAAATGACCCCTTGGTCTGAGGCTAGAGTGTCTGGGGAAGA
 AGAGAGGGAAGAAAAGGACACGTGCTAGTGTCTCTCCAAAGCTTTCTCAGTTAGGTTTCCAGGAGAGA
 ATTAAGCCCTAATTCCTGGGGCATCTAGAATGGTACCAATTTTGTACCAGCCTTAGGAGAATGGAGA
 AAATAATCACTCAAATAATTTACTGTGTTCTGTGCTTCAGATGAGCCCAAGGAGCACATGGGAGTCTGA
 TGTTTATAATATTATAGAATGGGTGAGGAAGAGAAATGAATTATAAACTCCTGTAGCACAAATGTATA
 AAACACATCTGCGTACTTACCTTCTGAGCTCTAGGCATTTAGCTGCCTGTACTGTTTTACACCGAACA
 CATTCAAATATCCAGTGTCTACGTTCTCATGTATATACTTAATATAGGGAGGACAGGTATGAAACAGT
 GAAAGGAGCTGTAGCAAAACCGTTTTGTTTTCTAAAAGGGTGTCAATTGTTAATACTTTAAATATTAGGA
 TAATCTGATTTTACACCTTTCTTAATAAACTTCAGTACATGGCATACCATGTATTAAATGCCATCCAT
 TTGTATATACAAATACTCTGTTATGAAGAATGAGAGCGTATATCAATAACCAGTGGCTAGGTGTGTAA
 CCGGTGGCCATTCTTATATTGGCTGAACAAGAACTAAAAGCTAAAGAATTGTGACCAGGGAAAAGAT
 GCTTAAGTGAAAAACAGCGTTTATGCTGTCTGAGCAGTCAGTCACAGAGACGCTTATGTTCACTAGAGT
 ACCAGTATTAGATTTTATAAAACAATTGACAAGGGTGTGTGTAATTATTTCTGATGTTTAAAGGTATA
 TGTGCAGATTGAGCCTACTGTAATAATGTAATTTTGCCATTGCTTTTGGCTAACTCCTTTTTTTGAAA
 TGCCCTTTTTTTTTTTTTTAAATGTATATGCTTTTTTAAATAGTTGGCCATGAATGTGTATATTTACATT
 TCTGAATTAATATGCAGTTAAAGTAACTGGCAAGTTTTATTGATATTTGTGACATTTACTGTACCTGA
 AATTAATCACCACCAGATTGTCCGAAAGCAGCAGGAACCTTCTATATAGGTAAGTAACTAATTTCCAT
 TATTTCTCTTAATTTTACCAATCTTTTACTGTAAAGACTACTCCAACAACAACAACAAAATACTCTT
 TTCTTTCTTTTCTCTCCTCACAGCCACTATTCTCTCTCTTTTCAAAGCACCAAGCTCTTACAGACA
 AATTTGAAAAATGTTACAAGTGCAGATAATATGTTTTGAAATTTTAAAGCAGTAATACTCTTTTAAATT
 GAACTTTGGGGAAGAATAAGAAATGAACGTATTTATTATTATTTTCAATTTGTAAAATTTTCAAATA
 GTAAAATCTGACAAAGTTAGTATCATCATTTCTCTCACATTGTTCAAAAATAAAATATTTTTGGTAATC
 ATTGATTATATTTGATGGCAAATACATAAAACATGAAACCCTTTCTAGCACATTAAAAATACTTTAA
 AAAATTTTACTGGCTAAAAACTACATACTTAAATTTGACTGTAAACAAAATTTTAAATAGGCTAAA
 CATTTAAAAATTACCTAATGGCAGAAAGTAAAGAAGAACTAAAGAGCCTCTTGAAGGTGAGAGAGGA
 GAGTAAAAAGCTGGCTTGAACCTAACATTCAAAAACTAAGGTAATTGCATCTGTTCCCATCACTT
 TATGGC

FIGURA 6B

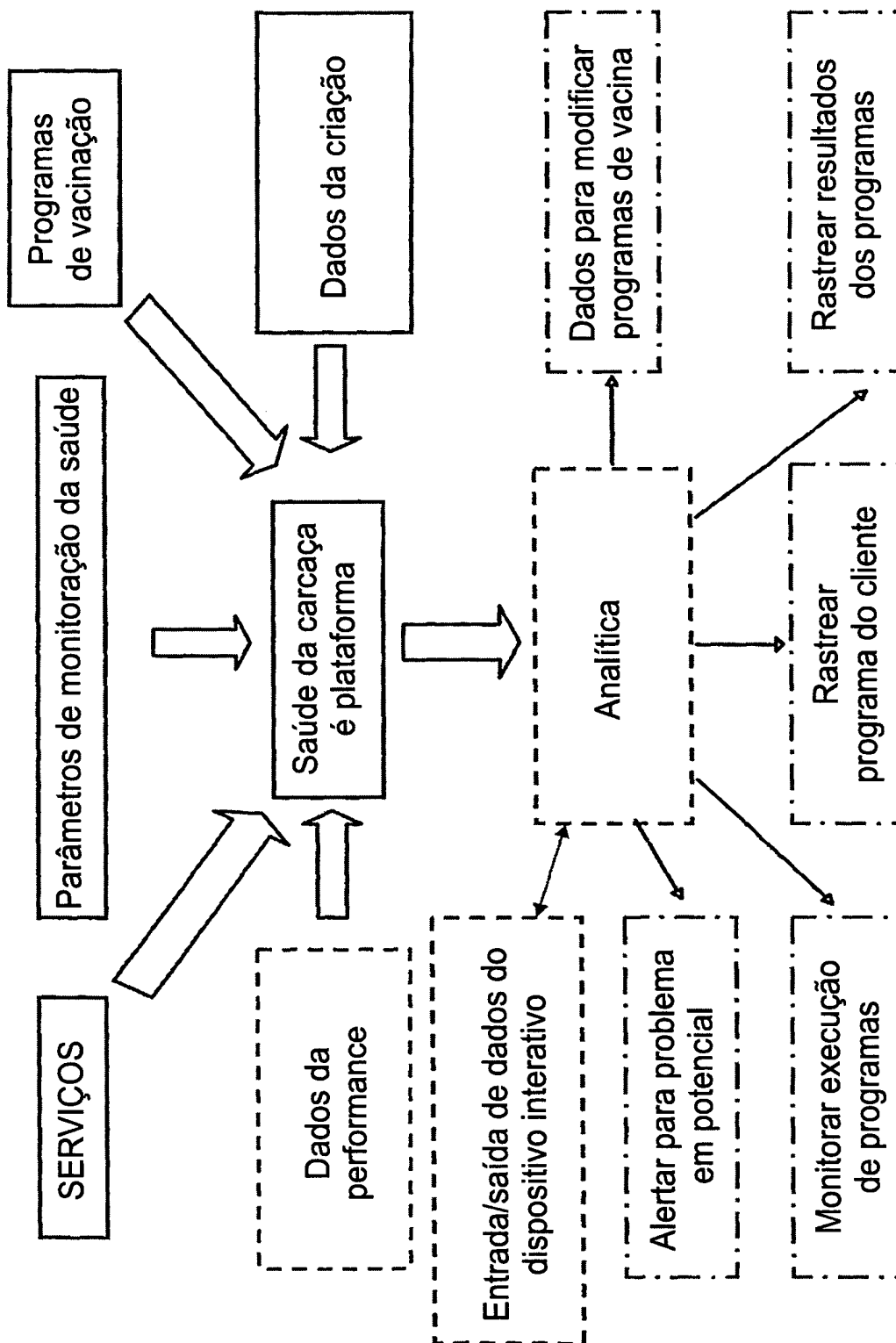


FIGURA 7

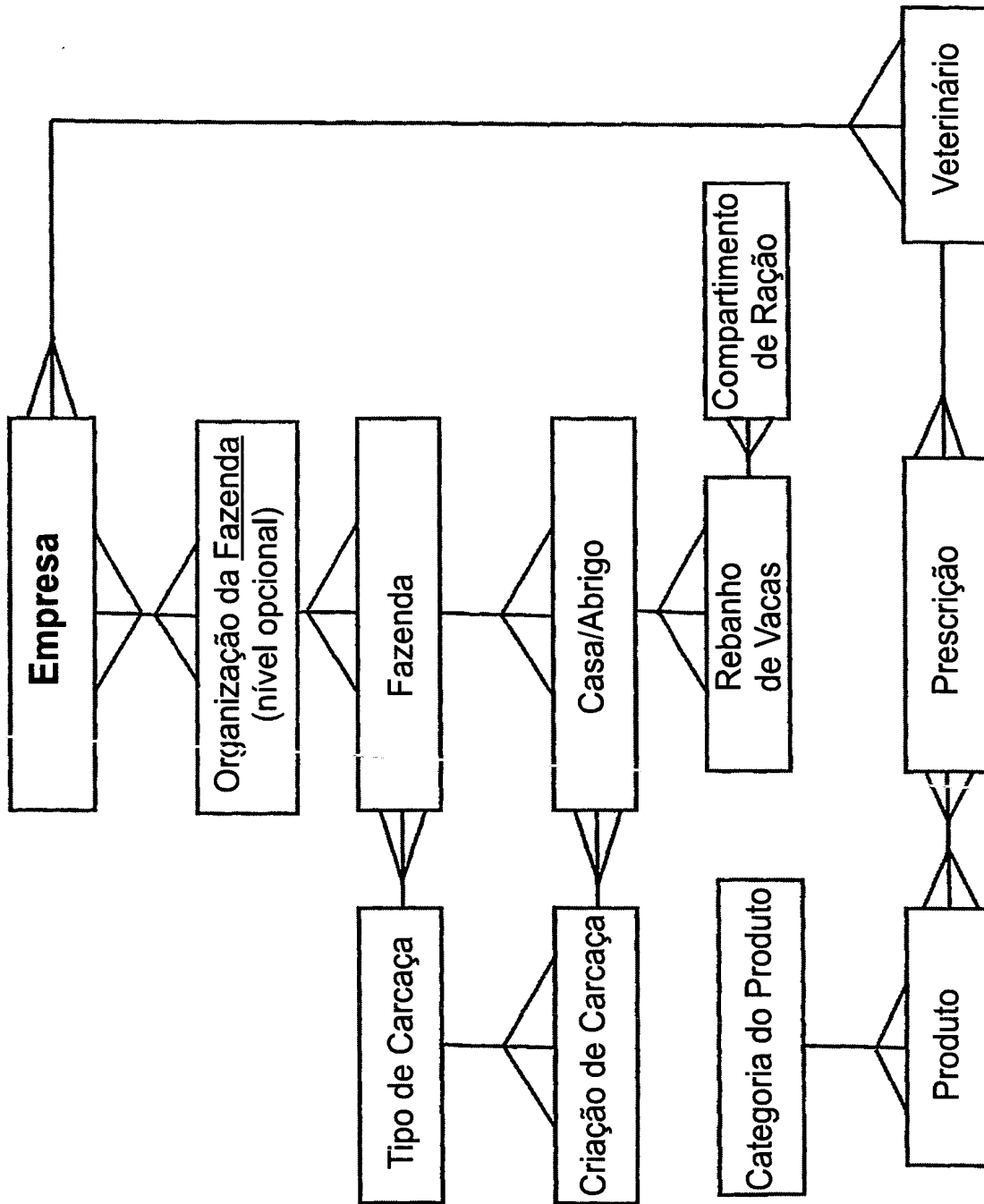


FIGURA 8

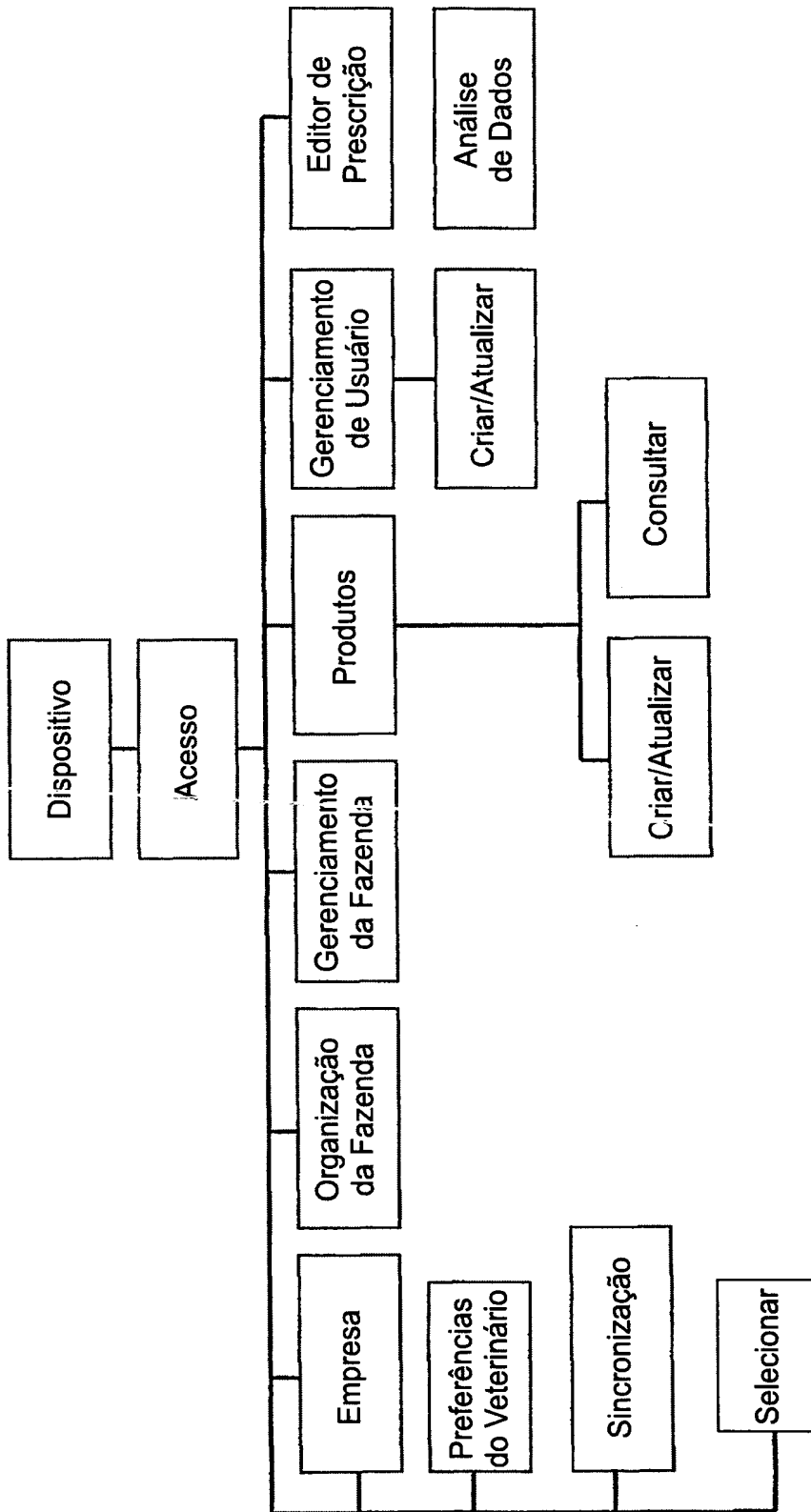


FIGURA 9A

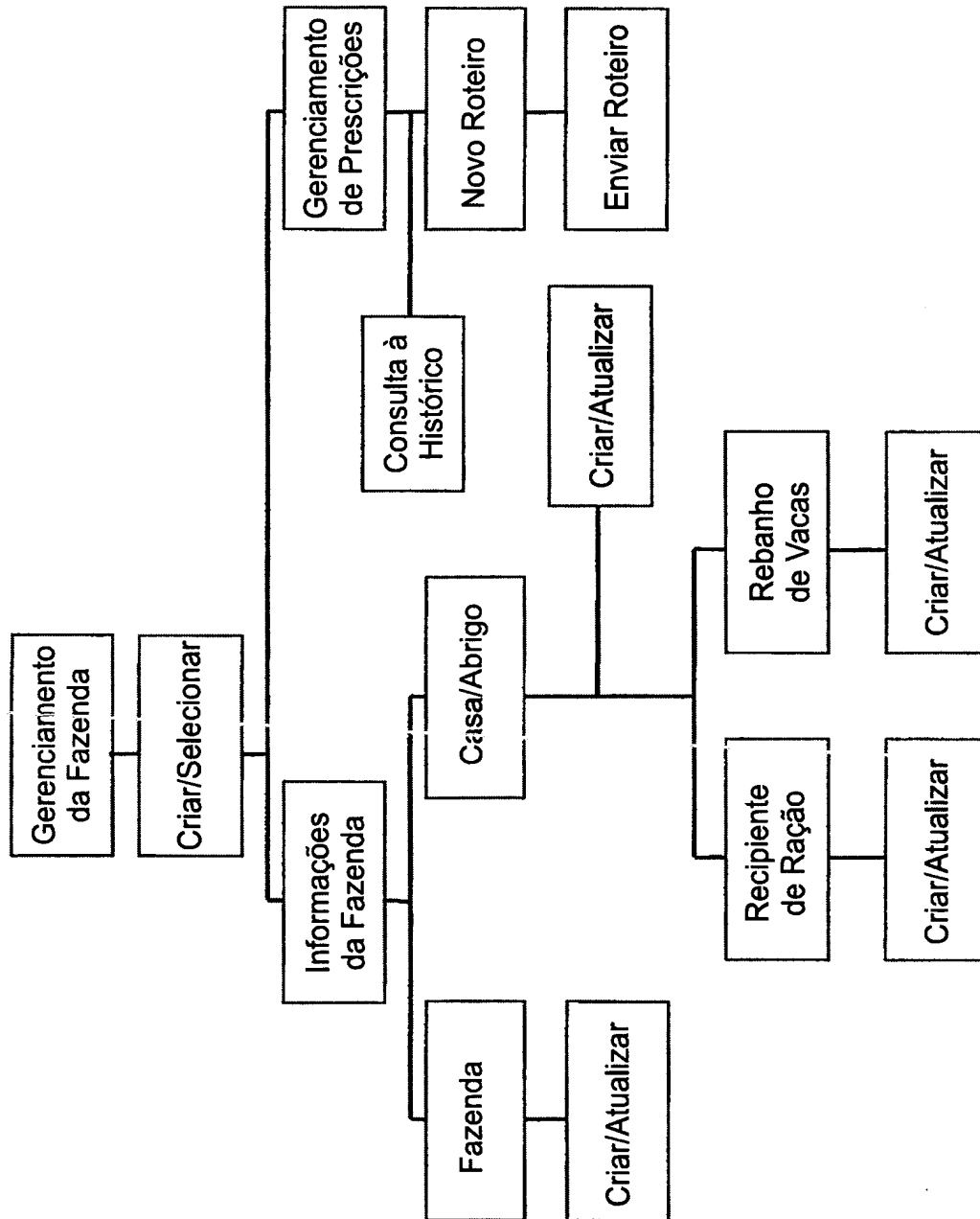


FIGURA 9B

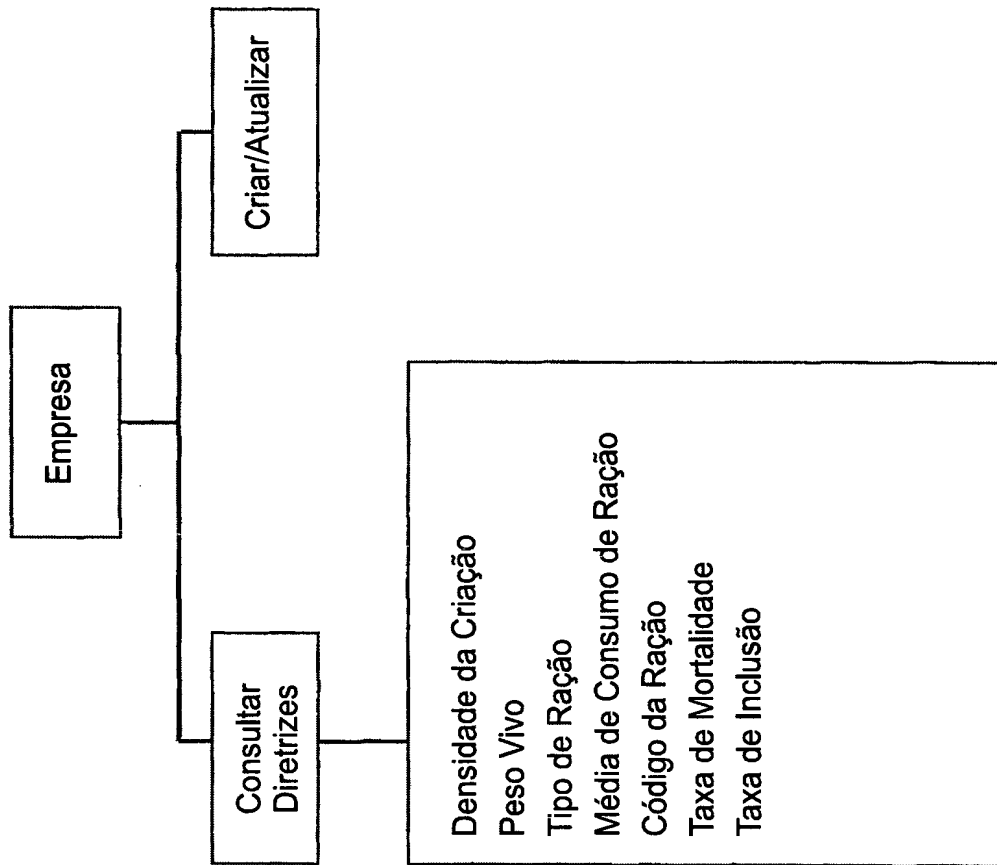
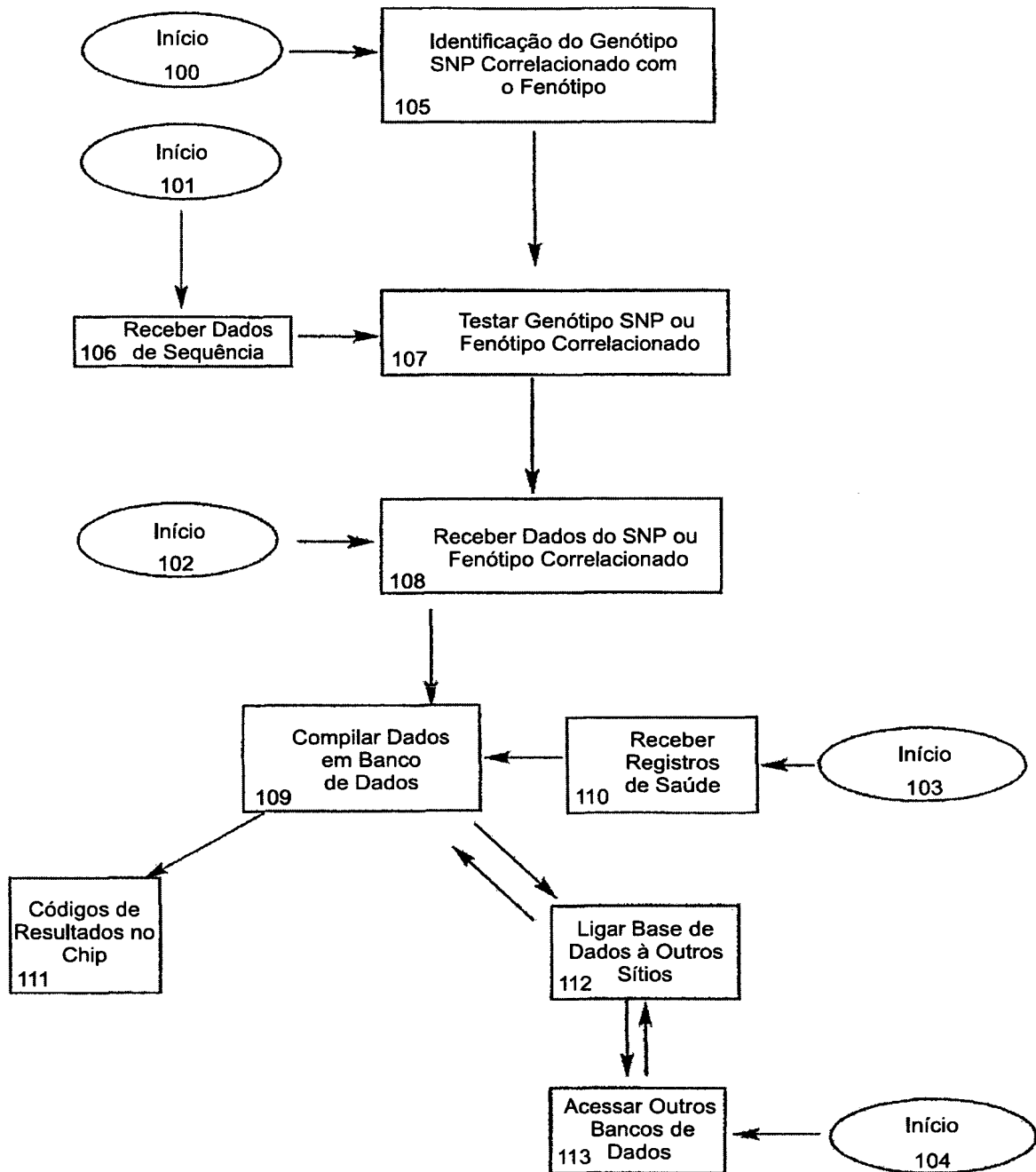


FIGURA 9C

**FIGURA 10**

Resumo da Patente de Invenção para: **"POLIMORFISMOS EM GENE DE FATOR A DE TRANSCRIÇÃO MITOCONDRIAL ("TFAM") E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA"**.

A regulação fisiológica de ingestão, crescimento e particionamento de energia em animais está sob o controle de genes múltiplos que podem ser importantes candidatos para resolver a variação genética de características economicamente relevantes na produção de carne bovina. A presente invenção se refere à identificação de únicos polimorfismos de nucleotídeos (SNPs), dentro dos genes bovinos que codificam fator A de transcrição mitocondrial ("TFAM") e suas associações com características economicamente relevantes na produção de carne bovina. A invenção engloba adicionalmente métodos e sistemas, incluindo processos baseados em redes, para gerenciar os dados de SNP e outros dados relacionados a animais específicos e a rebanhos de animais, cuidados veterinários, dados de controle de qualidade e diagnósticos e o gerenciamento de animais domésticos, que, baseados no genótipo, têm características de qualidade de carne previsíveis, condições pecuárias, bem-estar animal, informações de segurança alimentar, auditoria de processos existentes e dados a partir de locais no campo.