

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA  
MIOSTATINA EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL**

**Sandra Rodrigues Xavier**

**CAMPO GRANDE, MS  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA  
MIOSTATINA EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL**

*Prospecting for polymorphisms in the myostatin gene in Senepol breed*

**Sandra Rodrigues Xavier**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Bahiense Ferraz Filho**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fabiane Siqueira**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciência Animal

Área de concentração: Produção Animal

**CAMPO GRANDE, MS  
2014**

Certificado de aprovação

**SANDRA RODRIGUES XAVIER**

PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA EM BOVINOS DA RAÇA  
SENEPOL

Prospecting for polymorphisms in the myostatin gene in Senepol breed

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato Grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado (a) em: 27/03/2014

**BANCA EXAMINADORA:**



\_\_\_\_\_  
Doutora Fabiane Siqueira  
(EMBRAPA/CNPGC) - (coorientadora)



\_\_\_\_\_  
Doutora Andréa Alves do Egito  
EMBRAPA/CNPGC



\_\_\_\_\_  
Doutor Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes  
EMBRAPA/CNPGC

*À minha querida e amada  
família: meus pais Edir  
Rodrigues Xavier e Manoel  
Bento Xavier, ao meu filho Yuri  
Xavier Borges, ao meu irmão  
Angelson Rodrigues Xavier e às  
pessoas especiais que me  
apoiaram e incentivaram durante  
esta jornada e em todos os  
momentos da minha vida.*

*Dedico...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de todas as coisas, pela dádiva da vida, pelo privilégio de poder aprender, por me fazer superar as adversidades e ter me abençoado para que este sonho nascesse e fosse adiante. E, principalmente, por ter sido meu suporte na busca de soluções para o que parecia impossível.

À minha família, pelo apoio incondicional, pelo amor e carinho a mim dedicados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Bahiense Ferraz Filho, pelos ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos pela orientação, motivação e confiança depositada.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Fabiane Siqueira, exemplo de dedicação profissional, meus sinceros agradecimentos pela sua fundamental participação em minha orientação, pela confiança em mim depositada e, principalmente, por sua amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pelos conhecimentos ministrados durante o curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pela oportunidade oferecida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Gado de Corte, pela infraestrutura laboratorial.

À Dr<sup>a</sup>. Anna Beatriz Robotton Ferreira pela atenção despendida, por todas as sugestões e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz, Dr. Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes, Dr. Roberto Augusto de Almeida Torres Junior e à Dr<sup>a</sup>. Andrea Alves do Egito, que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho e em especial pela amizade.

A equipe do Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal da Embrapa Gado de Corte. Em especial, aos colegas Isabella Maiumi Zaidan Blecha, Gustavo Garcia Santiago, Thalles Policarpo de Carvalho, Isadora Inácio Souza, Franciele da Silva Oliveira e Paula Adas colaboradores na realização deste trabalho.

Aos colegas de mestrado e doutorado, pelos laços de amizade firmados durante o período do curso.

A todos que contribuíram de alguma forma para o êxito do trabalho.

**EPIGRAFE**

- 1 O senhor é o meu pastor, nada me faltará.*
- 2 Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.*
- 3 Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.*
- 4 Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.*
- 5 Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.*
- 6 Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do senhor por longos dias.*

*Salmo: 23  
(Bíblia Sagrada)*

## RESUMO

Xavier, S. R. **Prospecção de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos da raça Senepol**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Objetivou-se prospectar polimorfismos no gene da miostatina (*GDF-8*) em bovinos da raça Senepol, que apresentam o fenótipo da musculatura dupla. Bovinos com esta característica apresentam boa conformação, alto rendimento de carcaça, mas com menor quantidade de gordura subcutânea e intramuscular. Porém, existem algumas desvantagens relacionadas a este fenótipo como redução do tamanho dos órgãos internos, susceptibilidade a doenças respiratórias, estresse e distocia. Polimorfismos no gene *GDF-8*, responsável pelo controle do crescimento muscular, têm sido implicados no desenvolvimento da hipertrofia muscular em diversas raças de bovinos na literatura. Ainda não existem relatos a respeito da ocorrência desta característica na raça Senepol, porém na prática têm sido observados indivíduos que apresentam o fenótipo. Dessa forma, objetivou-se identificar polimorfismos no gene *GDF-8* em animais portadores da musculatura dupla, visando fornecer dados informativos que possam subsidiar programas de melhoramento genético da raça Senepol, por meio de seleção assistida por marcadores moleculares. Foram analisados dois animais provenientes do rebanho Puro de Origem Importada (POI) da Embrapa Gado de Corte que apresentam o fenótipo. Para o sequenciamento, foram desenhados oito pares de *primers* a partir dos três éxons e das duas regiões não traduzidas (UTRs) do gene *GDF-8*. Para a identificação de mutações, os produtos amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram sequenciados e as sequências alinhadas contra o genoma de referência (*Bos taurus*; versão Btau\_4.6.1). Foram encontradas 11 mutações, uma das quais configura uma deleção de 11 pares de bases no éxon 3 e que foi previamente associada ao fenótipo em outras raças. Essa mutação insere um códon de parada prematuro no gene *GDF-8* interrompendo a produção da proteína miostatina. Com base nessas informações, os produtores poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações, facilitando a tarefa tanto da introdução ou da eliminação dos alelos de interesse na população.

**Palavras-chave:** *GDF-8*, marcadores moleculares, musculatura dupla, mutação

## ABSTRACT

XAVIER, S. R. 2014. **Prospecting for polymorphisms in the myostatin gene in Senepol breed.** 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The objective of this work was to prospect polymorphisms in the myostatin gene (*GDF-8*) in Senepol cattle that present the double muscling phenotype. Cattle with this trait have an excellent conformation and high carcass yield, but with lower content of intramuscular and subcutaneous fat. However, there are some disadvantages related to this phenotype as reducing the size of internal organs, susceptibility to respiratory diseases, stress and dystocia. Polymorphisms in the *GDF-8* gene, which controls muscle growth, have been implicated in the development of muscular hypertrophy in many breeds of cattle. There are no reports in the literature regarding the occurrence of this trait in the Senepol breed, even though individuals who present the phenotype have been observed in practice. Therefore, the objective of this work was to identify polymorphisms in the *GDF-8* gene in animals presenting double muscling phenotype, thus providing informative data that can be used in genetic improvement programs by marker assisted selection in the Senepol breed. Two animals presenting the phenotype from the Puro de Origem Importada (POI) herd at Embrapa Beef Cattle were analyzed. Eight pairs of primers were designed to generate PCR products from the 3 exons and 2 untranslated regions (UTRs) of the myostatin gene. The amplified products were sequenced and the sequences aligned against the reference genome (*Bos taurus assembly Btau\_4.6.1*) for identification of mutations. Eleven mutations were identified in the *GDF-8* gene, one of which was an 11 base pair deletion in exon 3 that had been previously associated with the phenotype in other breeds and known for inserting a premature stop codon interrupting the production of myostatin protein. Based on this information, producers can make more efficient the process of selection of bulls to be parents of the next generation, facilitating the task of both the introduction and the elimination of alleles of interest in the population.

**Key words:** double muscling, *GDF-8*, molecular markers, mutation

## Lista de Ilustrações

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	3
<b>Figura 1.</b> Touro Senepol (ABCB Senepol, 2014).....	5
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
<b>Figura 1.</b> Estrutura do gene da miostatina mostrando as regiões amplificadas pelos oito pares de <i>primers</i> utilizados. Mutações em regiões codificantes e UTRs descritas na literatura são representadas pelas barras azuis (mutações sinônimas), barras amarelas (mutações com troca de aminoácido ou mutação <i>missense</i> ) e barras vermelhas (mutações com inserção prematura de códon de parada ou mutação <i>nonsense</i> ). Cada mutação está descrita com o nome utilizado na literatura e/ou o identificador do banco de dados dbSNP do <i>GeneBank</i> . Nomes na cor verde representam os polimorfismos encontrados a partir dos animais da raça Senepol utilizados neste trabalho. A caixa vermelha identifica a única mutação sem sentido ou <i>nonsense</i> encontrada nestes animais.....	39

**Lista de Tabelas**

	Páginas
<b>Tabela 1.</b> Mutações no gene da miostatina em difrente raças bovinas.....	16
<b>Tabela 2.</b> Posição dos nucleotídeos no gene <i>GDF-8</i> , as sequências dos <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizadas no sequenciamento, tamanho dos fragmentos amplificados ( <i>amplicons</i> ) e temperatura de anelamento (T) padronizada para cada par de <i>primer</i> .....	34
<b>Tabela 3.</b> Protocolo de PCR de amplificação do gene <i>GDF-8</i> .....	34
<b>Tabela 4.</b> Descrição e localização dos polimorfismos e o código no dbSNP.....	38

## SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Considerações gerais.....	3
1.2 A raça Senepol.....	5
1.2.1 A história dos bovinos da raça .....	5
1.2.2 Características gerais da raça .....	6
1.3 Marcadores genéticos.....	7
1.4 Miogênese.....	7
1.4.1 Hipertrofia e hiperplasia celular.....	9
1.5 O gene da miostatina.....	11
1.5.1 Histórico da musculatura dupla.....	11
1.5.2 Descrição, localização e função biológica.....	14
1.5.3 Mutações nas diferentes raças bovinas.....	14
2 OBJETIVO E HIPÓTESE.....	18
3 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
4 ARTIGO.....	30
4.1 PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA MIOSTATINA EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL.....	30
4.2 INTRODUÇÃO.....	31
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.3.1 Origem dos animais e coleta de sangue.....	32
4.3.2 Extração e quantificação de DNA.....	33
4.3.4 Amplificação do DNA do gene <i>GDF-8</i> por PC.....	33
4.3.5 Eletroforese.....	35
4.3.5 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA.....	35
4.3.6 Alinhamento de sequências.....	36
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.5 CONCLUSÕES.....	41
5 REFERÊNCIAS.....	43
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
7 ANEXOS.....	47
7.2 Anexo I - Geneologia: número de registro do animal 6000.....	47

7.3 Anexo II - Geneologia: número de registro do animal 6013.....	48
7.1 Anexo III - Extração de DNA de leucócitos adaptado de Regitano e Coutinho (2001).	48

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, que, em 2012, contava com um rebanho de 1,3 bilhão de animais (USDA, 2012). Atualmente, o Brasil possui um rebanho bovino de aproximadamente 193,4 milhões cabeças, sendo o maior rebanho bovino comercial do mundo (ANUALPEC, 2013). Além de abastecer um respeitável mercado interno que apresenta cerca de 201 milhões de habitantes, com um consumo médio anual per capita de 37,3 kg/habitante/ano (IBGE, 2013), o país ainda exportou em 2012, cerca de 1,58 milhão de toneladas equivalente de carcaça (ABIEC, 2013).

A cada ano cresce a participação brasileira no comércio internacional de carne bovina. Segundo as estimativas do Ministério da Agricultura (MAPA, 2013), até 2020 a produção nacional de carnes suprirá 45% do mercado mundial. Porém, mesmo com estimativas tão promissoras, a pecuária de corte nacional ainda está em busca de melhores índices em termos de precocidade e produtividade dos rebanhos.

Uma alternativa é a seleção e a utilização de animais produtivos, que sejam adaptados às condições climáticas do Brasil Central, como a raça Senepol (*Bos taurus taurus*). Os bovinos desta raça são recursos genéticos com amplo potencial para produção de carne, devido às suas características, tais como tolerância ao calor, boa conversão alimentar, longevidade e facilidade ao parto (ABCB Senepol, 2014).

Tradicionalmente, o melhoramento genético pelo uso da genética quantitativa tem sido um recurso largamente utilizado pelos produtores, sendo baseado no conhecimento dos parâmetros genéticos da população, tais como herdabilidade, variância genética e correlações genéticas para as características de interesse (Walsh, 2000; Dekkers & Hospital, 2002). Apesar da obtenção de resultados positivos, a eficiência da seleção é diminuída em características de baixa herdabilidade, de difícil mensuração, que não podem ser diretamente mensuradas ou ainda, que apresentam correlações genéticas negativas (Berglund, 2008; Oltenacu & Broom, 2010; Rosa & Fragoso, 2010; Walker, 2013). A eficiência alimentar, o desenvolvimento ponderal, a resistência a doenças, as características reprodutivas, adaptação e longevidade, o rendimento e qualidade de carcaça, podem ser citadas como características que apresentam estas propriedades.

A maioria das características ligadas à produção apresenta herança poligênica, ou seja, depende da variação alélica em um grande número de locos e sofrem influência de fatores ambientais (Martinez & Machado, 2002). A genética molecular é considerada uma ferramenta

complementar aos métodos tradicionalmente empregados no melhoramento genético e visa identificar e mapear os genes e os marcadores moleculares que interferem na expressão de características quantitativas de relevância econômica, com o intuito de melhorar a compreensão do controle genético de características complexas (Regitano & Coutinho, 2001; Dekkers & Hospital, 2002). Além disso, permite alta eficiência seletiva, rapidez na obtenção de ganhos genéticos e contribui para redução de custos com os testes de progênie, pois permite que o potencial genético de um animal seja determinado antes mesmo da expressão do seu fenótipo (Regitano & Coutinho, 2001; VanRaden et al., 2009).

Neste contexto, mutações no gene da miostatina (*GDF-8*) estão associadas com o fenótipo de musculatura dupla, frequentemente encontrado em algumas raças bovinas como Belgian Blue, Piamontês e Asturiana de los Valles (McPherron & Lee, 1997; Lee & McPherron, 2001; Dunner et al., 2003). As carcaças destes animais que apresentam o fenótipo hipertrófico são consideradas superiores, resultando em maior produção de carne e maior proporção de cortes nobres, quando comparadas aos outros indivíduos que não possuem esta característica, porém com menor quantidade de gordura subcutânea e intramuscular (Wheeler et al., 2001; Fiems, 2012). Entretanto, existem algumas desvantagens relacionadas a este fenótipo tais como a redução do tamanho dos órgãos internos, aumento da susceptibilidade a doenças respiratórias e ao estresse, distocia e redução de fertilidade (McPherron & Lee, 1997; Potts et al., 2003; Dunner et al., 2003).

Até o momento, foram descritos na literatura para diversas raças bovinas alguns marcadores moleculares que permitem a detecção dos indivíduos portadores, normais e afetados para esta característica, facilitando a tarefa, tanto da introdução controlada dos alelos, como a eliminação destes nas populações. Além disso, este fenótipo pode ser desejável ou não para os produtores em função dos objetivos de produção e seleção em bovinos de corte (Lee & McPherron, 2001; Fiems, 2012).

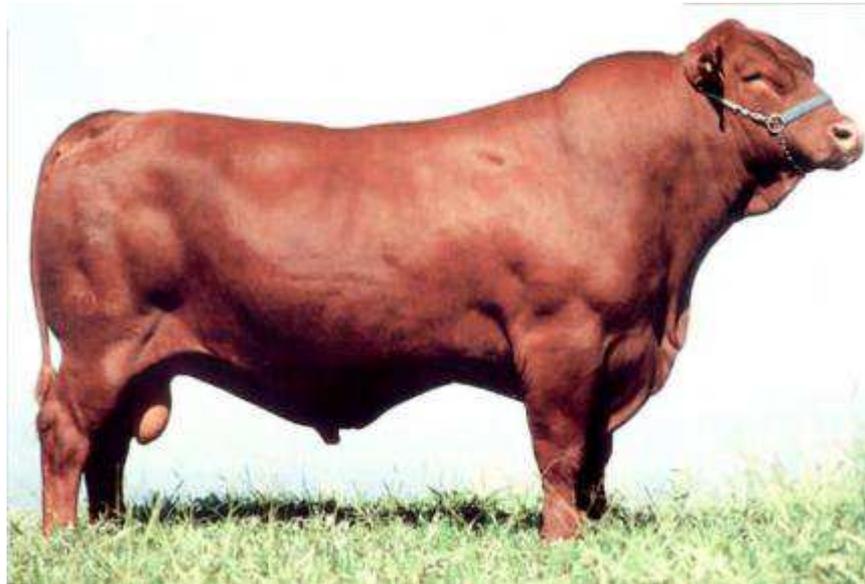
Na literatura não há relatos a respeito da ocorrência da musculatura dupla em bovinos da raça Senepol, porém na prática tem sido observados indivíduos que apresentam este fenótipo. Deste modo, a detecção precoce de polimorfismos associados a musculatura dupla poderá fornecer dados informativos que possam subsidiar os programas de melhoramento genético da raça Senepol por meio de seleção assistida por marcadores.

## 1.2 Raça Senepol

### 1.2.1 História dos bovinos da raça Senepol

Alguns bovinos da raça N'Dama foram importados do Senegal (África) para a ilha de Saint Croix (Caribe) em 1800, por Henry C. Neltropp que mantinha 250 animais N'Dama puro sangue em sua fazenda. Os animais N'Dama eram bastante adaptados ao calor, resistentes a doenças, insetos, parasitas e tinham boa habilidade de sobrevivência em regiões de pastagens pobres, sendo excelente alternativa para o Caribe (Cianzio, 1996).

A raça Senepol teve origem em 1918, quando o criador Bromlay Neltropp (filho de Henry um dos maiores criadores de N'Dama) decidiu desenvolver um bovino que combinasse aptidões em níveis superiores de produção com as condições ambientais na ilha Saint Croix. Naquele ano, foi introduzida a genética de Red Poll no rebanho de Neltropp, com o intuito de melhorar a habilidade materna, fertilidade e de tornar os animais mochos (ABCBS, 2014). Com o isolamento na ilha ocorreu forte pressão de seleção dos animais, sendo caracterizada pela seleção contínua para habilidade de sobrevivência a difíceis condições climáticas e nutricionais, resistindo os mais aptos. O resultado foi a raça Senepol (Figura 1), formada a partir do cruzamento entre as raças N'Dama (taurino africano) e Red Poll (taurino britânico) (Cianzio, 1996).



**Figura 1:** Touro Senepol (ABCBS, 2014).

Em 2000, vieram os primeiros animais para o Brasil, importados dos melhores rebanhos dos Estados Unidos e da Ilha Saint Croix. Com essa genética de qualidade e o

empenho dos selecionadores brasileiros, o Brasil está se tornando um celeiro da genética mundial do Senepol (Cianzio, 1996; ABCBS, 2014).

### **1.2.2 Características gerais da raça**

Esta raça é, teoricamente, 100% taurina adaptada aos trópicos e resistentes às doenças tropicais. Apresenta ainda alta fertilidade, bom acabamento de carcaça e qualidade de carne. O nome Senepol foi registrado em 1954 por “Sene” de Senegal e “Poll” de Red Poll (Ribeiro et al., 2010; ABCBS, 2014).

A adaptação ao clima tropical é uma característica peculiar da raça Senepol, lhe confere tolerância ao calor, resistência a endo e ectoparasitas, alta conversão alimentar, precocidade sexual, comportamento dócil e apresenta de caráter mocho. Algumas características corpóreas contribuem para esta rusticidade: pêlos curtos e finos de cor vermelha escuro a claro que permitem suportar altas temperaturas (Olson, 2003; Ribeiro et al., 2006). As fêmeas possuem excelente habilidade materna, facilidade de parto, vigor dos bezerros e baixo custo de manutenção (Hammond et al., 1996; Ribeiro et al., 2008; ABCBS, 2014).

Além da criação de animais puros de origem (PO), a raça Senepol é bastante utilizada no cruzamento industrial, principalmente no cruzamento rotacionado com três raças para abate terminal (Zadra, 2003), com a finalidade de produzir animais mais pesados a desmama (Chase et al., 1998), ao sobreano (Santos et al., 2010) e ao abate, com excelente rendimento de carcaça e qualidade de acabamento (Pereira et al., 2004).

### **1.3 Marcadores genéticos**

Os marcadores moleculares referem-se a toda e qualquer característica herdável presente no DNA que diferencie dois ou mais indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Regitano & Coutinho, 2001; Gonçalves, 2008; Dias-Salman et al., 2009). Estas marcas são alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA, denominadas de polimorfismos.

Os marcadores podem ser considerados uma ferramenta alternativa para a melhor compreensão do controle genético de características complexas, por meio da identificação de genes que interferem na expressão de características de relevância econômica (Coutinho et al., 2010). Ao mesmo tempo, possibilitam a geração de informações sobre identidade genética, diversidade, mapeamento genético, frequências gênicas, detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados às características de produção, entre outras (Ferreira &

Grattapaglia, 1998; Coutinho et al., 2007; Rosa & Fragoso, 2011). Além disso, os marcadores moleculares apresentam alto grau de polimorfismo, e por não sofrerem influência do ambiente podem ser analisados em qualquer estágio de desenvolvimento (Regitano & Coutinho, 2001).

O desenvolvimento de metodologias de análises moleculares tem permitido o estudo do genoma e das variações existentes, tanto em regiões codificadoras, quanto naquelas cuja função permanece pouco compreendida ou até mesmo desconhecida para muitas espécies de interesse zootécnico. As técnicas de biologia molecular têm sido úteis para a identificação dos polimorfismos genéticos relacionados com características de relevância econômica por meio da genotipagem de populações animais (Dias-Salman et al., 2009; Carvalho et al., 2009). A obtenção prévia desses genótipos poderá auxiliar na orientação de acasalamentos e transferências de embriões nos plantéis disponíveis para o melhoramento (Coutinho et al., 2010).

Neste contexto, os programas de melhoramento genético de raças bovinas utilizadas para produção de carne podem se beneficiar do uso de marcadores moleculares na sexagem de embriões, em testes de paternidade e, principalmente, na seleção assistida por marcadores. Esta seleção consiste em alterar a frequência dos alelos desejáveis de maneira mais rápida e eficiente, reduzindo o intervalo de gerações (Potts et al., 2003; Dias-Salman et al., 2009).

#### **1.4 Miogênese**

Em sistemas de produção de carne, o conhecimento dos fatores que determinam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos e do organismo como um todo é fundamental para a adequação dos programas de melhoramento genético, de manejo nutricional, ambiência, da definição da idade de abate, entre outros (Pardi et al., 1993). O crescimento e o desenvolvimento animal ocorrem desde a concepção, sendo o crescimento caracterizado pelo aumento de peso, comprimento, altura e circunferência em função da idade. Já, o desenvolvimento implica em mudanças na conformação corporal e das funções do organismo (Pardi et al., 1993; Rodrigues Filho et al., 2011).

A musculatura animal é toda originária do mesoderma. Durante o processo de desenvolvimento embrionário, ocorre a formação do miótomo ou folha muscular, na região do somito. As células do miótomo vão se transformar em mioblastos, ou seja, células precursoras das fibras musculares somáticas ou fibras musculares esqueléticas (Pardi et al., 1993). O desenvolvimento do tecido muscular é regulado pela miogênese que resulta da ativação de vários mecanismos bioquímicos e fisiológicos que se desenvolvem em etapas (sinalização, ativação, determinação e diferenciação celular) e respondem pelo crescimento, manutenção e

reparos das fibras musculares, que de forma direta impacta a qualidade da carne bovina (Mauro, 1961; Rodrigues Filho et al., 2011).

Miogênese é uma palavra que deriva do grego e significa, mio (músculo) e genesis (origem). Durante a fase embrionária desenvolvem-se três camadas celulares, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme que são células embrionárias que permitirão a formação dos tecidos e órgãos do novo ser (Mauro, 1961; Johnston et al., 2011).

O processo da miogênese pode ser dividido em duas fases: a determinação e a diferenciação. A determinação é o processo no qual as células pluripotentes estão se multiplicando e são mobilizadas para o processo miogênico, se transformando em mioblastos. Durante a miogênese no embrião, os mioblastos proliferam, migram, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e, posteriormente, fibras musculares. A diferenciação ocorre quando os genes dos miotúbulos iniciam sua expressão músculo-específica, e então os mioblastos param de se multiplicar, e as fibras musculares passam a crescer quase que somente em volume (Ludolph & Konieczny, 1995; Rehfeldt et al., 2000; Silva et al., 2002; Fermo et al., 2008).

Todos os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores de regulação miogênica (*Myogenic Regulatory Factors* -MRFs), dos quais fazem parte a MioD (*Myogenic determination gene D*), Myf5, miogenina e MRF4 (Watabe, 1999; Weintraub, 1993; Watabe, 2001). Os MRFs possuem um domínio central conservado conhecido como *E-box*, o qual é importante para que os MRFs reconheçam uma sequência no DNA presente na região promotora da maioria dos genes músculos-específicos (Weintraub, 1993). Durante a miogênese, os MRFs (MyoD e Myf5) determinam a proliferação dos mioblastos ou das células satélites, enquanto a expressão da miogenina e MRF4 determina o processo de diferenciação dos mioblastos ou das células satélites (Ludolph & Konieczny, 1995; Watabe 1999, Rescan, 2001; Watabe, 2001; Israels & Israels, 2001). O crescimento muscular é controlado positivamente e negativamente por uma série de fatores transcricionais e de crescimento, que controlam a proliferação e diferenciação das células satélites. Entre esses fatores estão os MRFs, a miostatina e o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) (Lee et al., 2009).

A principal função da miostatina é regular negativamente o crescimento muscular. Essa proteína controla a formação de novas fibras musculares e inibe a hipertrofia das fibras existentes, por meio da diminuição da expressão dos MRFs (Langley et al., 2002; Lee et al., 2009). Esta proteína é inicialmente expressa durante a embriogênese, nos somitos e no músculo esquelético em desenvolvimento (McPherron et al., 1997; Thomas et al., 2000).

No músculo estriado esquelético, a expressão gênica da miostatina ocorre, ao longo do desenvolvimento e do crescimento muscular. No início do desenvolvimento embrionário, onde o crescimento muscular ocorre, predominantemente, por hiperplasia, os níveis de expressão de miostatina, são baixos, aumentando significativamente nos estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia torna-se menos intensa (Patrino et al., 2008).

A via de sinalização da miostatina, assim como de outros genes músculo específicos, é muito importante para a manutenção do fenótipo muscular. A miostatina por meio da ligação aos receptores específicos na membrana da célula-alvo, ativa várias proteínas da família *Smads* formando complexos, promovendo a interação dessas. O complexo de proteínas *Smads* é translocado para o núcleo, onde interage com proteínas da maquinaria de transcrição, regulando a transcrição de genes-específicos e inibindo a ação da via sinalizada pela serina/treonina quinase e o IGF-I/Akt (proteína quinase B) (Watabe, 1999, Watabe, 2001; Rescan, 2001; Wozniak et al., 2005; Glass, 2010). Desta forma, proteínas responsáveis pela degradação proteica deixam de ser inibidas e passam a atuar, tornando-se ativas (Matsakas & Patel, 2009; Johnston et al., 2011).

A miostatina é sintetizada associada ao seu pro-peptídeo sinal, o qual a mantém no seu estado latente (Hill, 2003). Quando secretada, a miostatina passa por dois processos de clivagem induzidos, provavelmente, por metaloproteases, para se tornar biologicamente ativa. Primeiro: são removidos 23 aminoácidos e, em seguida, ocorre uma clivagem nos aminoácidos 263-266. Segundo: são gerados fragmentos N-terminal e C-terminal, originando uma molécula biologicamente ativa (Matsakas & Patel, 2009; Guizoni et al., 2010). Uma vez ativado, o dímero C-terminal da miostatina é capaz de se ligar a receptores e ativar o sinal de transdução em cascata na célula alvo (Guizoni et al., 2010).

O conhecimento fisiológico e bioquímico de como ocorre a deposição da musculatura animal é uma ferramenta muito importante para a manipulação do crescimento, para se obter melhores índices produtivos e maior quantidade de carne e qualidade de carcaça, uma vez que estas variáveis são influenciadas por fatores genéticos, ambientais e pela interação entre estes.

#### **1.4.1 Hipertrofia e hiperplasia celular**

Para o crescimento inicial, o músculo necessita da síntese das complexas moléculas protéicas específicas do tecido a partir dos aminoácidos, da correta disposição das proteínas sintetizadas para a formação dos elementos estruturais próprios do músculo como as fibras, além da diferenciação e desenvolvimento das fibras de acordo com o tipo do músculo. A

atividade hormonal intervém na construção das proteínas, atuando sobre as enzimas sintetizantes (Pardi et al., 1993).

Porém, durante o desenvolvimento embrionário, algumas células precursoras (progenitoras miogênicas) não se fundem e permanecem como células indiferenciadas no músculo. Estas células possuem a capacidade de se proliferar e também têm o potencial de se diferenciar e se fundir com as fibras musculares existentes, sendo denominadas de células satélites ou mioblastos adultos (Vasyutina et al., 2007). Estas células constituem a principal fonte celular para a regeneração e para o processo de crescimento muscular pós-natal (Mauro, 1961; Johnston et al., 2000; Buckingham, 2003).

O crescimento dos tecidos musculares, adiposo e ósseo, que representam a maior parte da carcaça bovina, apresenta características alométrica, hiperplásica que vai da concepção ao nascimento e hipertrófica, após o nascimento (Pardi et al., 1993). Durante o período embrionário e fetal, o crescimento do músculo é caracterizado pelo aumento no número de fibras musculares e seu agrupamento, que é conhecido como hiperplasia, e na grande maioria das espécies animais não ocorre aumento no número de células musculares após o nascimento. Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resultam na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em fibras musculares (Stellabotte & Devoto, 2007).

No segundo terço de gestação, outros mioblastos utilizam as miofibrilas primárias como suporte para alinharem-se e formar as fibras secundárias. As fibras secundárias passam por hipertrofia e se ligam a outros miotubos por meio de uma forte ligação permitindo a comunicação célula a célula. O período de mioblasto fetal, quando as fibras musculares secundárias são formadas, determina o número final de fibras no indivíduo adulto (Rodrigues Filho et al., 2011).

Durante o período de crescimento pós-natal do animal, o crescimento muscular ocorre somente por hipertrofia (aumento do tamanho da célula), principalmente, pelo acréscimo de proteína e de núcleos originados da proliferação e fusão das células satélites a célula muscular (Johnston, 1999). A hipertrofia ocorre primeiramente no sentido longitudinal da fibra pelo aumento do número de sarcômeros e, posteriormente, ocorre um aumento do diâmetro pela deposição de proteínas miofibrilares (Junqueira & Carneiro, 2004; Sandri, 2008). Portanto, o aumento do tamanho da fibra muscular está limitado por fatores genéticos e nutricionais que irão determinar a capacidade do músculo de sintetizar proteínas musculares.

## 1.5 O gene da miostatina ou *GDF-8*

### 1.5.1 Histórico da musculatura dupla

A síndrome da musculatura dupla tem sido observada em algumas raças de bovinos de corte, há alguns séculos (Bass et al., 1999). A descrição inicial do fenótipo foi feita por Culley, na Inglaterra, em 1807. Esse autor observou em animais que, provavelmente, deram origem à raça Shorthorn, um desenvolvimento muscular acima do normal e, além disso, esses indivíduos possuíam carcaças com menor cobertura de gordura (Ott, 1990; Karim et al., 2000).

Anos mais tarde surgiu uma proposta de Wriedt (1929), quanto à possível origem da musculatura dupla: uma simples alteração em um gene. A confirmação para esta sugestão, foi realizada somente em 1995, por meio do mapeamento da extremidade centromérica do cromossomo 2 bovino, onde comprovaram que a síndrome da musculatura dupla é devida a uma alteração genética simples e autossômica (Charlier et al., 1995).

A confirmação de que o fenótipo da musculatura dupla é causado por uma mutação no gene da miostatina foi feita simultaneamente por McPherron & Lee (1997) e Grobet et al. (1997), que identificaram um fator de crescimento da família *TGF- $\beta$*  (*Transforming Growth Factor -  $\beta$* ) e o chamaram de miostatina ou *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor - 8*). Desde então, têm sido observadas diferentes mutações que levam à perda da função do gene da miostatina, afetando a massa muscular e determinando o fenótipo da musculatura dupla (*double-muscling*) ou hipertrofia muscular em diversas raças bovinas (Teixeira & Oliveira, 2007; Canesin, 2009).

Os estudos realizados por McPherron & Lee (1997) demonstraram que as mutações que ocorrem nesse gene levam a alterações na função de regulação da miogênese, resultando em hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares. Definindo, dessa forma, o papel da miostatina como importante regulador negativo do desenvolvimento do músculo esquelético (McPherron & Lee; 1997; Lee & McPherron, 2001; Freking et al., 2002; Walsh & Celeste, 2005; Guizoni et al., 2010).

Os bovinos que apresentam este fenótipo são considerados animais de conformação desejável, do ponto de vista dos cortes da carcaça, uma vez que a forma do corpo corresponde à conformação que caracteriza o animal tipo "corte" (Pereira, 2008). No entanto, existem alguns problemas reprodutivos relacionados a este fenótipo tais como: dificuldade de parto (distocia), redução de fertilidade, diminuição da tolerância ao estresse e baixa viabilidade do

bezerro (Arthur, 1995). Além disso, essa condição, frequentemente, é fatal para as vacas que parem bezerros com essa característica (Arthur, 1995).

Amthor et al. (2006) relataram que uma das características físicas importante observada em bovinos que apresentam este fenótipo está no aparelho reprodutor. Estes autores observaram que a genitália externa destes animais tem características infantilizadas, ou seja, são menores que a de outros indivíduos. Além disso, nos machos, os testículos, além de menores, parecem estar mais próximos da parede abdominal (Arthur, 1995).

Outra característica importante na identificação de um animal hipertrófico pode ser observada logo após o nascimento: bezerros recém-nascidos, com esse fenótipo, apresentam a condição chamada de macroglossia (língua aumentada). Em alguns casos, a língua toma completamente a boca, fazendo com que haja dificuldade ou até impossibilidade do bezerro de se alimentar, sendo que essa característica, geralmente, desaparece após algumas semanas de vida (Goyache et al., 1996).

Quando comparados aos outros animais, os indivíduos que apresentam o fenótipo da musculatura dupla tem o dobro do número de fibras musculares e conseqüentemente maior quantidade de massa muscular, proporcionando, em média, 20% mais carne em cada animal (Novakofski et al., 1981; Kambadur et al., 1997; Potts et al., 2003; Teixeira et al., 2006a; Rosa & Fragoso, 2011). Provavelmente, em vista disso, os problemas têm sido tolerados, levando à seleção ordenada de alguns animais portadores da mutação genética ou seu uso em cruzamentos (Teixeira et al., 2006b).

Os animais que apresentavam este o fenótipo difundiram-se por vários países da Europa durante os séculos XIX e XX, devido ao uso intenso de alguns reprodutores portadores de alelos mutantes nos rebanhos europeus, visando à melhoria da eficiência do ganho de peso, características de carcaça e o aumento da musculatura (Oliver & Cartwright, 1968; Marchitelli et al., 2003).

Na Itália, Raimondi (1965) descreveu a musculatura dupla na raça Piemontês. Nesse país, a raça apresentava um amplo efetivo populacional e cerca de 80% dos animais apresentavam fenótipo de musculatura dupla, o que sugeriu a ocorrência de seleção a favor dos alelos que condicionavam essa característica (McPherron & Lee, 1997). Marchitelli et al. (2003) estudaram 0,6% da população da raça Marchigiana na Itália e identificaram a mutação denominada E291X, no gene da miostatina onde ocorre uma transversão de guanina para timina no nucleotídeo 874 no éxon 3. Diferentemente das raças Belgian Blue, Piemontês e Asturiana de los Valles, que têm muitas pesquisas a respeito desse gene, a raça Marchigiana,

até então, não apresentava dados informativos sobre o número de animais portadores dessas mutações (Teixeira & Oliveira, 2007).

Em algumas regiões da França, a carne dos bovinos com musculatura dupla era preferida pelos consumidores em função da menor quantidade de gordura, favorecendo, assim, a seleção de animais que apresentam esse fenótipo. Porém, nas regiões norte e sul essa característica foi rejeitada por completo (Goyache et al., 1996).

Nos Estados Unidos, até o final de 1920, não havia descrição da presença de animais com musculatura dupla. A síndrome foi descrita, inicialmente, em uma população da raça Hereford no leste do Estado de Nebraska. Em seguida, esta característica foi observada nesta mesma raça e em bovinos da raça Angus no Estado de Kansas (Weber & Ibsen, 1934). Em 1960, foram introduzidos, nesses rebanhos, bovinos das raças francesas tais como Charolês, Limousin e Blonde d'Aquitane, dando início à seleção para musculatura dupla e melhoria da carcaça (Ott, 1990; Teixeira & Oliveira, 2007). Entretanto, os animais que apresentavam o fenótipo da musculatura dupla foram rejeitados pela cadeia produtiva Americana por esta característica estar associada a problemas reprodutivos (Ott, 1990). Posteriormente, este fenótipo foi observado em outras raças importadas, tais como Piemontês e Belgian Blue, selecionadas para desenvolvimento extremo de musculatura que tiveram aceitação comercial em função da exigência do mercado consumidor por carne magra (Ott, 1990).

Na Espanha, somente no século XX, a hipertrofia muscular foi descrita em animais da raça Asturiana de Los Valles. Nesse país, há regiões onde os animais portadores do fenótipo foram rejeitados por completo. Entretanto, em outras regiões, desde 1940, a maioria dos animais dessa raça apresentavam o fenótipo relacionado à musculatura dupla (Goyache et al., 1996).

Na Bélgica, a raça Belgian Blue é a mais popular e o fenótipo da musculatura dupla era recorrente na população bovina (Hanset et al., 1989), indicativo de que houve seleção para animais que apresentavam esse fenótipo (Gengler et al., 1995; Goyache et al., 1996; McPherron et al., 1997; Grobet et al., 1997).

Na Austrália, a musculatura dupla foi descrita, inicialmente, por Butterfield (1966) em bovinos da raça Angus, posteriormente, Butterfield (1966) e Oliver & Cartwright (1968) descreveram este fenótipo também nas raças Shorthorn e Ayrshire.

No Brasil, Teixeira e Oliveira (2007) trabalharam com rebanhos da raça Marchigiana e detectaram uma mutação no éxon 3 do gene *GDF8*. Em função dos resultados, os autores sugeriram que os criadores estavam praticando seleção a favor dos animais portadores da mutação no referido gene. Grisolia et al. (2009) detectaram polimorfismos no gene da

miostatina em bovinos da raça Nelore. Entretanto, não conseguiram associar os polimorfismos encontrados com a ocorrência do fenótipo de musculatura dupla nesta raça, devido à posição onde ocorreu a substituição, que é referida como um domínio irrelevante para a função biológica da miostatina (McPherron & Lee, 1997; Shibata et al., 2003). Estes mesmos autores não detectaram em Nelore nenhuma das seis mutações, que ocorrem neste gene nas raças Belgian Blue, Piemontês e Asturiana de los Valles e que estão associadas ao fenótipo da musculatura dupla.

### **1.5.2 Descrição, localização e função biológica do gene *GDF8***

O genoma bovino está contido em 29 pares de cromossomos autossomos e o par sexual XX ou XY. As raças de gado doméstico são classificadas em duas subespécies: *Bos taurus taurus*, cujos animais são de origem européia e *Bos taurus indicus*, os zebuínos de origem indiana (Marris, 2009; Chelh et al., 2009; Rosa, 2010).

Nos bovinos, o gene *GDF-8* está localizado a 3,1cM (centimorgan) da região centromérica do cromossomo 2 (2q14-q15) e a análise molecular revelou que este gene é constituído por uma região não traduzida (*UTR - Untranslated Region*) na posição 5' de 133 nucleotídeos, três éxons de 373, 374 e 381 nucleotídeos e por dois introns com 1.840 e 2.033 nucleotídeos cada (Jeanplong et al, 2001; Charlier et al.,1995). Além disso, o gene possui uma UTR na posição 3' de tamanho variável (1.320, 1.431 ou 1.506 nucleotídeos) devido à variação posicional no sítio de poliadenilação, sendo constituída por um conjunto de 375 aminoácidos (Lee & McPherron, 2001; Shibata et al., 2003; Guizoni et al., 2010).

A função biológica da miostatina é inibir o desenvolvimento muscular, ou seja, esta proteína atua como um potente regulador negativo do crescimento muscular esquelético durante a miogênese, persistindo por toda a fase adulta (Thomas et al., 2000; Dias Correia & Dias Correia, 2006). Os animais que apresentam o fenótipo da musculatura dupla têm os músculos proeminentes (protuberantes), com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele (Ménissier, 1982; Amthor et al., 2006). Além dessas alterações fenotípicas esses animais apresentam aumento da massa e, conseqüentemente, maior peso da carcaça, elevada percentagem de fibras brancas, reduzida quantidade de colágeno, menor densidade óssea (cerca de 10%) e menor teor de gordura nos tecidos (Hanset, 1991; McPherron & Lee,1997).

### **1.5.3 Mutações encontradas nas diferentes raças bovinas**

Diversas raças bovinas e outras espécies animais domésticos apresentam o fenótipo da musculatura dupla (hipertrofia muscular) e várias mutações no gene *GDF8* foram detectadas e associadas a este fenótipo em bovinos (Mcpherron & Lee, 1997; Grobet et al., 1998; Miranda,

2002; Dunner et al., 2003). Essas mutações fazem com que as características fenotípicas possam ter algumas diferenças entre si, ou seja, apresentar-se com maior ou menor intensidade, dependendo do tipo da mutação, e se o animal apresenta uma ou duas cópias do alelo que confere a hipertrofia muscular (McPherron & Lee, 1997).

Atualmente, são conhecidas cerca de nove mutações (Tabela 1) que afetam o código sequencial do gene da miostatina: seis que inativam a proteína, duas mutações de mudança de sentido e uma mutação conservativa (Miranda, 2002; Gadanho, 2014). Há relatos na literatura de que essas seis mutações nas regiões codificantes do gene do *GDF-8*, causam *stop códons* prematuros, alteram a estrutura e a função da proteína (inativação da proteína) e, conseqüentemente, resultam em hipertrofia das fibras musculares (Tabela 1): nt821 (del11, ou seja, deleção de 11 pares de bases (pb) entre os nucleotídeos 821 a 831), nt419 (del17-ins10, ou seja, deleção/inserção na qual dez bases não relacionadas são inseridas no lugar de sete bases que foram deletadas no nucleotídeo 419), Q204X (C → T), E226X (G → T), E291X (G → T) e C313Y (G → A) (Kambadur et al., 1997; McPherron & Lee, 1997; Cappuccio et al., 1998; Grobet et al., 1998; Teixeira & Oliveira, 2007).

**Tabela 1-** Mutações observadas no gene da miostatina em diferentes raças bovinas

Mutações	Alteração na proteína	Raças	Autores
NT821 (del11)	Deleção de 11 pb, <i>stop codon</i> de parada prematuro no RNAm e alteração na função da proteína	Belgian Blue, South Devon, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturiana de los Valles, Rubea Gallega, Red Angus e Polish Red	McPherron & Lee (1997), Kambadur et al. (1997), Dunner et al. (1997), Smith et al. (1997), Grobet et al. (1998), Karim et al. (2000), Klauzińska et al. (2001), Prusak (2001), Dunner et al. (2003)
NT419 (del7-ins10)	Deleção de 7 pb e inserção de 10 pb, <i>stop codon</i> de parada prematuro no terminal-amino (N-terminal)	Maine Anjou	Grobet et al. (1998)
Q204X	Transição C/T, <i>stop codon</i> de parada prematuro no N-terminal	Charolês e Limousin	Grobet et al. (1998), Smith et al. (2000)
E226X	Transversão G/T, <i>stop codon</i> de parada prematuro no N-terminal	Maine Anjou	Grobet et al. (1998), Karin et al. (2000)
E291X	Transição de nucleotídeos G/T, <i>stop codon</i> de parada prematuro, alteração na função da proteína	Marchigiana	Cappuccio et al. (1998)
C313Y	Substituição de cisteína por tirosina, alteração na estrutura e no função da proteína	Piêmontes e Gascogne	Kambadur et al. (1997), McPherron & Lee, (1997), Grobet et al. (1998), Fahrenkrug et al. (1999)
S105C	Substituição de uma serina por uma cisteína	Parthenaise	Dunner et al. (2003), McPherron & Lee (1997)
D182N	Substituição de um ácido aspártico por uma asparagina	Maine Anjou e INRA95	Miranda et al. (2002)
F94L	Substituição de uma leucina por uma fenilalanina	Limousin	Sellick et al. (2007), Esmailizadeh et al. (2008)

Fonte: Adaptado de Prusak & Grzybowski, 2003; Dunner et al., 2003.

As raças mais estudadas que apresentam o fenótipo da musculatura dupla são: Belgian Blue, Piemontês, Austuriana de Los Valles e Charolês (McPherron & Lee, 1997; Marchitelli et al, 2003; Canesin, 2009), além de outras como a Rubia Galega, Marchigiana, Blond d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Gascogne e South Devon (Dunner et al., 1997; Grobet et al., 1997; McPherron & Lee, 1997; Karin et al., 2000; Lee & Mcpherron, 2001; Teixeira & Oliveira, 2007; Canesin, 2009).

Nas raças Belgian Blue e Austuriana de Los Vallles, ocorre a mutação nt821 (del11), caracterizada por uma deleção de 11 pb no exon 3, a partir dos nucleotídeos 821 a 831, denominada nt821 (del11), ocorrendo numa zona altamente conservada nos membros da família *TGF-β*, zona bioativa do terminal carboxilo (C-terminal), provocando uma alteração na estrutura da proteína e o aparecimento de *stop codon* prematuro (Grobet et al. 1997; Dunner et al., 2003; Bellinge et al., 2005).

Grobet et al. (1998) identificaram a mutação nt419 na raça Maine Anjou, caracterizada pela deleção de sete pares de bases e a inserção subsequente de 10 pb na posição nucleotídica 419 no exon 2, resultando em inativação da proteína. Esta mutação ocasiona a inativação da síntese proteica causando a incapacidade de regular a deposição de fibras musculares e determinando o fenótipo da musculatura dupla nesta raça.

Nas raças Piemontês e Gascogne, a mutação que determina a musculatura dupla é ocasionada por uma transição de nucleotídeo G → A na posição 938 do éxon 3, resultando na substituição de tirosina por uma cisteína no aminoácido 313 (C313Y). Esta alteração determina a quebra de ligações de dissulfureto, devido à ausência de cisteína na região N-terminal, alterando a configuração espacial da proteína com a conseqüente perda da sua atividade biológica (McPherron & Lee, 1997; Kambadur et al., 1997; Fahrenkrug et al., 1999; Berry et al., 2002; Baumann et al., 2003).

Nas raças Charolês e Limousin, Grobet et al. (1998) descreveram a mutação denominada Q204X que ocasiona a transição de C → T na posição nucleotídica 610 no éxon 2, que conduz à substituição de glutamina para se obter um códon de parada prematuro (*stop codon*) interrompendo a síntese de proteína. Do mesmo modo, Lee & McPherron (2001) e Allais et al. (2010) identificaram esta mutação em bovinos da raça Charolês. Em ambos, os autores observaram a falta da atividade biológica da miostatina.

Foram descritas ainda outras mutações que afetam da mesma forma diversas raças bovinas. Na raça Maine-Anjou, foi descoberta uma transversão G→T, na posição 676 (E226X), levando a um *stop codon* e inativando a miostatina (Karin et al., 2000). Na raça Marchigiana, Teixeira e Oliveira (2007) detectaram a mutação denominada E291X, que ocorre na posição nucleotídica 874 determinando a substituição de um ácido glutâmico por um *stop codon* prematuro bloqueando a conversão dos próximos 245 nucleotídeos antes do final de tradução. Marchitelli et al. (2003) também identificaram esta mesma mutação na Raça Marchigiana.

Nas raças bovinas Parthenaise, Maine Anjou e INRA95 ocorrem as mutações D182N e S105 localizadas, respectivamente, nos exons 1 e 2, porém, até o momento, não há dados informativos na literatura sobre qual o efeito dessas mutações sobre a atividade biológica da miostatina (Miranda, 2002). No entanto, há relatos de que estas mutações estão associadas a fenótipos intermediários, ou seja, não cusam fenótipos extremos de musculatura dupla (Miranda, 2002; Dunner et al., 2003; Gandanho, 2014).

Nas raça Piemontês foi detectada a mutação L94F, onde ocorre uma transversão de nucleotídeos de C → A na posição 282 do éxon 1, no aminoácido 94, onde ocorre uma substituição conservativa de leucina por uma fenilalanina, sem qualquer alteração da atividade biológica da proteína (McPherron e Lee., 1997; Grobet et al, 1998). Esta mesma mutação também foi descrita na raça Limousin (Esmailizadeh et al., 2008; Gadanho, 2014).

Além das mutações citadas acima, foram descritos até o momento cerca de 20 polimorfismos que ocorrem no gene *GDF-8* que implicam em uma mudança na sequência de aminoácidos (Marchitelli et al., 2003; Dunner et al., 2003). Entretanto, esses polimorfismos não determinam o fenótipo de musculatura dupla, devido à posição onde ocorrem, sendo estes locais referidos como domínios irrelevantes para a função biológica da miostatina (McPherron e Lee, 1997; Shibata et al., 2003).

Altas taxas de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos pode ser o resultado de uma longa história de seleção artificial para produção de carne, o que provavelmente tem favorecido essas modificações que se mantiveram nas populações (Grobet et al., 1998; Dunner et al., 2003; Grisolia et al., 2009).

Na raça Senepol, que é objeto deste estudo, não há relatos na literatura sobre a ocorrência de musculatura dupla e, conseqüentemente, não há ainda descrição de mutações no gene *GDF8* que possam estar associadas a este fenótipo. Porém, na prática são observados animais que apresentam o fenótipo. A identificação e a avaliação desses polimorfismos por meio sequenciamento ou testes de DNA possibilitará tornar mais eficiente o processo de seleção contra ou a favor dos alelos que existam na população, facilitando a eliminação ou a manutenção de indivíduos que possuam estes alelos.

## 2 OBJETIVO E HIPÓTESE

O objetivo deste trabalho foi prospectar polimorfismos no gene *GDF-8* em animais da raça Senepol que apresentam o fenótipo da musculatura dupla, visando fornecer dados informativos que possam subsidiar programas de melhoramento genético da raça, por meio de seleção assistida por marcadores moleculares.

A suposição teórica que este experimento pretende comprovar é a seguinte:

1. Animais da raça Senepol que apresentam o fenótipo da musculatura dupla possuem polimorfismos no gene *GDF-8*, e os polimorfismos identificados já foram previamente descritos na literatura como associados a este fenótipo.

Os dados obtidos foram analisados e discutidos de forma a compor um artigo científico intitulado “**Prospecção de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos da raça Senepol**” e redigido conforme as normas editoriais da Revista Brasileira de Zootecnia (RBZ) e apresentado a seguir.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIS, S.H.; LEVÉZIEL, N.; PAYET-DUPRAT, N.; N.,HOCQUETTE, J.F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C., BERNARD-CAPEL, C.; JOURNAUX, L.; BONNOT, A.; RENAND, G. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. **Journal Animal Science**, v.88, p.446-454. 2010.

AMTHOR, H.; OTTO, A.; MACHARIA, R.; MCKINNEL, I. PATEL, K. Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. **Developmental Dynamics**, v.235, supl.3, p.672-680, 2006.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: AGRA - FNP, 2013. 369p.

ARTHUR, P.F. Double muscling in cattle: A review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.46, p.1493-1515, 1995.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. **Boletim**, 2012. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/>>. Acesso em: 19 nov. 2013.

Associação Brasileira de Criadores de Bovinos Senepol - ABCB Senepol [2014]. **Histórico da raça**. Disponível em: <<http://senepol.org.br/sobre-a-raca/historia-da-raca/>>. Acesso em: 06 mar. 2014.

BASS, J.; OLDHAM, J.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. BASS, J.; OLDHAM, M.; SHARMA, R. et al. Growth factors controlling muscle development. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.191-197, 1999.

BAUMANN, A.P.; IBEBUNJO, C.; GRASSER, W.A.; PARALKAR, V.M. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v.3, n°.1, p.8-16, 2003.

BELLINGE, R.H.S.; LIBERLES, D.A.; IASCHI, S.P.A.; O'BRIEN, P.A.; TAY, G.K. Myostatin and its implications on animal breeding: A review, **Animal Genetics**, v.36, p.1-6, 2005.

BERGLUND, B. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.89-95, 2008.

BERRY, L.; CARBONE, L.; HAECKEL, S. Managing the total customer experience-MIT **Sloan Management Review**, v.43 supl.3, p.85-8, 2002.

BEUZEN, N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **Veterinary Journal**, v.160, p.42-52, 2000.

BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, v.202, p.59-68, 2003.

BUTTERFIELD, R.M. Muscular hypertrophy of cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.42, supl.2, p.37-39, 1966.

CANESIN, M. R. **Hipertrofia muscular em raças bovinas de corte**. Revisão de literatura apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

CAPPUCCIO, L.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A. A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. **Animal Genetics**, p.29-51, 1998.

CARVALHO, T.B.; ZEN, S.; TAVARES, E.C.N. Comparação de custo de produção na atividade de pecuária de engorda nos principais países produtores de carne bovina. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 47. Porto Alegre: **SOBER**. 2009. Disponível em:<<http://www.sober.org.br/palestra/9/571.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2014.

CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; GROBET, L.; LEROY, P.L.; MICHAUX, C.; MNI, M.; SCHWERS, A.; VANMANSHOVEN, P.; HANSET, R.; GEORGES, M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2, **Mammalian Genome**, v.6, p.788-790, 1995.

CHASE, C.C JR.; LARSEN, R.E.; HAMMOND, A.C.; Randel, R.D. Effect of dietary energy on growth and reproductive characteristics of Angus and Senepol bulls during summer in Florida. **Theriogenology**, v.40, n°.1, p.43-61, 1993.

CHELH, I.; RODRIGUEZ, J.; BONNIEU, A.; CASSAR-MALEK, I.; COTTIN, P.; GABILLARD, J.C.; LEIBOITCH, S.; HADJ SASSI, A., SEILIEZ, I.; PICARD, B. La myostatine: Un régulateur negative de la masse musculaire chez les vertébrés, **Inra Productions Animales**, v.22 n°.5, p.397-408, 2009.

CIANZIO, D. Measurements of heat tolerance of cattle breeds in Puerto Rico. Proceedings of the International Conference. **Livestock Production in the Tropics**, p.42-54, 1996.

COUTINHO, L.L.; JORGE, E.K.; ROSÁRIO, M.F.; MOURA, S.A.M.T.; LEDUR, M.C. Genômica Animal. IN: XVII Congresso Brasileiro de Zootecnia. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, p.429-430, 2007.

COUTINHO, L.L.; ROSARIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos avançados**. v.24, n°.70, p.123-147, 2010.

CULLEY, G. **Observations in livestock**. 4th ed. G. London, UK; Woodfall; 1807.

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.22-32, 2002.

DIAS CORREIA, J.H.R.; DIAS CORREIA, A.A. Regulação da Miogénese, **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.2, p.9-30, 2006.

DIAS-SALMAN, A.K.; POLAINA, F.G.; WILSON, M.J. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **Revista electrónica de Veterinária - REDVET**, v.10, p.1-16, n°.2, 2009.

DUNNER, S.; CHARLIER, C.; FANIR, F.; BROUWERS, B.; CANON, J.; GEORGES, M. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double muscling in the Asturiana de

los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. **Mammalian Genome**, v.8, p.430-435, 1997.

DUNNER, S.; MIRANDA, M.E.; AMIGUES, Y.; CANON, J.; GEORGES, M.; HANSET, R.; WILLIAMS, J.; MENISSIER, F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v.35, p.103-118, 2003.

ESMAILZADEH, A.K.; BOTTEMA, C.D.K.; SELICK, G.S.; VERBYLA, A.P.; MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; PITCHFORD, W.S. Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1038-1046, 2008.

FAHRENKRUG, S.C.; CASAS, E.; KEELE, J.W.; SMITH, T.P. Technical note: Direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2028-30, 1999.

FEDERECK, M.N.; RUPERT, J.L. Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy. **Journal Med Science Sports**, v.18, p.123-131, 2008.

FERMO, R.S.; REGO, J.N.I.; FRANQUINI, J.V.M.; ANDRADE, T.U. Effect of food supplementation over anabolic action of nandrolone decanoate on rats. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, p.111-121, 2008.

FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M. Seleção genômica aplicada ao melhoramento animal: desafios atuais e expectativas futuras do criador. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 9., 2012, João Pessoa. **Anais...** Paraíba: SBMA, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

FIEMS, L. O. Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat. **Animals**, v.2, p.472-506, 2012.

FREKING, B.A.; MURPHY, S.K.; WYLIE, A.A.; RHODES, S.J.; KEELE, J.W.; LEYMASTER, K.A.; JIRTLE, R.L.; SMITH, T.P. Identification of the Single Base Change Causing the Callipyge Muscle Hypertrophy Phenotype, the Only Known Example of Polar Overdominance in Mammals. **Genome Research**, v.12, p.1496-1506, 2002.

GADANHO, A.M.F. **Mutações no gene da miostatina na raça bovina Limousine**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2014.

GARCIA, J.F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology**. v.56, p.1393-1399, 2001.

GARCIA, J.F.; PORTO-NETO, L.P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, Supl.1, p.197-203, 2006

GENGLER, N.; SEUTIN C.; BOONEN, F.; VAN VLECK, L.D. Estimation of genetic parameters for growth, feed consumption and conformation traits for double-muscling Belgian Blue bulls performance-tested in Belgium. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3269, 1995.

GOES, P.R.N.; AGOSTINI JR, R.; SANTOS, J.M.G. **Disponibilidade, usos e limitações dos marcadores moleculares em espécies de animais de produção**. Iniciação Científica. Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, v.14, n°.1, p.5-16, 2012.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; OLIVEIRA, J.F.C.; HENKES, L.E.; BENAVIDES, M.V. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Marcadores Moleculares em Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, 334p.

GOYACHE, F.; VILLA, A.; DUNNER, S.; GUTIERREZ, J.P.; ALONSO, L.; VALLEJO, M.; CANON, I. Importancia de la hipertrofia muscular hereditaria en la raza asturiana de los valles. En: El programa de Mejora Genética de la Raza Asturiana de los Valles. **BOVIS**, p.68, p.45-61, 1996.

GRISOLIA, A.; ANGELO, G.; PORTO NETO, L. Miostatina (*GDF8*) polimorfismos de nucleotídeo único em bovinos Nelore. **Genética Molecular e Pesquisa**, v.8, p.822-830, 2009.

GROBET, L.; L.J.R.; MARTIN, D.; PONCELET, D.; PIROTTIN, B.; BROUWERS, J.; RIQUET, A.; SCHOEBERLEIN, S.; DUNNER, F.; MENISSIER, J.; MASSABANDA, R.; FRIES, R.; HANSET, M. George.. A deletion in bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v.17, p.71, 1997.

GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MÉNISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.210-213, 1998.

GUIZONI, D.M.; LIMA, A.R.R.; MARTINEZ, P.F.; DAMATTO, R.L.; CEZAR, M.D.M.; BONOMO, C.; OKOSHI, K.; PAI-SILVA, M. D.; OKOSHI, M.P. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.8, n°.3, p.266-71, 2010.

HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; CHASE JR, C.C.; BOWERS, E.J.; RANDEL, R.D.; MURPHY, C.N.; VOGT, D. W.; TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **Journal of Animal Science**, v.74, p.295-303, 1996.

HANSET, R.; MICHAUX, C.; DETAL, G. Genetic analysis of somematernial reproductive traits in the Belgian Blue cattle breed an Livestock Production Science, **Prod. Science** v.23, p.79, 1989.

HILL, J.J.; QIU, Y.; HEWICK, R.M.; WOLFMAN, N.M. Regulation of Myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. **Molecular Endocrinology**, v.20, p.20, 2003.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Senso 2012**. Disponível em: <[www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br)>. Acesso em: 09 mar. /2014.

JEANPLONG, F.; SHARMA, M.; SOMERS, W.G.; BASS, J.J.; KAMBADUR, R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.220, p.31-37, 2001.

JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth : potential implications for flesh quality in fish. **Atlantic**, p.99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A.; MCLAY, H.; ABERCROMBY, M.; ROB, D. Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. **The Journal of experimental biology**, v.203, p.2539-52, 2000.

JOHNSTON, I.A.A.; BOWER, N.I.; MACQUEEN, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of experimental biology**, v.214 supl.10, p.1617-28, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 488p.

KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L.; BASS, J.J. Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7, p.910-915, 1997.

KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay. **Animal Genetics**, p.31-396, 2000.

KLAUZIUSNKA M. **Polimorfizm regionow 5'-flankujących genow GH, receptora GH, prolaktyny i miostatyny bydla (Polymorphisms within 5'-flanking regions of bovine GH, GH-receptor, prolactin and myostatin genes)**. Ph.D. Thesis. Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec. 2002.

LANGLEY, B., THOMAS, M., BISHOP, A., SHARMA, M., GILMOUR, S., E KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **The Journal of biological chemistry**, v.277, supl.51, p.49831-40, 2002.

LEE, C.Y.; HU, S.Y.; GONG, H.Y.; CHEN, M.H.C.; LU, J.K.; WU, J.L. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double muscle effect in transgenic zebrafish. **Biochemical and biophysical research communications**, v.387, p.766-71, 2009.

LEE, S.J.; MCPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.9306-931, 2001.

LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.F. Transcription factors families: muscling in onthe myogenic program. **FASEB Journal**, v.9, p.1595-1604, 1995.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio – Brasil 2012/13 a 2022/23**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2013.

MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M.C.; CRISA, A.; NARDONE, A.; MARSAN, P.A.; VALENTINI, A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. **Mammalian Genome**, v.14, p.392-395, 2003.

- MARRIS, E. The genome of the american West. **Nature**, v. 457, p. 950- 952, 2009.
- MARTINEZ, L.M.; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal. **Anais...** Juiz de Fora, MG, 2002.
- MATSAKAS, A.; PATEL, K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. **Histology and histopathology**, p.24, p.209-22, 2009.
- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.9, p.493-5, 1961.
- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.9, p.493-5, 1961.
- MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. **Nature**, v.387, p.84-90, 1997.
- McPHERRON, A. C.; LEE, S. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.94, p.12457-12461, 1997.
- MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. **Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**, v.16, p.23-53, 1982.
- MIRANDA, M.E.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M.Y.; MÉNISSIER, F.; CORTÉS, O.; DUNNER, S. Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.119, supl.6, p.361-366, 2002.
- NASCIMENTO, S. Carne do Futuro. **Revista Globo Rural**. São Paulo, n°.298, 2010, p.18.
- NOVAKOFSKI, J.E.; KAUFFMAN, R.G.; CASSENS, R.G. Biological detection of heterozygosity for double muscling in cattle. **Journal of Animal Science**, p.52-1430, 1981.
- OLIVER, W.M.; CARTWRIGHT, T.C. Double Muscling in cattle. A review of expression, genetics and economic implication. **Agricultural Experiment Station Technical report**, Texas A & M University, v.12, p.58, 1968.
- OLSON, T.A.; LUCENA, C.; CHASE JR, C.C.; HAMMOND, A.C. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**. v.81, p.80-90, 2003.
- OLTENACU, P.A.; BROOM, D.M. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. **Animal Welfare**, v.19, p.39-49, 2010.
- OTT, R.S. Muscular hypertrophy in beef cattle: déjà vu. **American Veterinary Medical Association**, v.196, p.413-415, 1990.
- OTTO, A.; PATEL, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. Experimental cell research, **Elsevier Inc.**, v.316, n°.18, p.3059-66, 2010.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2.ed. Goiania: CEGRAF-UFG/Niterói: EDUFF, 1993, 586p.

PATRUNO, M.; SIVIERI, S.; POLTRONIERI, C.; SACCHETTO, R.; MACCATROZZO, L.; MARTINELLO, T.; FUNKENSTEIN, B.; RADAELLI, G. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor- I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). **Cell and tissue research**, v.331, p.643-58, 2008.

PEREIRA, A.S.C. e LUZ E SILVA, S. Avaliação de características de carcaça e da qualidade de carne de novilhos Senepol. Relatório Técnico. FZEA/USP, 2004, 9p. Disponível em: <[http://www.senepol.org.br/index.php?pid=inc/inc\\_institucional.php&id\\_grupo\\_conteudo=316](http://www.senepol.org.br/index.php?pid=inc/inc_institucional.php&id_grupo_conteudo=316)>. Acessado em: 20 mar. 2014.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEP – Medicina Veterinária e Zootecnia, 5ed. 2008, 618p.

POTTS, J.K.; ECHTERNKAMP, S.E.; SMITH, T.P.; REECY, J.M. Characterization of gene expression in double-muscled and normal-muscled bovine embryos. **Animal Genetics**, v.34, p.438-44, 2003.

PRUSAK, G. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. **Genet. Sel. Evol.** 35, p.103-118, 2003.

RAIMONDI, R. Present day situation of the Piedmont breed of cattle. **Rivista di Zootecnia**. v.38, p.563, 1965.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.215, 2001.

REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; DIETL, G.; ENDER, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v.66, p.177-188, 2000.

RESCAN, P.Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. Comparative biochemistry and physiology. Part B, **Biochemistry and Molecular Biology**, v.130, p.1-12, 2001.

RESENDE, M.D.V.; LOPES, P.S.; SILVA, R.L.; PIRES, I.E. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.56, p.63-77, 2008.

REZENDE, F.M. **Incorporação de informações de marcadores genéticos em programas de melhoramento genético de bovinos de corte**. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2012.

RIBEIRO, A.R.B.; ALENCAR, M.M.; NEGRÃO, J.A.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; STARLING, J.M.C. Avaliação das respostas fisiológicas de bezerros zebuínos puros e cruzados nascidos em clima subtropical. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n° 3, p.1146-1153, 2006.

RIBEIRO, A.R.B.; ALENCAR, M.M.; OLIVEIRA, M.C.S. Características do pelame de bovinos Nelore, Angus x Nelore e Senepol x Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45. 2008, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: SBZ: UFLA, 2008.

RODRIGUES FILHO, M.; ZANGERONIMO, M.G.; SÂMIA, L.; LOPES.; LADEIRA, M.M.; ANDRADE, I. Fisiologia do crescimento e desenvolvimento do tecido muscular e sua relação com a qualidade da carne em bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.8, n.º.2 p.1431-1443, 2011.

ROSA, A. N. Recursos Genéticos e Planos de Melhoramento em Gado de Corte. In: XXII Curso de Melhoramento de Gado de Corte. EMBRAPA-GENEPLUS, Campo Grande, 2010. **Anais...** Campo Grande, 2010. CD-ROM.

ROSA, A.J.M.; FRAGOSO, R.R. 2011. **Análise Genômica Aplicada a Produção Animal**. Disponível em: <<http://www.cigeneticabovina.com.br>> Acesso em: 15 mar. 2014.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology**, v.23, p.160-170, 2008.

SANTOS, L.A.; MARTINS, E.N.; CAMPOS DA SILVA, L.O et al. Avaliação de grupos genéticos Angus-Nelore, Hereford-Nelore, Nelore e Senepol-Nelore para peso ao sobreano e ajustado para 450 dias de idade. VIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL., **Anais...** Maringá, PR-10 e 11 de junho de 2010.

SELLICK, G.S.; PITCHFORD, W.S.; MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; CRAWFORD, A.M.; RAADSMA, H.W.; BOTTEMA, C.D. Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. **Animal Genetics**, v.38, p.440-446, 2007.

SHIBATA, M.; OHSHIMA, K.; KOJIMA, T.; MURAMOTO, T.; MATSUMOTO, K.; KOMATSU, M.; AIKAWA, K.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M. Nucleotide sequence of myostatin gene and its developmental expression in skeletal muscles of Japanese Black cattle. **Animal Science Journal**, v.74, p.383-390, 2003.

SMITH, J.A.; LEWIS, A.M.; WIENER, P.; WILLIAMS, J.L. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Animal genetics**, v.31, n.º.5 p.306-309, 2000.

SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; KAPPES, S.M.; SONSTEGARD T.S. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus, **Mammalian Genome**, v.8, p.742-744, 1997.

STELLABOTTE, F.; DEVOTO, S.H. The teleost dermomyotome. **Developmental dynamics** : an official publication of the American Association of Anatomists, v.236, n.º.9, p.2432-43, 2007.

SUGISAWA, L; SOUTELL, R.V.G.; SILVA, C.L.S.P; FONZAR, J.F.; OLIVEIRA, F.P.MARINI, A.; JÚNIOR, A.G.; FILHO, W.F. Utilização de marcadores moleculares para qualidade de carne em bovinos de corte. **Ciências Agrárias e da Saúde**. FEA, Andradina, v.2, n.º.2, p.43-46, 2002.

TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A.; QUIRINO, C.R. Musculatura dupla. I - Características de desempenho e da carcaça de bovinos. **Archive Latinoamerican Production Animal**, v.14, p.10-16, 2006a.

TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A.; QUIRINO, C.R. Musculatura dupla: II - Determinação genética. **Archivos Latino americanos de Produção Animal**, v.14, n°.1, p.17-23, 2006b.

TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A. Frequência do gene Miostatina (*GDF-8*) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n°.3, p.805-809, 2007.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.40235-40243, 2000.

United States Department of Agriculture - USDA. **Livestock and Products Annual: Annual Livestock Report 2012**. Disponível em: <[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_9-6-2012.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_9-6-2012.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Products Annual: Annual Livestock Report 2012**. Disponível em: <[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_9-6-2012.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Livestock%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_9-6-2012.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2014.

VANRADEN, P.M.; VAN TASSELL, C.P.; WIGGANS, G.R.; SONSTEGARD, T.S.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; SCHENKEL, F.S. et al. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal Dairy Science**, v.92, p.16-24, 2009.

VASYUTINA, E.; LENHARD, D.C.; WENDE, H.; ERDMANN, B.; EPSTEIN, J.A.; BIRCHMEIER, C. RBP-J (Rbpsi) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.4443-4448, 2007.

WALKER, C. C. **Genotipagem dos genes esteroil-coa dessaturase (SCD1) e ácido graxo sintase (FASN) em raças bovinas e sua associação com a composição de ácidos graxos na raça Brangus**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

WALSH, B. Mini review: Quantitative genetics in the age of genomics. **Theoretical Population Biology**, v.59, p.175-184, 2000.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. **Journal of Fish Biology**, v.55, p.1-18, 1999.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). Fish physiology- Muscle Development and Growth. **Academic Press**, v.156, p.19-39, 2001.

WEBER, A.D.; IBSEN, H.L. The occurrence of the double-muscled character in purebred beef cattle. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. v.27, p.228-232, 1934.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. **Cell**, v.75, p.1241-1244, 1993.

WHEELER, T.L., S.D. SHACKELFORD, E.; CASAS, L.V.; CUNDIFF, M. KOOHMARAIE. The effects of Piemontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. **Journal Animal Science**, v.79, p.3069, 2001.

WOZNIAK, A.C.; KONG, J.; BOCK, E.; PILIPOWICZ, O.; ANDERSON, J.E. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. **Muscle Nerve**, v.31, p.283-300, 2005.

WRIEDT, C.H.R. Die Vererbung des doppellendercharakters bei Rindern. **Zeltschr. Ind. Abst. u. Vererbungslehre**. v.51, p.422-486, 1929.

ZADRA, A. **Manual de Cruzamento Industrial**. Lagoa da Serra - Sertãozinho - São Paulo Brasil, (2003). Disponível em: <<http://www.crvlagoa.com.br/texto.asp?id=7>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

## 4 ARTIGO

### 4.1 PROSPECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA MIOSTATINA EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL

Sandra Rodrigues Xavier<sup>1</sup>, Fabiane Siqueira<sup>2</sup>, Anna Beatriz Robotton Ferreira<sup>2</sup>, André Luiz Julien Ferraz<sup>3</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>2</sup>, Paulo Bahiense Ferraz Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS.

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul - UEMS.

Email para correspondência: [fabiane.siqueira@embrapa.br](mailto:fabiane.siqueira@embrapa.br)

**Resumo:** Objetivou-se prospectar polimorfismos no gene que codifica a miostatina (*GDF-8*), por meio de sequenciamento automático de DNA, em bovinos da raça Senepol que apresentam o fenótipo de musculatura dupla. Animais com esta característica apresentam boa conformação, alto rendimento de carcaça, porém com menor quantidade de gordura subcutânea e intramuscular. Entretanto, apresentam redução do tamanho dos órgãos internos, são mais susceptíveis a doenças respiratórias, estresse e distocia, tornando este fenótipo desejável ou não para os produtores. Foram sequenciados os produtos de PCR (*Polymorphism Chain Reaction*) de oito pares de *primers* dos éxons um, dois e três, e das regiões não traduzidas 5' e 3' (UTR - *untranslated region*) do gene *GDF8*. Ainda não existem relatos na literatura a respeito da ocorrência de polimorfismos associados ao fenótipo da musculatura dupla nesta raça. Portanto, a identificação destes polimorfismos em animais Senepol poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares que atuam na expressão dessa característica, possibilitando a identificação precoce de animais portadores dos alelos que conferem a característica de musculatura dupla. Com base nessas informações, os produtores poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações, facilitando a tarefa tanto da introdução ou da eliminação dos alelos de interesse na população.

**Palavras-chave:** *GDF-8*, melhoramento genético, seleção assistida por marcadores, mutação

33

## 4.2 INTRODUÇÃO

34 Os avanços tecnológicos e o desenvolvimento de novas metodologias de análise  
35 molecular têm permitido o estudo do genoma bovino e das variações existentes  
36 (Coutinho et al. 2010; Ferraz et al., 2012). A detecção de polimorfismos genéticos  
37 associados a genes cuja expressão está relacionada à características de interesse  
38 econômico surge como alternativa complementar aos métodos tradicionalmente  
39 empregados no melhoramento genético (Regitano & Coutinho, 2001). A utilização  
40 dessas informações moleculares nos programas de melhoramento animal oferece a  
41 possibilidade de reduzir o intervalo de gerações (VanRaden et al., 2009; Rezende,  
42 2012).

43 Em bovinos, mutações no gene *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor-8*),  
44 regulador negativo (inibidor) do crescimento muscular, levam a um aumento  
45 significativo da massa muscular do animal, do peso ao nascimento e da eficiência  
46 alimentar (McPherron & Lee, 1997; Fiems, 2012). Quando comparados com outros  
47 animais, os indivíduos com o fenótipo de musculatura dupla apresentam menos osso,  
48 menos gordura, mais músculos e elevada proporção de cortes de carne, proporcionando,  
49 em média, 20% mais carne em cada animal (Kambadur et al., 1997). Entretanto, apesar  
50 do aumento desejado na massa muscular, os animais hipertróficos apresentam  
51 problemas associados à reprodução, tais como redução de fertilidade dos machos e  
52 fêmeas, distocia e aumento da susceptibilidade ao estresse (Lee & McPherron, 2001;  
53 Potts et al., 2003).

54 A identificação precoce dos animais portadores da hipertrofia muscular  
55 possibilitará tornar mais eficiente o processo de seleção a favor ou contra os alelos que  
56 conferem esta característica, facilitando a eliminação ou a manutenção de indivíduos

57 que possuam estes alelos nas populações bovinas (Karim et al., 2000; Rosa & Fragoso,  
58 2011; Gadanho, 2014).

59 Os bovinos da raça Senepol são considerados recursos genéticos promissores para  
60 produção de carne, devido às suas características, tais como tolerância ao calor, boa  
61 conversão alimentar, longevidade e facilidade de parto (ABCBS, 2012). Ainda não há  
62 relatos na literatura a respeito da ocorrência de sítios polimórficos no gene da *GDF-8*  
63 associados ao fenótipo de musculatura dupla na raça Senepol. Porém, na prática têm  
64 sido observados indivíduos desta raça que apresentam o fenótipo.

65 Assim, a raça representa uma interessante alternativa de genética taurina adaptada  
66 para a produção de carne de qualidade no Brasil Central. Neste contexto, objetivou-se  
67 identificar polimorfismos no gene *GDF-8* em animais da raça Senepol portadores do  
68 fenótipo da musculatura dupla, visando fornecer dados informativos que possam  
69 subsidiar programas de melhoramento genético, por meio de seleção assistida por  
70 marcadores moleculares.

## 71 **4.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 72 **4.3.1 Origem dos animais e coleta de sangue**

73 O experimento foi conduzido no Laboratório de Genômica e Melhoramento  
74 Animal da Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande-MS. Os dois indivíduos machos  
75 não aparentados com fenótipo da musculatura dupla utilizados no experimento (Anexos  
76 I e II) são provenientes do rebanho Senepol Puro de Origem Importada (POI) da  
77 Embrapa Gado de Corte.

78 A formação deste rebanho teve origem em 2011 pela transferência de 121  
79 embriões, resultando no nascimento de 31 machos e 22 fêmeas. Os embriões foram  
80 gerados a partir de 17 vacas e 10 touros diferentes, os quais foram doados pelos  
81 criatórios Senepol da San (Miranda, MS) e Senepol CMI (Camapuã, MS).

82 Para a identificação de polimorfismos no gene *GDF8*, foram coletadas dos dois  
83 animais portadores de musculatura dupla amostras de 5 mL de sangue periférico por  
84 venopunção em tubos a vácuo (estéreis) contendo K3 EDTA.

#### 85 **4.3.2 Extração e quantificação de DNA**

86 DNA genômico foi extraído utilizando o método descrito por Regitano e Coutinho  
87 (2001) (Anexo III). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria  
88 em aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific*) e em gel de agarose 0,8%, por meio de  
89 comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas (50, 100 e 200 ng/ $\mu$ L),  
90 corado com *SyberGold* (1:10.000), visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

#### 91 **4.3.3 Amplificação do DNA do gene *GDF-8* por PCR**

92 Para amplificação dos éxons 1, 2 e 3 e das regiões não traduzida (UTRs) 5' e 3' do  
93 gene *GDF-8* foram desenhados *primers* específicos a partir das sequências do gene que  
94 estão depositados no banco de dados público *Genbank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), com o  
95 auxílio do *software primer 3 plus* disponível *online* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), e  
96 sua qualidade foi verificada pelo *software OligoAnalyzer v3.1*, disponível *online*  
97 (<http://www.iddna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

98 Os oito pares de *primers* utilizados para amplificar os éxons 1, 2, 3 e as UTRs do  
99 gene *GDF-8* estão descritos na Tabela 1. Para todos os pares de *primers* foi otimizado o  
100 protocolo (Tabela 2), sendo que todas as reações de amplificação (*Polymerase Chain*  
101 *Reaction* – PCR) foram realizadas com um volume final de 25  $\mu$ L contendo 40 ng de  
102 DNA genômico; 0,164  $\mu$ M de cada um dos *primers* (F e R); 1 X Tampão de PCR (10  
103 mM Tris-HCl; pH 8,0 e 50 mM de KCl); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 1,0  
104 unidade (UI) de Taq DNA polimerase e completado com água.

105 **Tabela 2** - Posição dos nucleotídeos no gene *GDF-8*, as sequências dos *primers*  
 106 *forward* (F) e *reverse* (R) utilizadas no sequenciamento, tamanho dos  
 107 fragmentos amplificados (*amplicons*) e temperatura de anelamento (TA)  
 108 padronizada para cada par de *primer*

Região	Oligonucleotídeo (F/R)	Sequência 5'→3'	Fragmentos de DNA (pb)	TA (°C)
UTR5'+1	1F	GAGATTCATTGTGGAGCAAGAG	478	58
	1R	CCTTGGGCAAAAGTTGTCTG		
1	2F	AATGAGAACAGCGAGCAGAAG	538	58
	2R	TGCAAGCATTTCATTTTGTGAT		
2	3F	TGATATGGAGGTCGTTTCG	564	58
	3R	GGCACCTTTGTCTGGCTTAT		
3	4F	TCCTTAATGCTGTGCCTTTTA	550	60
	4R	TCCATGTTTGAGGAAGCTATG		
UTR3'+3	5F	GGCCCCTGCTGTACTCCTAG	564	60
	5R	AAATTCAAGTGTTTAAGGATGTTC		
UTR 3'	6F	GGAGATCAAATTCCATTTATGTTC	538	60
	6R	GCCTTTTCAATGCAGCTTCT		
UTR 3'	7F	CAGGTGCATTTTCACACTCC	542	60
	7R	CACATTCACATTATACAGCCATCA		
UTR 3'	8F	TCCATATGCTAATGGTTAGATGGT	507	60
	8R	CCAAACTTTTGTGCTCAGTCAT		

109 F: *forward* e R: *reverse*. UTR = Região não traduzida. pb: pares de bases.

110 As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas em um aparelho  
 111 termociclador conforme a (Tabela 3).

112 **Tabela 3** - Protocolo de PCR de amplificação do gene *GDF-8*

Steps	Temperatura	Tempo
1	95 °C	4 minutos
2	94 °C	30 seg
3	58 ou 60 °C	30 seg
4	72 °C	40 seg
	Ciclos 2 à 4 repetir 30 vezes	
5	72 °C	7 min
6	4 °C	00

#### 113 4.3.4 Eletroforese

114 Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose  
115 (1%) em tampão TBE 10X (Tris-Borato –EDTA). Foram utilizados cerca de 3 µL da  
116 solução de produto de PCR acrescidos de 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl, 0,1  
117 mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02; glicerol 50%) Após a corrida eletroforética, o  
118 géis foram corados em solução contendo *SyberGold* (1:10.000) para observação dos  
119 fragmentos amplificados.

120 O tamanho dos fragmentos amplificados foram determinados pela comparação  
121 com um marcador de peso molecular de 1 kb e a imagem de cada gel foi fotografada por  
122 um sistema digital de foto-documentação *Gel-Doc*, com transiluminador ultravioleta.

#### 123 4.3.5 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento de DNA

124 Os produtos da PCR foram purificados com 0,5 UI das enzimas *EXO-SAP*  
125 (*Exonuclease I, Shrimp Alkaline Phosphatase*) de acordo com Werle et al. (1994) e  
126 incubados a 37 °C por 30 minutos seguido de 20 minutos a 80 °C.

127 Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye® Terminator Cycle*  
128 *Sequencing* (versão 3.1, *Applied Biosystems*, Foster City CA, USA), sendo a mesma  
129 preparada em um volume final de 10 µL com 1,6 µM *primer forward* (F) ou *primer*  
130 *reverse* (R) e aproximadamente 10 µL de produto de PCR purificado com *EXO-SAP*.  
131 Foram realizadas duas amplificações para cada amostra, um com o *primer* F e outro  
132 com o *primer* R.

133 A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti® Thermal Cycler da*  
134 *Applied Biosystems*, utilizando o seguinte programa: 96 °C/1', seguido de 25 ciclos de  
135 96 °C/10", 50 °C/5" e 60 °C por 4 segundos. Por fim, uma nova etapa de purificação foi  
136 realizada utilizando-se EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. Os

137 produtos da PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador automático  
138 modelo ABI-3130® (*Applied Biosystems*).

#### 139 **4.3.6 Alinhamento de sequências**

140 Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foram editados e  
141 analisados usando o *Software CodonCode Aligner* (versão demo). Inicialmente, as  
142 sequências foram editadas para remoção de trechos de baixa qualidade. Em seguida,  
143 foram alinhadas as quatro sequências geradas para cada produto de PCR (uma com  
144 *primer F* e outra com *primer R* para cada uma das duas amostras). E por fim, as  
145 sequências consenso geradas a partir das quatro sequências para cada produto de PCR  
146 foram alinhadas contra a sequência de referência do gene *GDF-8* da versão Btau\_4.6.1  
147 do genoma de *Bos taurus* obtida no *Genebank* (AB076403.1).

### 148 **4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

149 O sequenciamento dos três éxons e das duas UTRs (5' e 3') do gene *GDF-8* de  
150 dois animais Senepol que apresentam o fenótipo da musculatura dupla resultou em  
151 100% de homologia entre os indivíduos, ou seja, as sequências mostraram-se idênticas.  
152 No entanto, a comparação dessas sequências com o genoma de referência depositadas  
153 no *Genebank* (nº de acesso AB076403.1) revelou 11 sítios polimórficos, sendo que  
154 todos já haviam sido depositados no banco de dados dbSNP  
155 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) e, conseqüentemente, possuem código  
156 identificador neste banco de dados (Tabela 3).

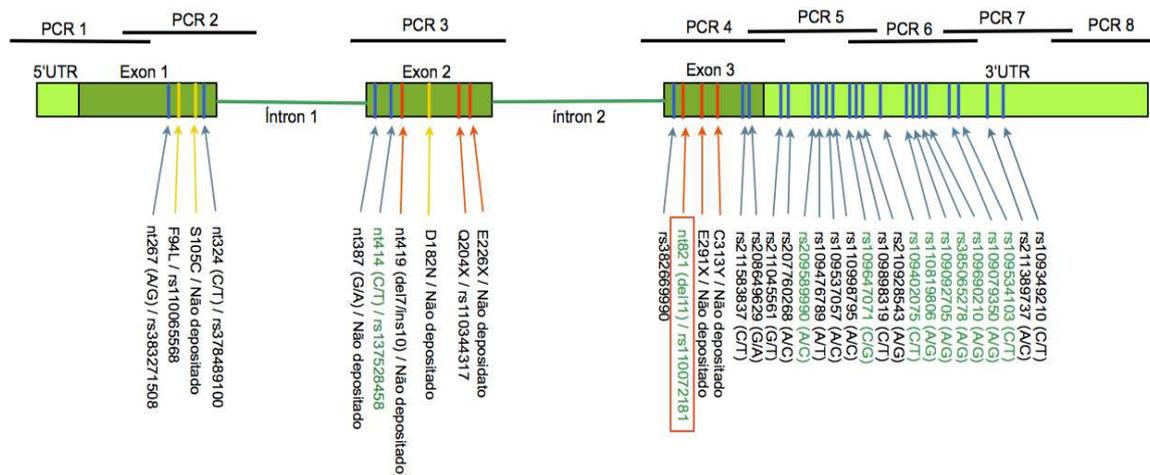
157 Desta forma, foram identificados 11 sítios polimorfismos, dentre os quais um foi  
158 detectado no éxon 2 (nt414), um no éxon 3 (nt821) e outros nove polimorfismos em  
159 região não-codificante (UTR 3') (Tabela 3 e Figura 1). Entretanto, não existem relatos

160 na literatura sobre a associação destes polimorfismos detectados na UTR 3' com o  
161 fenótipo da musculatura dupla.

162 **Tabela 4** - Descrição e localização dos polimorfismos e o código no dbSNP

<b>Polimorfismos</b>	<b>Tipo de mutação</b>	<b>Localização</b>	<b>Nomeclatura na literatura</b>	<b>Código no dbSNP</b>
C/T	Sinônima	Éxon II	nt414	rs137528458
Del11	Sem sentido	Éxon III	nt821	rs110072181
A/C	Sinônima	UTR3'	-	rs209589990
C/G	Sinônima	UTR3'	-	rs109647071
C/T	Sinônima	UTR3'	-	rs109402075
A/G	Sinônima	UTR3'	-	rs110819806
A/G	Sinônima	UTR3'	-	rs109092705
A/G	Sinônima	UTR3'	-	rs385065278
A/G	Sinônima	UTR3'	-	rs109690210
A/G	Sinônima	UTR3'	-	rs109079350
C/T	Sinônima	UTR3'	-	rs109534103

163 O polimorfismo detectado no éxon 2 (Tabela 3) do gene *GDF-8* nos bovinos da  
164 raça Senepol é referido na literatura como nt414 e caracterizado por uma transição de  
165 citosina (C) para timina (T). Estes achados são condizentes com os observados por  
166 Moreno et al. (2008) que encontraram esse mesmo polimorfismo em animais da raça  
167 Beefmaster. Entretanto, estes mesmos autores não encontraram associação desta  
168 mutação sinônima (nt414) com o fenótipo da musculatura dupla. Igualmente, Grobet et  
169 al. (1998) e Dunner et al. (2003) também encontraram esse mesmo polimorfismo em  
170 raças europeias (Hereford, Asturiana de los Valles, Rubia, Aubrac, Charolês, Gasconne,  
171 Salers e Shorthorn) e não observaram associação destes polimorfismos com a  
172 característica nessas raças. Da mesma forma, Grisolia et al. (2009) também avaliaram  
173 este polimorfismo em bovinos da raça Nelore e não encontraram associação com o  
174 fenótipo da musculatura dupla.



175

176 **Figura 1** - Estrutura do gene da miostatina mostrando as regiões amplificadas pelos oito  
 177 pares de *primers* utilizados. Mutações em regiões codificantes e UTRs  
 178 descritas na literatura são representadas pelas barras azuis (mutações  
 179 sinônimas), barras amarelas (mutações com troca de aminoácido ou  
 180 mutação *missense*) e barras vermelhas (mutações com inserção prematura de  
 181 códon de parada ou mutação *nonsense*). Cada mutação está descrita com o  
 182 nome utilizado na literatura e/ou o identificador do banco de dados dbSNP  
 183 do *GeneBank*. Nomes na cor verde representam os polimorfismos  
 184 encontrados a partir dos animais da raça Senepol utilizados neste trabalho.  
 185 A caixa vermelha identifica a única mutação sem sentido ou *nonsense*  
 186 encontrada nestes animais.

187 Marchitelli et al. (2003) e Dunner et al. (2003) demonstraram que ocorrem cerca  
 188 de 34 mutações (Figura 1) no gene *GDF-8* como deleções, inserções e polimorfismos de  
 189 base única (SNPs) em diversas raças bovinas. De acordo ainda com Dunner et al.  
 190 (2003), alguns indivíduos de raças diferentes apresentam fenótipos intermediários que  
 191 não correspondem com o genótipo nos sítios polimórficos conhecidos, sugerindo que  
 192 outros polimorfismos de efeito menor também possam participar do desenvolvimento  
 193 da hipertrofia muscular. Além disso, há relatos na literatura de que as mutações D182N,  
 194 S105C e F94L causam variações fenotípicas, ou seja, causam fenótipos intermediários,  
 195 diferentemente das mutações sem sentido que causam fenótipos serevos (extremos) de  
 196 musculatura dupla (Miranda, 2002; Dunner et al., 2003; Gandanho, 2014).

197 McPherron & Lee (1997) referiram que mutações no gene *GDF-8* estão  
198 associadas tanto à hiperplasia quanto à hipertrofia da musculatura esquelética em  
199 bovinos. Bellinge et al. (2005), Dunner et al. (2003) e Miranda (2002) relataram a  
200 existência de pelo menos seis polimorfismos (deleções, mutações sem sentido ou  
201 *nonsenses* e *missenses*) no gene *GDF-8*, relacionados com o fenótipo da musculatura  
202 dupla: nt419 (del7-ins10), nt821 (del11), C313Y (G→A), E291X (G→T), E226X  
203 (G→T) e Q204X (C→T) (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; McPherron &  
204 Lee, 1997; Cappuccio et al., 1998; Grobet et al., 1998; Smith et al., 2000).

205 O sequenciamento do gene *GDF-8* nos bovinos da raça Senepol detectou 11  
206 polimorfismos, sendo dez polimorfismos de base única (*Single Nucleotide*  
207 *Polymorphism* - SNP) e uma deleção de 11 pares de bases, referida na literatura como  
208 nt821. De acordo com os dados que já foram publicados, o polimorfismo nt821 está  
209 associado com o fenótipo da musculatura dupla em diversas raças bovinas (McPherron  
210 & Lee, 1997; Grobet et al., 1998; Dunner et al., 2003;).

211 A mutação nt821 (*nonsense*) detectada no éxon 3 resulta em um códon de parada  
212 prematuro (*stop codon*) e causa a inativação da molécula (Tabela 3 e Figura 1). Este  
213 alelo tem sido associado com hipertrofia muscular em várias raças (Kambadur et al,  
214 1997; McPherron & Lee, 1997; Grobet et al, 1998; Dunner et al, 2003 ). Barroso et al.  
215 (1998) identificaram esta mutação em bovinos das raças Asturiana de los Valles.  
216 Igualmente, Goyache et al. (2002) descreveram tal mutação em bovinos da raça  
217 Piemontês. A mesma mutação também foi encontrada nas raças Preta, Blond  
218 d'Aquitaine, Parthenaise, Asturiana de los Valles, Rubia Galega e South Devon (Smith  
219 et al., 2000; Karim et al., 2000; Raes et al., 2003; Dunner et al., 2003; Teixeira &  
220 Oliveira, 2007; Warner et al., 2010).

221 Neste trabalho, relatamos pela primeira vez a descrição de polimorfismos no gene  
222 *GDF8* e a ocorrência do fenótipo da musculatura dupla em bovinos da raça Senepol.  
223 Este fenótipo, provavelmente, é causado pela mutação sem sentido nt821 localizada no  
224 éxon III do gene que codifica a miostatina. De acordo com a literatura, esta mutação  
225 apresenta um efeito maior quando comparada com os outros polimorfismos descritos e  
226 pode caracterizar o fenótipo da hipertrofia muscular (McPherron & Lee, 1997; Miranda,  
227 2002; Dunner et al., 2003; ).

228 Os resultados encontrados são condizentes com os trabalhos realizados pelos  
229 autores McPherron & Lee, (1997) e Karim et al. (2000) que detectaram esta mesma  
230 mutação nas raças Belgian Blue e Austuriana de los Valles. Estes resultados também  
231 corroboram os resultados encontrados nas raças South Devon, Blonde d'Aquitaine,  
232 Limousin, Parthenaise, Rubea Gallega, Red Angus e Polish Red onde a referida  
233 mutação esta associada ao fenótipo de musculatura dupla severa (McPherron & Lee,  
234 1997; Kambadur et al., 1997; Dunner et al., 1997; Grobet et al., 1998; Smith et al.,  
235 2000; Karim et al., 2000; Klauzińska et al., 2001; Prusak & Grzybowski, 2003; Dunner  
236 et al., 2003).

#### 237 **4.5 CONCLUSÕES**

238 O sequenciamento do gene *GDF8* nos bovinos da raça Senepol revelou 11  
239 polimorfismos, sendo dez polimorfismos de base única e uma deleção de 11 pares de  
240 bases, referida na literatura como nt821. Como a mutação nt821 apresenta um efeito  
241 maior quando comparada com os outros polimorfismos descritos e causa o fenótipo de  
242 hipertrofia muscular em diversas raças bovinas como Belgian Blue, Austuriana de los  
243 Valles, South Devon, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Rubea Gallega, Red  
244 Angus e Polish Red pode-se afirmar que esta mutação é responsável por este fenótipo  
245 em bovinos da raça Senepol. Dessa forma, constatou-se pela primeira vez que existem

246 variações no gene da miostatina que podem estar relacionadas com o fenótipo  
247 musculatura dupla nesta raça. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para a  
248 validação destes polimorfismos.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABCBS. Associação Brasileira de Criadores de Bovinos Senepol [2012]. **Histórico da raça** Disponível em: <<http://senepol.org.br/sobre-a-raca/historia-da-raca/>>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- ANTONIOU, E.; GROSZ, M. PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation. **Animal Genetics**, v.30, p.231-232, 1999.
- BARROSO, A.; DUNNER, S.; CANON, J. et al. Detecção de kappa caseína bovina variantes A, B, C e E, por meio de polimorfismo de conformação em hélice-única reacção em cadeia da polimerase. **Journal Animal Science**, v.76, p.1535-1538, 1998.
- BELLINGE, R.; LIBERLES, D.; IASCHI, S. et al. A miostatina e suas implicações na criação de animais: arevisão. **Animal Genetics**. v.36, p.1-6, 2005.
- CAPPUCCIO, I.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A.A. G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. **Animal Genetics**, p.29-51, 1998.
- CIANZIO, D. Measurements of heat tolerance of cattle breeds in Puerto Rico. Proceedings of the International Conference. **Livestock Production in the Tropics**, p.42-54, 1996.
- COUTINHO, L.L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos avançados**. v.24, n°.70, p.123-147, 2010.
- DUNNER, S.; CHARLIER, C.; FANIR, F.; BROUWERS, B.; CANON, J.; GEORGES, M. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. **Mammalian Genome**, v.8, p.430-435, 1997.
- DUNNER, S.; MIRANDA, M.E.; AMIGUES, Y.; CANON, J.; GEORGES, M.; HANSET, R.; WILLIAMS, J.; MENISSIER, F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v.35, p.103-118, 2003.
- FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M. Seleção genômica aplicada ao melhoramento animal: desafios atuais e expectativas futuras do criador. In: Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 9., 2012, João Pessoa. **Anais...** Paraíba: SBMA, 2012.
- FIEMS, L. O. Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat. **Animals**, v.2, p.472-506, 2012.
- GENEBANK, **AB076403.1 mstn gene**. disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&list\\_uids=17939973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&list_uids=17939973)>. Acessado em: 22 nov. 2013.

- GOYACHE, F.; FERNA'NDEZ, I.; A'LVAREZ, I. et al. Gestation length in the Asturiana de los Valles beef cattle breed and its relationship with birth weight and calving ease. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p.431- 439, 2002.
- GRISOLIA, A.; ANGELO, G.; PORTO NETO, L. Miostatina (*GDF8*) polimorfismos de nucleotídeo único em bovinos Nelore. **Genética Molecular e Pesquisa**, v.8, p.822-830, 2009.
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.210-213, 1998.
- GROBET, L.J.R.; MARTIN, D.; PONCELET, D. et al. A deletion in bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, 17:71, 1997.
- JEANPLONG, F.; SHARMA, M.; SOMERS, W.G.; BASS, J.J.; KAMBADUR, R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.220, p.31-37, 2001.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L. et al. Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7, p.910-915, 1997.
- KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay. **Animal Genetics**, v.31p.396-399, 2000.
- LEE, Se-J.; McPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.16, p.9306-9311, 2001.
- MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M.C.; CRISA, A.; NARDONE, A.; MARSAN, P.A.; VALENTINI, A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. **Mammalian Genome**, v.14, p.392-395, 2003.
- McPHERRON, A.C.; LEE, S. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings**, of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.94, p.12457-12461, 1997.
- MIRANDA, M.E.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M.Y.; MÉNISSIER, F.; CORTÉS, O.; DUNNER, S. Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds. **J Anim Breed Genet.**, v.119, supl.6, p.361-366, 2002.
- MORENO, V.R.; SIFUENTES, A.M.; DE LA ROSA, X.F. Evaluación de regiones polimórficas del gen de la miostatina en ganado Beefmaster . **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.40, p.59-63, 2008.
- NISHI, M.; YASUE, A.; NISHIMATU, S.; NOHNO, T.; YAMAOKA, T.; ITAKURA, M.; MORIYAMA, K.; OHUCHI, H.; NOJI, S. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.293, n°.1, p.247-251, 2002.

- POTTS, J.K.; ECHTERNKAMP, S.E.; SMITH, T.P.L. et al. Caracterização da expressão de genes em embriões bovinos duplas musculoso e normais musculoso. **Genética Animal**, v.34 p.438-444, 2003.
- POZZI, A.; BONGIONI, G.; GALLI, A. Comparison of three methods to study the double muscling locus (mh) in Piedmontese cattle. **Book of Abstracts of XXVIII International Conference on Animal Genetics**, p.126, 2002.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.215, 2001.
- REZENDE, F.M. **Incorporação de informações de marcadores genéticos em programas de melhoramento genético de bovinos de corte**. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2012.
- ROSA, A.J.M.; FRAGOSO, R.R. 2011. **Análise genômica aplicada a produção animal**. Disponível em: <http://www.cigeneticabovina.com.br>. Acesso em: 06 nov. 2013.
- SMITH, J.A.; LEWIS, A.M.; WIENER, P.; WILLIAMS, J.L. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Animal genetics**, v.31, n.º5 p.306-309, 2000.
- TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A. Frequência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.º.3, p.805-809, 2007.
- VANRADEN, P.M.; VAN TASSELL, C.P.; WIGGANS, G.R. et al. Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal Dairy Science**, v.92, p.16-24, 2009.
- WIENER, P.; WOOLLIAMS, J.A.; FRANK-LAWALE, A.; RYAN, M.; RICHARDSON, R.I.; NUTE, G.R.; WOOD, J.D.; HOMER, D.; WILLIAMS, J.L. The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. **Meat Science**, v.83, p.127-134, 2009.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços tecnológicos na área da genética molecular têm facilitado à detecção de marcadores moleculares que possam estar associados às características de relevância econômica em bovinos de corte. A utilização dessas técnicas moleculares tem permitido a detecção dos polimorfismos associados ao fenótipo da musculatura dupla em diversas raças bovinas e, conseqüentemente, a identificação precisa dos indivíduos portadores deste fenótipo.

Neste trabalho, constatou-se pela primeira vez que existem variações no gene da miostatina que podem estar relacionadas com o fenótipo musculatura dupla na raça Senepol. De acordo com dados obtidos na literatura, a identificação da mutação nt821 no éxon III do gene *GDF8* permite afirmar que esta mutação é responsável por este fenótipo em animais Senepol. Com base nessas informações, os produtores poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações, facilitando a tarefa tanto da introdução ou da eliminação dos alelos de interesse na população.

## 7 ANEXOS

## 7.1 Anexo I - Geneologia: número de registro do animal 6000

		Nome	<b>CN 6013D</b>	<b>CN 4635 (BLONDIE)</b>
		RGD	1073668	1005760
		Nome	<b>CN 6720J</b>	<b>CN 2819</b>
		RGD	1103981	1004880
		Nome	<b>CN 5545</b>	<b>CN 4716 (LONGFORD)</b>
		RGD	1061993	1005916
		Nome	<b>CN 850R</b>	<b>CN 4539</b>
		RGD	1115984	1005385
		Nome	<b>CN 6044D</b>	<b>CN 5164</b>
		RGD	1075547	1008049
		Nome	<b>CN 29K</b>	<b>CN 1197</b>
		RGD	1107473	1000536
		Nome	<b>CN 5527</b>	<b>CN 4889</b>
		RGD	1061975	1006783
		Nome	<b>6000-SAN-1974</b>	<b>CN 4908</b>
		RGD	DESC	1006812
		Categoria	TSE 12_POI	
		Parentesco	0	
		Status	0	
		Cont. Direta	0	
		Nome	<b>CN 4635 (BLONDIE)</b>	<b>CN 2192</b>
		RGD	1005760	1003733
		Nome	<b>PRR 840 ET</b>	<b>CN 2438</b>
		RGD	1100331	1004883
		Nome	<b>WC 7025</b>	<b>WCS 410-S</b>
		RGD	1062922	1004591
		Nome	<b>ROCCA DA LASA - LAS</b>	<b>WC 5165</b>
		RGD	R02592	1005233
		Nome	<b>WC 850</b>	<b>WC 405X</b>
		RGD	1064154	1053482
		Nome	<b>BATON 1627 DA STEF</b>	<b>WCS 2831</b>
		RGD	1287249/R00516	1000996
		Nome	<b>RAB MS PACK POWER</b>	<b>PACK POWERED 7590</b>
		RGD	1079738	1052977
		Nome	<b>RAB MS S516A</b>	<b>RAB MS S516A</b>
		RGD		1053433

## 7.2 Anexo II - Geneologia: número de registro do animal 6013

		Nome	<b>CN 2970</b>	<b>CN 1675</b>
		RGD	1005367	1003197
		Nome	<b>CN5480 (HERCULES)</b>	<b>CN 1777</b>
		RGD	1060890	1003225
		Nome	<b>CN 1279</b>	<b>WCS 420</b>
		RGD	1000555	1001271
		Nome	<b>RD HERCULES 6801J</b>	<b>CN227</b>
		RGD	1106796	1000093
		Nome	<b>ANGEL FACE CN 2431</b>	<b>CN 1165</b>
		RGD	1004602	1000512
		Nome	<b>ROLLING D 89</b>	<b>CN 1327</b>
		RGD	1061918	1002808
		Nome	<b>CN 2095</b>	<b>CN 1046</b>
		RGD	1003785	1000472
		Nome	<b>6013-SAN-3924*</b>	<b>CN 1327</b>
		RGD	DESC	1002808
		Categoria	TSE12_POI	
		Parentesco	0	
		Status	0	
		Cont. Direta	0	
		Nome	<b>WC 405X</b>	<b>WC 0412</b>
		RGD	1053482	1003323
		Nome	<b>WC 850</b>	<b>WC 5099</b>
		RGD	1064154	1005215
		Nome	<b>WCS 2831</b>	<b>FOUNDATION - 105122</b>
		RGD	1000996	1051227
		Nome	<b>BATON 1627 DA STEF</b>	<b>WCS 1935</b>
		RGD	1287249/R00516	1000817
		Nome	<b>PACK POWER ED 7590</b>	<b>ASL BIG ED HU47</b>
		RGD	1052977	1005456
		Nome	<b>RAB MS PACK POWER</b>	<b>ASL QUEEN 94U</b>
		RGD	1079738	1005469
		Nome	<b>RAB MS S516A</b>	<b>CN 2556</b>
		RGD	1053433	1004604
				<b>WC 4076</b>
				1003642

## 7.3 Anexo III - Extração de DNA de leucócitos adaptado de Regitano e Coutinho (2001)

### A) Obtenção de Leucócitos

1. Coletar 5 mL de sangue em tubos contendo EDTA potássico [50 µL de EDTA (K3) a 15%];
3. Adicionar 10 mL de Solução A e vortexar até homogeneizar;
4. Centrifugar por 10 min a 700 xg;
5. Dispensar o sobrenadante;
6. Ressuspender o pellet em 5 mL de Solução A;
7. Vortexar até dissolver completamente o sedimento ;

8. Centrifugar por 10 min a 700 xg;
9. Repetir os passos 4 – 9 até obter somente as células brancas (o sedimento deve estar branco cremoso);
10. Ressuspender o sedimento em 500 µL de Solução A e transferir para microtubos de 1,5 mL;
11. Centrifugar 5 min a 16.000 xg e descartar o sobrenadante.

OBS: As células brancas assim preparadas podem ser armazenadas entre -20 °C e -80 °C.

### **B) Extração e purificação do DNA**

1. Ressuspender o sedimento em 500 µL de Solução B;
2. Vortexar até o sedimento desprender do fundo do tubo;
3. Incubar a 55 °C por 4-6 horas (ou overnight). Vortexar periodicamente durante a incubação para que a dissolução do sedimento seja completa;
4. Adicionar 210 µL de TE (pH 7,6) e 240 µL de NaCl 5M;
5. Agitar os tubos por inversão até formar pequenos coágulos;
6. Incubar em gelo por 10 min;
7. Centrifugar por 15 min a 16.000 xg;
8. Recolher o sobrenadante dividindo-o em dois microtubos de 1,5 mL limpos (máximo de 500 µL de sobrenadante por tubo);
9. Adicionar 1 mL de etanol 100% (absoluto) gelado em cada tubo e misturar por inversão;
10. Centrifugar por 15 min a 16.000 xg;
11. Descartar o sobrenadante;
12. Secar em papel;
13. Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado;
14. Centrifugar por 5 min a 16.000 xg;
15. Descartar o etanol e secar o sedimento na bancada por 40' a 60';
16. Ressuspender o sedimento em 250 µL de TE+RNase (10 µg de RNase por mL de amostra) e incubar por 1 hora a 37 °C;
17. Quantificar as amostras;
18. Armazenar o DNA extraído a -20 °C.

\*Tampão de lise:

Solução estoque	Concentração Final
Tris-HCl pH 7,6 – 8,0	100 Mm
EDTA pH 7,6 – 8,0	10 Mm
NaCl	300 mM