

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

SABRINA THAISE AMORIM

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NA REGIÃO DO EXON 6 DO
GENE DO IGF-I EM ANIMAIS DA RAÇA CRIOULA
LAGEANA**

FLORIANÓPOLIS-SC

2017

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

SABRINA THAISE AMORIM

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NA REGIÃO DO EXON 6 DO GENE DO
IGF-I EM ANIMAIS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Bacharel.
Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima.

FLORIANÓPOLIS-SC

2017

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

Amorim, Sabrina Thaise

Aplicação de PCR-RFLP na região do exon 6 do gene do IGF
I em animais da raça Crioula Lageana / Sabrina Thaise
Amorim ; orientador, André Luis Ferreira Lima, 2017.
31 p.

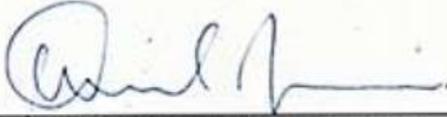
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

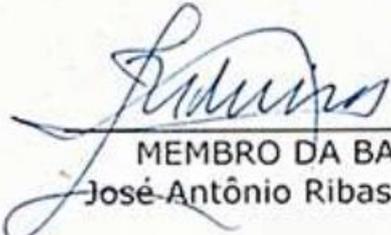
1. Zootecnia. 2. Genética. 3. Marcadores Moleculares.
4. Melhoramento Animal. 5. Crioula Lageana. I. Lima, André
Luis Ferreira . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Zootecnia. III. Título.

Esta monografia de Projeto de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

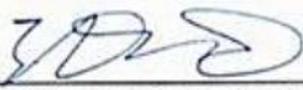
Florianópolis, 14 de Junho de 2017.



PRESIDENTE DA BANCA
Marcio Cinachi Pereira



MEMBRO DA BANCA
José Antônio Ribas Ribeiro



MEMBRO DA BANCA
Edison Martins



ORIENTADOR
André Luis Ferreira Lima

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Liliane Raquel Pavesi Amorim e Alexandre Adriano Amorim, por todos os anos de dedicação e esforço para que eu alcançasse meus objetivos. A minha irmã Sara Amorim por ser uma luz na minha vida.

A minha avó Dorandina Pavesi, por todo o apoio em minha educação, formação e por me guiar sempre me guiar a fazer o correto.

Aos professores que me incentivaram a chegar aonde estou hoje, Edu Gevaerd Neto, Ana Maria Quinoto Imhof, Lourdes Cedreira Moreira, e Cristina Zirke.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, paciência, e por estar presente em todos os momentos.

Aos professores Márcio Cinachi Pereira, Sérgio Augusto Ferreira de Quadros, Lucélia Hauptili, Sandra Regina Teixeira Carvalho, Renato Irgang e Pedro Watanabe, por todas as contribuições acadêmicas e por serem uma inspiração ao tipo de profissional que almejo ser.

Aos amigos Patrícia Pereira, Djonatan Machado, Dionatan Mallmann, Elizabeth Machado Cândido, Milena Lemes, Rafaela Nunes, Maria Eugênia Gaya Maçaneiro, e Matheus Kilpp pela amizade ao longo desses anos, principalmente neste último semestre. A minha ex-colega de curso e melhor amiga Maria Carolina Queiroz, que mesmo longe está sempre comigo.

Aos amigos Alcibíades Bresola Neto, Paulo Hashimoto, Bruno Arruda Laskos por todas as conversas, ideias e incentivos. A minha colega de casa Gabriela de Oliveira por me ouvir, me incentivar na vida pessoal e acadêmica. A meu amigo Everton Boos por todas as conversas, caronas e parceria desde o ensino médio. Aos meus amigos Yohanna Cunha Zibel e Matheus Fraga pela paciência ao longo desses anos longe de casa, por sempre estarem dispostos a estarem comigo. Ao meu grande amigo Thiago Varjão, por sua compaixão, paciência e bom humor.

Aos meus colegas do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal por toda ajuda, paciência, e disposição para enfrentar os longos dias de análise.

“A felicidade só é real quando partilhada”.

(Alexander Supertramp)

RESUMO

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) está relacionado com a precocidade sexual e está presente em diferentes estágios da foliculogênese, agindo diretamente ou indiretamente no desenvolvimento folicular. O IGF-I é um candidato a marcação molecular devido a sua relação com características de interesse econômico, e pode ser usado em programas de melhoramento genético como uma ferramenta na seleção assistida. O presente estudo teve como objetivo identificar a possível existência de polimorfismos no gene do IGF-I em animais da raça Crioula Lageana, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Foram coletadas amostras de pelo de 70 animais em fazendas localizadas em Lages/SC. As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética – LEPGA da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis. As amostras de folículos pilosos foram submetidas à extração de DNA pelo método de PCI (fenol-clorifórmico-álcool-isoamílico) adaptada, e o DNA genômico extraído foi quantificado e amplificado mediante a PCR. Para verificar o resultado da reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese e o fragmento obtido foi submetido à técnica de PCR-RFLP utilizando-se as enzimas BamHI e XmnI. Observou-se que a extração de DNA e a realização da técnica de PCR e PCR-RFLP funcionaram. Os resultados mostram que a região estudada é monomórfica para os sítios de corte das enzimas BamHI e XmnI no gene do hormônio IGF-I dos animais avaliados. Sugerem-se que estudos posteriores com endonucleases diferentes e outras regiões (exons) do gene IGF-I a fim de buscar polimorfismos na população da raça Crioula Lageana.

Palavras-chave: Bos taurus, genética, marcadores moleculares, IGF-I.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Exemplo de amostras de DNA extraído. Eletroforese em gel de agarose a 0,5%.....24
- Figura 2-** Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores IGF-C, FWD e VER. Gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).....25
- Figura 3-** Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease BamHI. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).....25
- Figura 4-** Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease XmnI. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições para reação de PCR para amplificação do fragmento do gene do IGF-I.....	23
---	----

SUMÁRIO

.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Panorama da Bovinocultura Brasileira	15
3.2 Raças Crioulas.....	16
3.3 Raça Crioula Lageana	17
3.4 Características Reprodutivas e Programas de Melhoramento Genético.....	18
3.5 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I).....	19
3.6 Melhoramento Genético e Marcadores Moleculares	20
3.7 Técnicas de Biologia Molecular e Marcadores Moleculares	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
6. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo com aproximadamente 200 milhões de cabeças, ocupando também a segunda posição em volume de carne produzida, perdendo apenas para os Estados Unidos em volume de produção (BRASIL, 2016). Em relação ao mercado externo, o Brasil é o maior exportador de carne bovina *in natura*, com 1.078.183 toneladas em 2015, colaborando com uma receita bruta estimada em R\$67 bilhões (ABIEC, 2016), demonstrando a importância da bovinocultura para a geração de renda ao país.

Diversos fatores foram determinantes para a conquista da liderança brasileira no cenário internacional, destacando-se as condições de solo e clima, avanços na área de nutrição e melhoramento genético, além da constatação da qualidade e da segurança do produto, e da alta demanda e de preços competitivos.

Dentre as diversas raças que compõem o rebanho brasileiro, a Nelore representa 85% do rebanho total (SANTIAGO, 1972), sendo que o maior núcleo de criação está localizado na região Centro-Oeste do Brasil. Entretanto, a região sul do Brasil difere em condições climáticas do resto do país, sendo este um dos motivos da produção de bovinos de raças europeias nesta região. De acordo com Araújo (1990), a introdução de bovinos na região sul do país aconteceu por meio das missões jesuíticas espanholas, com a entrada de animais trazidos da Península Ibérica, cuja origem é derivada dos bovinos Hamíticos, caracterizados por chifres longos, domesticados no Egito há aproximadamente 4000 anos a.C., e introduzidos no sul da Espanha procedentes da África do Norte (SPRITZE, 2003). Dessa forma, a origem da raça Crioula Lageana ocorreu possivelmente a partir de animais que tenham se extraviado das tropas Bandeirantes que iam em direção a Franca (SP) e cruzado com gado Franqueiro trazido por colonos na região do Planalto Catarinense.

No do século XX os exemplares de Crioulo Lageano foram cruzados com raças europeias e zebuínas, fato este que quase causou o desaparecimento desses animais. A população efetiva de bovinos da raça Crioula Lageana hoje é reduzida, não ultrapassando um total de 3000 animais. Entretanto, observa-se a importância desta raça em função da aptidão zootécnica tanto para produção de carne quanto leiteira, além de apresentar características como rusticidade e prolificidade. Em relação às características reprodutivas, os animais da raça Crioula Lageana apresentam

maturidade sexual tardia, e dessa forma o estudo de genes candidatos às técnicas de marcação molecular relacionados à precocidade sexual faz-se necessário na escolha dos indivíduos desta raça, visando a utilização destes em sistemas de acasalamento e cruzamento.

Os genes candidatos são genes sequenciados e de ação biológica conhecida que estão envolvidos em características do desenvolvimento ou da fisiologia (BRYNE & McMULLEN, 1996). O hormônio IGF-I, também conhecido como somatomedina C pertence ao sistema IGF, o qual é composto pelo IGF-I e IGF-II, sendo produzido predominantemente no fígado, exercendo a função de hormônio endócrino. Todavia ele também pode atuar de forma parácrina e autócrina em tecidos-alvo, sendo sua produção estimulada pelo GH. Esses fatores exercem atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (JONES & CLEMMONS, 1995), além disso, o IGF-I intermedeia efeitos do GH e regula o crescimento no desenvolvimento muscular, e tem papel importante na foliculogênese e oogênese (FORTUNE, 2004).

Tendo estes conceitos em vista, o gene IGF-I é considerado um candidato para a identificação de marcadores genéticos relacionados à precocidade sexual de bovinos da raça Crioula Lageana. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo identificar polimorfismos no gene do hormônio IGF-I e relacioná-los a características de importância econômica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a existência de polimorfismos no gene do IGF-I em animais da raça Crioula Lageana utilizando-se a técnica de PCR- RFLP com as enzimas de restrição BamHI e XmnI.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar um fragmento correspondente ao éxon 6 do gene do (IGF-I) utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos na PCR, utilizando-se a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama da Bovinocultura Brasileira

O Brasil é a nona economia do mundo, com PIB (Produto Interno Bruto) de U\$5,904 trilhões em 2015 (IBGE, 2015). Dentre os fatores que compõem a economia, o agronegócio representa em torno de um terço do PIB brasileiro. O país possui condições favoráveis para a realização de práticas agrícolas em toda sua extensão territorial em termos de clima, solo, recursos hídricos e relevos que permitem o cultivo da terra. Destaca-se como maior produtor mundial de café, laranja e açúcar, além de ser o segundo maior produtor de soja e o maior exportador de carne bovina e de aves no mundo (BRASIL, 2016).

A bovinocultura de corte é uma atividade econômica de extrema importância para o Brasil, que conta com o segundo maior rebanho comercial do mundo. Estima-se que o rebanho brasileiro seja de aproximadamente 200 milhões de cabeças (BRASIL, 2016). A partir do ano de 2004, o país tornou-se líder na exportação de carne *in natura*, exportando principalmente para o Egito, Hong Kong, China e Rússia. A produção de animais de corte estende-se por todas as regiões do país, porém três regiões merecem destaque, sendo elas a região Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Os estados com maior representatividade na atividade são respectivamente Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS) (ABIEC, 2016).

Por ser um país de dimensões continentais, a pecuária no Brasil é diferenciada nas regiões citadas anteriormente, devido principalmente aos fatores climáticos de cada região. Na região Centro-Oeste predominam os biomas Cerrado e Pantanal, e o clima tropical, sendo que durante o ano existem duas estações bem distintas que determinam a criação dos bovinos. O clima da região Sudeste e Centro-Oeste caracteriza-se por invernos secos e verões chuvosos, devido a essa característica os animais criados nessas ecorregiões são de raças zebuínas (*Bos indicus*). Os zebuínos são animais de origem indiana que evoluíram em ambiente de clima tropical, e devido a sua melhor adaptação a esse tipo de clima as raças zebuínas se difundiram bastante no território brasileiro. O rebanho zebuínio brasileiro é composto principalmente pelas raças Nelore, Gir, e Guzerá (ABIEC, 2016).

Os bovinos europeus introduzidos no Brasil podem ser classificados em três categorias, são elas as raças Britânicas, raças Continentais e as raças Crioulas. Na região Sul a pecuária se diferencia devido ao clima subtropical úmido. Por apresentar estações do ano bem definidas e temperaturas mais amenas, os bovinos de raças europeias são mais adaptados a essa região.

As raças Crioulas correspondem aos primeiros bovinos introduzidos pelos colonizadores nas Américas no século XVI (MATEUS et. al., 2004). No Brasil, as raças Pantaneiro, Caracu, Curraleiro, Pé- Duro e a Crioula Lageana merecem destaque. As raças Crioulas diferem-se das raças europeias devido, principalmente, à adaptação ambiental que estes animais sofreram e foram submetidos ao serem trazidos para o Brasil. Serrano et. al. (2004), analisou as prováveis origens das raças crioulas através de DNA microssatélites e constatou-se que as raças tiveram origens distintas. A raça Crioula Lageana originou-se na Península Ibérica, ou seja, raça originada de Portugal e Espanha.

3.2 Raças Crioulas

O primeiro rebanho de bovinos trazido por colonizadores para o Brasil foi desembarcado em São Vicente no ano de 1534 (LIMA et al., 1990). As raças provenientes da Península Ibérica foram expostas por um longo processo de seleção natural, fato este que desenvolveu características que permitiram a sobrevivência destes animais em localidades onde a oferta de alimentos era pobre em nutrientes, as temperaturas eram elevadas, havia a presença de novos parasitas e agentes patogênicos (SPITZE, 2003).

Embora as raças nacionais sejam menos produtivas que as comerciais, é interessante que as primeiras são adaptadas às condições ambientais podendo trazer contribuições aos programas de melhoramento genético já existentes. A necessidade de preservar raças menos produtivas vem recebendo maior atenção, uma vez que pode se constituir instrumento para melhorar a rusticidade de bovinos de alta produtividade, mas de baixa capacidade de adaptação (EGITO et al., 2002).

3.3 Raça Crioula Lageana

O gado Crioulo Lageano é caracterizado pelos chifres longos, característica que mostra que possivelmente esses animais descendem dos bovinos Hamíticos domesticados no Egito há aproximadamente 5000 anos a.C. (MARIANTE & CAVALCANTE, 2000). Os bovinos Hamíticos migraram da África para o sul da Espanha e Portugal e, posteriormente, chegaram ao continente americano juntamente com os colonizadores europeus (SPRITZE, 2003).

As condições peculiares do Planalto Catarinense em conjunto com a baixa disponibilidade de alimentos resultaram na formação de uma raça extremamente adaptada as condições ambientais dos campos nativos de Santa Catarina, que correspondem a invernos frios com grande incidência de geadas e verões brandos. (RIBEIRO, 1993; SPRITZE, 2003).

Os animais Crioulo Lageanos apresentam duas variedades, a mocha e a aspada. Os machos aspados possuem longos chifres que se prolongam como uma espécie de gancho. As fêmeas apresentam chifres com pontas para atrás e com a porção distal elevada. Os bovinos também podem apresentar mais de quarenta tipos de pelagens diferentes, sendo mais comum a “africana”, que pode se caracterizar por lombo e barriga brancos, pelos vermelhos ou pretos ao redor dos olhos, manchas pretas ou vermelhas no costilhar, e com focinho e orelhas da mesma cor (PAYNE, 1970; CAMARGO & MARTINS, 2005).

No século XX, muitos desses animais foram cruzados com raças exóticas (principalmente europeias), e os resultados positivos obtidos destes cruzamentos foram atribuídos exclusivamente às raças europeias, o que estimulou a importação de reprodutores destas raças, implicando na drástica redução da população de bovinos crioulos (MARIANTE & CAVALCANTE, 2000). A população do gado Crioulo Lageano é constituída atualmente por aproximadamente três mil animais, fato este que fez com que a *Food and Agriculture Organization* (FAO) os colocasse na lista de animais em risco de extinção (CAMARGO & MARTINS, 2005).

Segundo Ribeiro (1993), em condições ambientais semelhantes as do Planalto Catarinense, esses animais apresentam excelente produção leiteira e habilidade materna, e não apresentam dificuldades de parto, fato relacionado ao peso e ao tamanho dos terneiros ao nascer. Os terneiros são bem adaptados ao meio, porém

são deficientes em rendimento e conformação de carcaça, pois apresentam pouca deposição muscular e grande proporção de costilhar.

Em condições ambientais similares as que ocorrem nos campos nativos do Planalto Catarinense, mesmo sem ter sofrido seleção artificial, Ribeiro (1993) comparou o crescimento de bovinos Crioulo Lageanos com a raça Nelore. O autor constatou que a velocidade de crescimento da raça Crioula Lageana se compara ao da raça Charolês, sendo superior quando comparada ao Nelore. Quando se refere à característica de habilidade materna, a raça também é superior nas condições de campos nativos da região em questão.

Os indivíduos da raça Crioula Lageana apresentam maturidade sexual tardia, sendo este um fator crítico na cadeia produtiva da carne bovina no Brasil, pois segundo Forni *et al.* (2003), o desempenho reprodutivo dos animais é um dos principais fatores que determinam a eficiência total de produção de um rebanho. Deste modo, animais sexualmente precoces são desejáveis em rebanhos bovinos, logo, a característica precocidade sexual deve ser incluída em programas de seleção.

3.4 Características Reprodutivas e Programas de Melhoramento Genético

Características reprodutivas como a precocidade sexual são difíceis de serem trabalhadas em programas de melhoramento animal por não serem de fácil mensuração. Além disso, características reprodutivas apresentam, geralmente, baixas estimativas de herdabilidade e não respondem rapidamente à seleção (MERCADANTE *et. al*, 2000).

O advento das técnicas de biologia molecular tornou possível o estudo mais detalhado de genes relacionados com características quantitativas (QTL – *Quantitative Trait Loci*), permitindo maior eficácia dos programas de melhoramento genético através da seleção de animais com o uso de marcadores moleculares (LAUREANO, 2006).

Dentre os possíveis genes candidatos à marcação molecular, quando se refere à precocidade sexual, estão aqueles que codificam os hormônios IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) e a prolactina (LAUREANO, 2006), fato atribuído aos efeitos complementares que esses hormônios apresentam na reprodução,

atuando no processo de foliculogênese (NOLIN *et al.*, 1980, SPICER *et al.*, 1993, PHELPS *et al.*, 2003). Os estudos relacionando estes genes com a precocidade sexual são escassos, logo, mais pesquisas envolvendo marcadores moleculares com características reprodutivas em bovinos devam ser realizadas.

3.5 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I)

O IGF-I, ou somatomedina C, é um peptídeo composto por 70 aminoácidos pertencente a superfamília da insulina, devido a sua relação estrutural com a pró-insulina (ANDOH, 2005). O gene do IGF-I está situado no cromossomo 5 bovino, localizado na região próxima a 100 cM (BISHOP *et al.*, 1994b). É um potente mitógeno, isto é, uma substância que estimula a proliferação celular, desencadeando a mitose sintetizada por diversos órgãos, principalmente pelo fígado em resposta do GH produzido pela hipófise (YAKAR, *et al.*, 1999) e que atua como mediador metabólico relacionado com o início da puberdade em novilhas (RADCLIFF *et al.*, 2004; BELTRAN, 2007).

O IGF-I é um mediador dos efeitos biológicos do hormônio pituitário GH (Hormônio de Crescimento) (BOGUSZEWSKI, 2001), ou seja, desempenhando funções importantes no crescimento e desenvolvimento dos animais. A mediação dos efeitos do hormônio de crescimento pelo IGF-I, contudo, pode não só relacionar este hormônio com as funções de crescimento, mas também com a precocidade sexual. Isso se deve ao fato dessa característica apresentar-se relacionada fisiologicamente com o tamanho à maturidade (*frame-size*) dos animais que, geralmente, é considerada como o ponto no qual a massa muscular atinge o máximo crescimento com conseqüente aumento do desenvolvimento do tecido adiposo. O peso e a condição corporal, durante o período pré-puberal, são fatores determinantes para a primeira ovulação (GARCIA *et al.*, 2002).

Beltran (2007) observou maiores concentrações de IGF-I em animais que alcançaram a primeira prenhez antes dos 16 meses, comparado com novilhas que não apresentaram prenhez antes desta idade. A correlação encontrada foi positiva entre a concentração plasmática de IGF-I e o peso corporal, sugerindo que esse hormônio é importante na determinação da maturidade sexual. A concentração plasmática do IGF-I é dependente do status de GH (SCHREIBMAN *et al.*, 1993) e,

apesar dessa concentração representar somente a produção hepática desse hormônio, existem evidências de que outros tecidos também são capazes de produzi-lo, como o muscular, o adiposo, cérebro, gônadas e células da granulosa. Neste contexto, percebe-se que o IGF-I participa de diversas vias fisiológicas nos organismos.

Portanto, a utilização de técnicas de marcação molecular no gene deste hormônio em populações de bovinos da raça Crioulo Lageano deve ser considerada, pois permite a identificação de polimorfismos genéticos que possam apresentar retornos econômicos, como por exemplo, a redução da idade ao primeiro parto.

3.6 Melhoramento Genético e Marcadores Moleculares

A utilização de animais domésticos não serve só como componente primário indispensável ao desenvolvimento e prosperidade do homem, mas também pode ser considerado elemento pró-ativo do desenvolvimento tecnológico (EUCLIDES FILHO, 1999). A partir do século XX, a produção animal deixou de ser uma atividade apenas de subsistência e passou a ser conduzida como uma atividade comercial. Portanto, ocorreu uma grande demanda por animais que apresentassem um melhor desempenho além de que fossem mais bem adaptados às diversas condições ambientais (COUTINHO & ROSÁRIO, 2010).

O melhoramento genético de animais é o resultado de um processo de direção dos acasalamentos efetuados em raças ou linhas puras para a obtenção de ganho genético e fenotípico em características de interesse econômico da produção animal. A fim de se obter acasalamentos desejáveis, os melhores reprodutores são identificados, sejam eles machos ou fêmeas, através do valor genético da característica de interesse para a seleção. (PEIXOTO; LEDUR; FIGUEIREDO, 2014).

Existem duas ferramentas disponíveis para se promover o melhoramento genético das espécies: seleção e cruzamento. A seleção é o processo que indica quais serão os pais da próxima geração, permitindo que as características desejadas de uma geração sejam herdadas para a subsequente. A seleção tem objetivo de melhoria e/ou fixação de características de importância na população, isto é, aumentar a frequência de alelos favoráveis (EUCLIDES FILHO, 1999). Os sistemas de acasalamento são utilizados de forma ampla para animais domésticos criados com

fins comerciais, consistindo elementos complementares no processo de seleção. Denomina-se cruzamento quando o acasalamento ocorre entre animais pertencentes a raças diferentes, sendo uma forma de conseguir melhorar características, porém não elimina a necessidade e a importância da seleção como método de melhoramento genético.

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e os cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, aumentando consideravelmente a eficiência dos programas de melhoramento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1988). Os marcadores moleculares são amplamente utilizados nos estudos de genética populacional, no mapeamento e nas análises de similaridade, podendo ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA específico, expresso ou não (BRAMMER, 2000).

3.7 Técnicas de Biologia Molecular e Marcadores Moleculares

Os primeiros trabalhos para desenvolver e caracterizar marcadores moleculares para espécies de interesse zootécnico datam do início da década de 1980. Essas tecnologias trouxeram novas soluções para aplicações já solidificadas e também estão permitindo o desenvolvimento de novas aplicações, produtos e processos, com uso direto nas cadeias produtivas da pecuária mundial (CAETANO, 2009).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase) foi descrita pela primeira vez em 1985, e entre as técnicas básicas da biologia molecular desenvolvidas na última década, nenhuma teve tamanho impacto revolucionário entre os pesquisadores da área. (PERSING, 1991; ERLICH, 1989). A técnica consiste em amplificar com iniciadores específicos (*primers*) o fragmento de interesse. Este fragmento é purificado e submetido a um tratamento com uma enzima de restrição específica que reconheça apenas um dos alelos. Posteriormente, os fragmentos são separados por eletroforese para diferenciação dos alelos por tamanho (CAETANO, 2009).

Os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de nucleotídeo único) são marcadores moleculares com base em informações de sequências de

DNA. São utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na variação da posição de um único nucleotídeo (FALEIRO, 2007). O método mais básico para genotipagem de SNPs em regiões específicas do genoma é baseado na técnica de PCR-RFLP (MAEDA et al., 1989).

O RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) proposto por Botstein et al. (1980) é um dos grupos mais usados de marcadores moleculares. O polimorfismo para comprimento de fragmentos de restrição é capaz de diferenciar indivíduos através de variações individuais devido a inserção, deleção, mutação e inversão nos nucleotídeos. Nesta técnica são utilizadas enzimas de restrição que irão clivar o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas, desse modo cada indivíduo apresentará o seu padrão de fragmentos, chamado “perfil de digestão”, detectado pelo número e tamanho dos fragmentos gerados (RASSMUSEN, 2012).

Atualmente existem diversas tecnologias aliadas à genética molecular que podem ser utilizadas no estudo de marcadores moleculares, como citado acima, e sua escolha irá depender do objetivo do estudo, recursos financeiros disponíveis recursos humanos, infraestrutura disponível, e nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A etapa de coleta de dados foi realizada na região do município de Lages/SC nos anos de 2015 e 2016. Foram coletadas manualmente 70 amostras de pelos da vassoura da cauda de animais previamente contidos no brete, laçadas e puxadas firmemente porções de 15 a 25 pelos por vez. Cada amostra apresentava aproximadamente 50 pelos, e foram acondicionadas em embalagens individuais devidamente identificadas. O excesso dos pelos foi cortado com tesoura, e fios de cerca de 3 cm contendo os folículos pilosos foram acondicionados. Posteriormente, cerca de 40 folículos/animal foram transferidos para tubos de microcentrifuga (1,5 mL) identificados com a numeração do animal e mantidos a -20° C até o momento da extração do DNA genômico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Centro de

Ciências Agrárias, Florianópolis/SC. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, adaptado de Lima (2003). Dentro de cada microtubo de 1,5 mL contendo os folículos foram adicionados 500 µL de solução TE-TWEEN (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20), seguido de incubação em banho-maria a 65°C por 1,5 horas com agitação manual periódica. Posteriormente foi adicionado 15 µL de proteinase K (20 µg/µL) incubando-se as amostras a 55°C por 6 horas, agitando-se por inversão a cada 30 minutos e depois a 37°C *overnight*. Após esta etapa, foi adicionado 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos passaram por vigorosa agitação por 10 segundos em agitador automático tipo vórtex. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo devidamente identificado, resultando em um volume final de aproximadamente 300 µL. A precipitação do DNA foi feita com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 µL) e etanol absoluto gelado (1000 µL), sendo feita a mistura por imersão seguida de repouso durante 1,5 horas a -20°C com uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Finalmente foi descartado o sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida ressuspendido em 100 µL de água ultrapura e armazenado a 4°C até o uso.

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

Para o isolamento e amplificação da região correspondente ao exon 6 e do gene IGF-I bovino foi desenhado um par de *primers* com base nas informações disponíveis no *GenBank* (HG797641.1; HG797642.1; HG797643.1; HG797644.1; HG797645.1; HG797646.1; HG797648.1; HG797647.1, HG797649.1.). O par de *primers* desenhado possuía as seguintes sequências de nucleotídeos, respectivamente:

IGF-I – Forward 5' – AAA AGG GAG TGC AGG AAC AAGA - 3'

IGF-I - Reverse 5' - CAA CTC CAG GGT CGT TTT TGC- 3'

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L/amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 μ M de cada primer, tampão PCR 1X, 0,5 μ M de $MgCl_2$, 100 μ M de dNTPS, 0,75 U *EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®)*. Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, e seguiram a seguinte programação: primeiro passo: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, segundo passo: 95°C por 1 minuto para desnaturação, terceiro passo: 67,0°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, quarto passo: 72°C por 1 minuto para extensão da *Taq Polimerase*, estes ciclos foram repetidos 10 vezes, sendo que a cada novo ciclo a temperatura do terceiro passo diminuiu 1°C. O quinto passo: 95°C por 1 minuto, sexto passo: 57°C por 1 minuto para anelamento dos primers, sétimo passo: 72°C por 1 minuto, oitavo passo: 72°C por 5 minutos. Este ciclo repetiu-se do quinto ao oitavo por 24 vezes, totalizando 35 ciclos. Após o oitavo passo, as amostras foram mantidas a 4°C para conservação até a retirada do termociclador (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições da reação de PCR para amplificação do fragmento do gene do IGF-I

Etapas	Reação de PCR (<i>Touchdown</i>)			
	1ª Etapa (10 ciclos)		2ª Etapa (25 ciclos)	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
Desnaturação	95	1'	95	1'
Associação dos iniciadores	67 (↓ 1°C/ciclo)	1'	57	1'
Extensão	72	1'	72	1'

T=Temperatura

Para verificar o resultado da amplificação uma alíquota de 3 μ L de cada amostra foi misturada a 3 μ L de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com brometo de etídio (0,05 μ g/ml), utilizando tampão TBE 1X a 70V por aproximadamente 70 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX®

(Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

Após o isolamento e a amplificação da região de interesse do gene do IGF-I pela PCR, as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. As enzimas de restrição escolhidas foram Bam-HI e XmnI (*New England BioLabs®*), com os seguintes sítios de restrição:

BamHI - 5´ -G*GATCC - 3´

3´- CCTAG*G – 5´

XmnI - 5´-GAANN*NNTTC – 3´

3´CTTNN*NNAAG – 5´

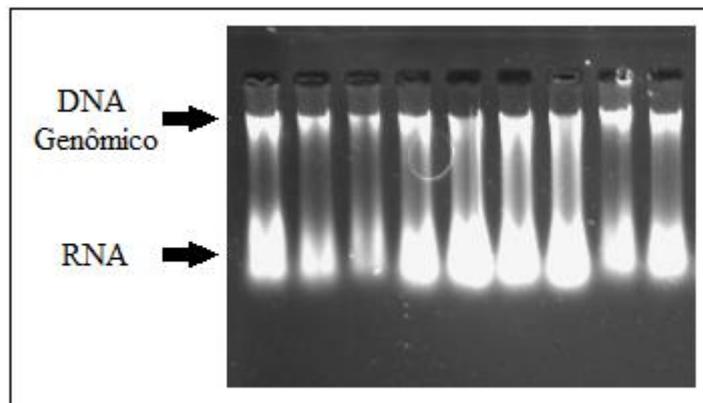
Cada uma das distintas digestões foi realizada em volume final de 20 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 10 unidades das enzimas BamHI e XmnI. O procedimento foi realizado em termociclador Biometra®. A digestão da enzima BamHI foi feita por 3 horas a 37°C depois 20 minutos a 80°C para inativação da enzima e finalmente 4°C para conservação das amostras até a análise. A digestão da enzima XmnI foi feita por 15 minutos a 37°C e posteriormente a 65°C por 20 minutos para inativação da enzima e, por último a 4°C para conservação das amostras até a fotodocumentação.

Para visualização do resultado 7µl de cada amostra foram misturados a 3µl de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) para realização da eletroforese em gel de agarose (2,5%) com brometo de etídio (0,05 µG/ml), em tampão TBE 1X a 70V, por 1 hora e 40 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento usado para extração do DNA genômico dos folículos pilosos dos bovinos mostrou-se eficiente como mostra a Figura 1, na qual a primeira banda formada no padrão de migração mostra uma quantidade satisfatória de DNA extraído. Todavia, a grande maioria das amostras apresentaram bandas arrastadas, o que sugere sinais de degradação do DNA. A banda formada no fim do padrão e fortemente visível indica RNA (SALMAM e LAUREANO, 2006). Entretanto, a presença do RNA e DNA degradado não comprometeu as análises posteriores de PCR e RFLP.

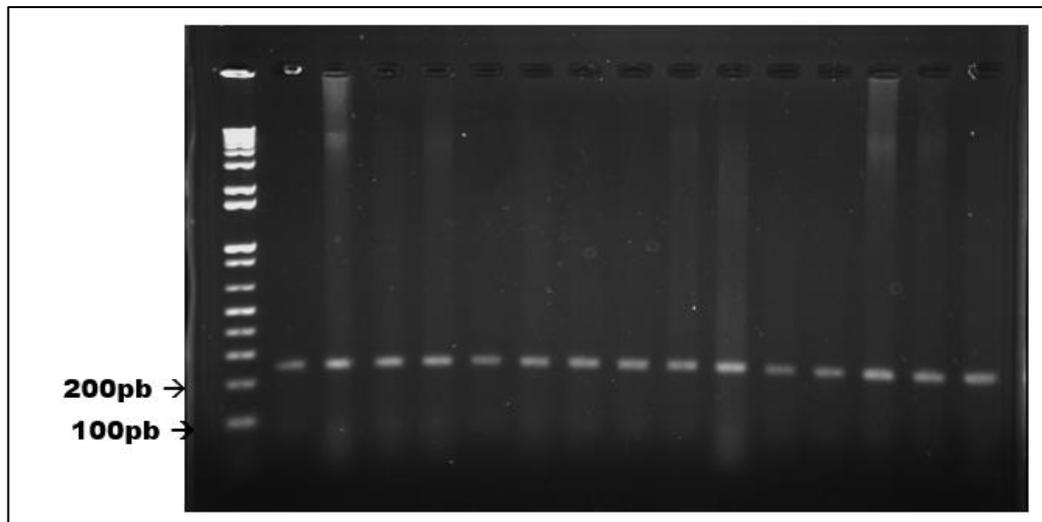
Figura 1. Exemplo de amostras de DNA extraído. Eletroforese em gel de agarose a 0,5%.



Os resultados obtidos na extração corroboram com Laureano et al. (2006) que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) para extração de pelos de novilhas da raça Nelore.

Para garantir a melhor visualização do anelamento dos primers e eficácia da técnica, foi realizada o método de *PCR-touchdown*. Os fragmentos amplificados tinham em torno de 252pb, indicando o funcionamento dos *primers* desenhados para a região estudada (Figura 2).

Figura 2: Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores IGF-C, FWD e VER. Gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).



A partir dos resultados obtidos nesta etapa foi possível a realização da técnica de RFLP, onde as amostras continham apenas a região de interesse do gene do IGF-I avaliada neste trabalho e estas foram digeridas com as enzimas BamHI e XmnI. Os resultados podem ser observados nas figuras 3 e 4.

Figura 3: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease BamHI. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

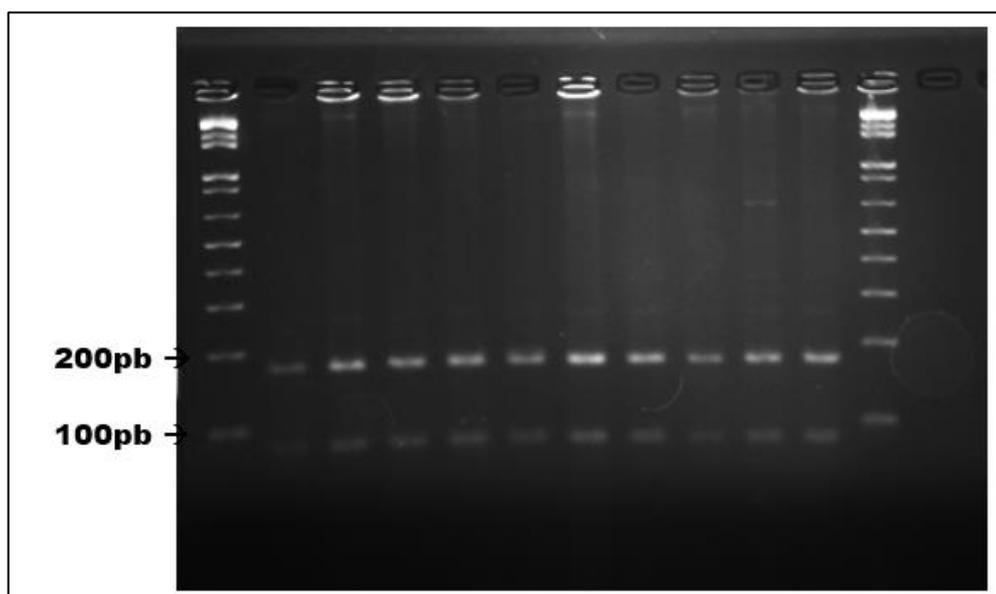
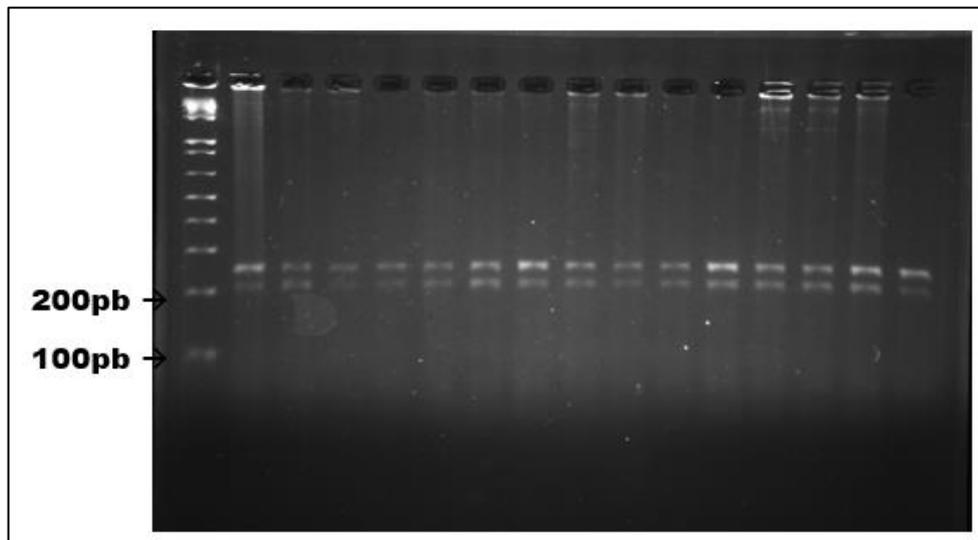


Figura 4: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease XmnI. Gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).



Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os produtos amplificados de PCR foram digeridos em apenas 1 fragmento com banda inferior a 252pb. Este mesmo padrão foi obtido em todas as 70 amostras correspondentes aos animais, caracterizando um monomorfismo genético para a região avaliada com a técnica de RFLP utilizando-se as enzimas BamHI e XmnI.

Estudos de Laureano et al. (2006) encontraram polimorfismos no gene do hormônio de crescimento semelhante à insulina em bovinos da raça Nelore utilizando a técnica de PCR-RFLP com a enzima SnaBI. Isto demonstra que outros estudos devem ser realizados através da utilização de outras enzimas de restrição e/ou outras técnicas de identificação de polimorfismos no gene do hormônio IGF-I.

Sugere-se que estudos posteriores trabalhem com enzimas de restrição diferentes e com outras regiões (exons) do gene IGF-I a fim de buscar polimorfismos na população da raça Crioula Lageana.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as técnicas de extração de DNA genômico e a aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região de interesse do gene do IGF-I foram eficazes, entretanto, os resultados mostram que a região estudada é monomórfica para os sítios de clivagem das enzimas de restrição Bam-HI e XmnI no gene do hormônio de crescimento semelhante à insulina em animais da raça Crioula Lageana.

6. REFERÊNCIAS

- ABIEC (Brasil). Secretaria da Agricultura. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina Brazilian Beef Exports**. 2016. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/anual-310816.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2016.
- ANDOH, T. Development of Non-Radioisotopic Immunoassay Systems for Measuring Flounder IGF-I. **Zoological Science**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1023-1030, set. 2005. Zoological Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.22.1023>.
- ARAÚJO, R. V. Os jesuítas dos 7 povos. Porto Alegre: **La Salle**, 1990. 467 p.
- BAILEY, E.; LEAR, T. L. Comparison of Thoroughbred and Arabian horses using RAPD markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 105-108, 1994. Supplement.
- BELTRAN, M. P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.
- BISHOP, D. K.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body energy reserve influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.72, n.10, p.2703-2708, 1994a.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. T., SUNDEN, S. L.F., HAWKINS, G. A., TOLDO, S. S., FRIES, R., GROSZ, M. D., YOO, J., BEATTIE, C. W. A genetic linkage map for cattle. **Genet.**, v.136, n.2, p.619-639, 1994b.
- BOGUSZEWSKI, C. L. Genética molecular do eixo GH-IGF-I. **Arq. Bras. Endocr. Metab.**, v.45, n.1, p.5-14, 2001.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Bovinos e Bubalinos**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- BRYNE, P.F., MCMULLEN, M.D. **Defining genes for agricultural traits: QTL analyses and the candidate gene approach**. 1996. Probe 7:24-27.
- CAETANO, A. R.. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **R. Bras. Zootec.** 2009, vol.38, p.64-71.
- CAMARGO, M.A.R; MARTINS, V.M.V. Raça bovina Crioula Lageana, um patrimônio genético. **A Hora Veterinária**. Ano 24, n.143, p.61-64, jan/fev 2005.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F.; Biotecnologia animal. **Estudos Avançados (USP. Impresso)**, v. 24, p. 123-147, 2010.

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

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

ERLICH, H. A. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Immunology**, Vol, 9, No. 6, 1989

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 131, p. 479-491, 1992.

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

FALEIRO, F.G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

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

FORTUNE, J.E. et al. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 8283, p. 109-126, 2004.

GARCIA, M.R; AMSTALDEN, M. WILLIAMS, S.W. et al. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2158-2167, 2002.

GIL, F. M. M. **Polimorfismo no gene do hormônio grelina em búfalas (*Bubalus bubalis*) e sua associação com produção e qualidade do leite**. 2012. 57f. Dissertação (Doutor) – Curso de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista ‘Julio de Mesquita Filho’, FCAV, Jaboticabal, 2012.

GROCHOWSKA, R. et al. Association between gene polymorphism of growth hormone and carcass traits in dairy bulls. **Animal Science**, [s.l.], v. 72, n. 03, p.441-447, jun. 2001. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s135772980005195x>.

HORVAT, S. MEDRANO, J.F. Interval mapping of high growth (hg), a major locus that increases weight gain in mice. **Genetics**, 139:1737-1748, 1995.

IBGE. **Pesquisa pecuária municipal**. Brasília: IBGE, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 31 out. 2016.

INDEPENDÊNCIA. A pecuária de gado de corte, e o ciclo da pecuária. Relações com investidores. **Ri independência**. 26 abr. 2010.

JONES J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Review**. n. 16, p. 3-34, 1995.

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

LIMA, M. L. P.; BONILHA NETO, L. M.; RAZOOK, A. G. O gado Caracu. **Revista dos Criadores**, São Paulo, v. 59, p. 28-30, 1990.

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

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.275-291, 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1011605013259>.

PHELPS, J. Y.; BUGG, E. M.; SHAMBLOTT, M. J.; VLAHOS, N. P.; WHELAN, J.; ZACUR, H. A. Prolactin gene expression in human ovarian follicular cells. **Fertil. Steril.**, v.79, n.1, p. 182-185, 2003.

MARIANTE, A. da S. **Conservação de bovinos Crioulos no Brasil**. In: **Evaluación y elección de biotipos de acuerdo a los sistemas de producción**, ed. Por Juan P. Puignau. Montevideo: IICA-PROCISUR, 368p,1993.

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

MARTINS, C. E. N.; QUADROS, S. A.; TRINDADE, J. P. P.; QUADROS, F. L. F.; COSTA, J. H. C.; RADUENZ, G. Forma e função em vacas Braford: o exterior como indicativo de desempenho e temperamento. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.58, n. 223, p. 425-433. 2009.

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

MERCADANTE, M. E. Z.; LÔBO, R. B.; OLIVEIRA, H, N. Estimativas de (Co)variâncias entre características de reprodução e de crescimento em fêmeas de um rebanho Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, n.4., p.997-1004, 2000.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998a.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **BIOTECNOLOGIA Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998b.

NOLIN, J. M. Incorporation of endogenous prolactin by granulosa cells and dictyate oocytes in the posypartum rat: effects of estrogen. **Biol. Reprod.**, v.22, n.2, p.417-422,1980.

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

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

PEIXOTO, J. O.; LEDUR, M. C.; FIGUEIREDO, E. A. P. Melhoramento genético. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT00>. Acesso em: 25 abril 2017.

PERSING, DAVID H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. **Journal of Clinical Microbiology**, july 1991, p. 1281-1285 vol. 29, no. 7

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

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

RADCLIFF, R. P.; VANDEHAAR, M. J.; KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B. K.; TUCKER, H. A.; LUY, M. C. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1229-1235, 2004.

RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. **Genetic similarity among Brazilian cattle breeds (Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras)**. *Pesq. Agro. Bra.*, v. 39, p. 97-100, 2004.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

RIBEIRO, J. A. R. **Gado Crioulo Lageano, uma alternativa sustentada para as pastagens naturais do Planalto Catarinense.** In: Simpósio da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais. Rio de Janeiro, p. 245-262, 1993.

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

SANTIAGO, A. A. **O gado Nelore: história, etnografia, seleção, melhoramento.** São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1972. 572 p.

SERRANO, G. M. et al. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa agropecuária brasileira.**, v. 39, n. 6, p. 543-549, jun. 2004.

SCHREIBMAN, M. P.; SCANES, C. G.; PANG, K. T. **The endocrinology of development and metabolism in vertebrates.** Academic Press Inc, 1993, 607p.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin like growth factor I and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production and(or) insulin like growth factor I production in vitro. **J.Anim. Sci.**, v.71, n.5, p.1232-1241, 1993.

SPICER, L.J.; CHASE JUNIOR, C.C.; RUTTER, L.M. Relationship between serum insulin-like growth factor-I and genotype during the postpartum interval in beef cows. **J.Anim. Sci.**, v.80, n.3, p.716-722, 2002.

SPRITZE, A. Uso de marcadores moleculares RAPD na caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - **Universidade de Brasília, Brasília**, 2003.

VEIGA, T. F. **Raça Crioula Lageana: estudo de características de carcaça e relação entre morfologia e intervalo entre partos.** 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2011.

YAKAR, S.; LIU, J.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B. LEROITH, D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. 1999. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, Developmental Biology 96:7234-7239.