

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

ANDRÉ RICARDO RIGHETTO

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE KAP8 EM BOVINOS DA
RAÇA CRIOLA LAGEANA**

FLORIANÓPOLIS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE ZOOTECNIA

ANDRÉ RICARDO RIGHETTO

**APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE KAP8 EM BOVINOS DA
RAÇA CRIOULA LAGEANA**

Trabalho de Conclusão Curso apresentado para obtenção
do Diploma de Graduação em Zootecnia da Universidade
Federal de Santa Catarina

Orientador: André Luís Ferreira Lima

FLORIANÓPOLIS

2019

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

Righetto, André Ricardo
Aplicação de PCR-RFLP no gene KAP8 em bovinos da raça
Crioula Lageana / André Ricardo Righetto ; orientador,
André Luís Ferreira Lima, 2019.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Bos taurus. 3. marcadores moleculares.
4. bovinocultura. 5. mocho. I. Lima, André Luís Ferreira .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Zootecnia. III. Título.

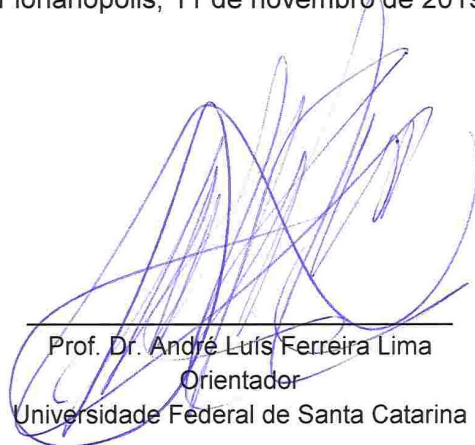
André Ricardo Righetto

APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NO GENE KAP8 EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

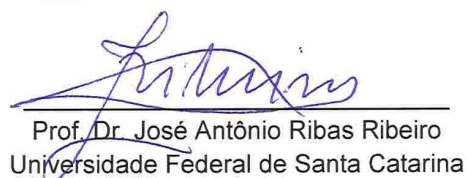
Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para a obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 11 de novembro de 2019

Banca Examinadora:



Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. José Antônio Ribas Ribeiro
Universidade Federal de Santa Catarina



Bióloga Aline Chiarelli Cristofolini
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria, por saber que pude contar com a ajuda e incentivo de muitos, na realização deste trabalho de conclusão de curso, que registro os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço aos meus pais, Maria Bernadete Soares Righetto e Vânio Righetto, pelo seu incentivo, apoio, exemplo e dedicação para que eu e meus irmãos alcançássemos nossos objetivos.

Aos colegas do Curso de Zootecnia que cursaram disciplinas comigo, os já formados, os que se formam comigo, aos que ainda estão adquirindo as competências para se formarem e, também, aqueles que por diversos motivos tiveram de deixar o curso. A caminhada foi longa, mas ela com certeza vale muito a pena.

Ao Curso de Zootecnia, ao Centro de Ciências Agrárias, a Fazenda Experimental da Ressacada e a Universidade Federal de Santa Catarina por terem possibilitado meu acesso ao conhecimento e crescimento. Seu qualificado corpo docente, seu corpo técnico-administrativo e terceirizados. Aprender fica muito mais fácil quando o ambiente é organizado e propício ($F=G+E$, lembram?).

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima, por primeiramente acreditar em mim e neste projeto de pesquisa, pela paciência, suporte e confiança.

Aos colegas estudantes e bolsistas do LEPGA por toda a ajuda e perseverança durante os dias de análise. Especialmente a TAE Aline Chiarelli Cristofolini pela sua imensa serenidade e disposição.

Aos colegas bolsistas do LED Lab (Leders) por todas as risadas, impassibilidade e pelas longas horas passadas juntos. Também aos professores do laboratório, aos TAEs Neiva Gasparetto e Alexandre Pinho e terceirizados.

A Deus.

Agradeço também ao apoio da FAPESC pelo financiamento do projeto realizado.

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*Uma vez que você
tenha experimentado voar,
você andará pela terra com
seus olhos voltados para céu,
pois lá você esteve e para lá
você desejará voltar."*

Leonardo da Vinci

RESUMO

O melhoramento genético para gado mocho se constitui em uma opção não invasiva de alterar esta característica na população, possibilitando direcionar os acasalamentos para a obtenção de ganho genético e fenotípico. O uso de marcadores moleculares que possuam associação com características de interesse constitui uma ferramenta que pode aperfeiçoar este processo. O objetivo deste estudo foi procurar a existência de polimorfismo no gene KAP8 em animais da raça crioula lageana utilizando a técnica de PCR-RFLP. Foram extraídas amostras de DNA genômico de 109 animais pertencentes a rebanho no município de Lages-SC. Para isolar e replicar a região correspondente ao exon-I e intron-I do gene KAP8, foram utilizados os iniciadores KAP8 Forward 5' - ACGCCTTGTGTTTTTCGCC - 3' e KAP8 Reverse 5' - CAGCTAACTGGGAGGCTGAT - 3'. Para as reações de RFLP, foi utilizada a endonuclease de restrição Bsr-I. As reações de PCR geraram um produto de aproximadamente 400pb nas amostras dos animais. Após a digestão do produto de PCR com a enzima, o mesmo padrão de migração dos fragmentos de DNA (bandas visíveis no gel) foi verificado em todas as amostras, caracterizando um monomorfismo genético para a região estudada. Este resultado sugere uma conservação do gene KAP8 para a região de corte da enzima Bsr-I nos animais da Raça Crioula Lageana.

Palavras-chave: *Bos taurus*, marcadores moleculares, bovinocultura, mocho.

LISTA DE FIGURAS;

Figura 3.1 Gravura encontrada no século XIX em Augsburg.....	17
Figura 3.2 Exemplar de vaca da Raça Crioulo Lageano	20
Figura 3.3 Fenótipos de Cornos em gado Simmental	25
Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose 0,5% com amostras de DNA genômico extraído.....	33
Figura 5.2 Resultados da PCR touchdown com os primers para KAP8. Eletroforese em gel de agarose a 1%..	34
Figura 5.3 Resultados da PCR-RFLP com a endonuclease BsrI. Eletroforese em gel de agarose a 2,5%.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição Genética e Fenotípica por Sexo para os genes M e B.....	25
Tabela 2 Programação das condições do termociclador para a Reação de PCR	31
Tabela 3 Programação das condições do termociclador para a digestão enzimática.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

CBPA: Coordenação de Boas Práticas e Bem-estar Animal

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

FAO: Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

FAPESC: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LED Lab: Laboratório de Educação em Rede

LEPGA: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RNA: Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação)

TAE: Técnico-Administrativo em Educação

TCC: Trabalho de Conclusão de Curso

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. PANORAMA DA BOVINOCULTURA.....	16
3.2. RAÇAS BOVINAS E AS RAÇAS BOVINAS BRASILEIRAS.....	17
3.3. A RAÇA CRIOLA LAGEANA.....	19
3.4. OS CORNOS BOVINOS	21
3.5. HERANÇA DO CARÁTER MOCHO-ASPADO EM BOVINOS.....	23
3.6. PRÁTICAS DE MANEJO PARA DESCORNA/AMOCAMENTO.....	25
3.7. AS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À QUERATINA	27
3.8. MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO MELHORAMENTO ANIMAL.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os cornos são projeções permanentes na cabeça de várias espécies animais. São constituídos de uma cobertura de queratina e outras proteínas que envolvem um núcleo de osso vivo. Os cornos são distintos dos chifres, pois estes não são permanentes. Nos mamíferos, os cornos são encontrados principalmente entre os ungulados artiodáctilos ruminantes das famílias Antilocapridae (*Antilocapra americana*) e Bovidae (bovinos, caprinos, antílopes e etc.).

Geist e Walther (1971) destacam que muitas espécies de ungulados são gregários e que, portanto, o conhecimento da sua vida social é muito importante para melhor entender a biologia destes animais. Em bovinos, os cornos auxiliam nas técnicas de luta. Podem ser usados tanto para o animal se defender de predadores, quanto para lutar contra membros da sua própria espécie durante disputa de território, dominância ou disputa por acasalamento.

No entanto, para sistemas de produção os cornos não são desejáveis. De acordo com Villagran (1969, apud FIORAVANTI *et al.*, 1999) a descorna cosmética do gado proporciona uma aparência estética e uniforme, principalmente em animais de exposição, além de facilitar o manejo do rebanho e exigir menor espaço no cocho para a alimentação. Na visão de Canozzi (2015), procedimentos de manejo que provocam dor e sofrimento, como descorna, amochamento e castração em bovinos podem ser interpretados de forma negativa pelas pessoas. Além disso, a presença de cornos também pode causar prejuízos no manejo de abate, ao aumentar o número de lesões ou perdas em carcaças no pré-abate e transporte até/ou no frigorífico. (SCHAFBERG; SWAWE, 2015). Neste tema, Grandin (1981) concluiu que rebanhos contendo 25% a 50% de animais com cornos tinham 10,5% de lesões. A eliminação dos cornos reduziu as lesões para 2% a 5%.

Cardoso (2014) aponta que a formação de rebanhos mochos eliminaria, de forma natural, todo o constrangimento ético que envolve a descorna, uma vez que, o melhoramento genético para gado mocho se constitui em uma opção não invasiva (MEDUGORAC *et al.*, 2012). O gene para a característica fenotípica

mocho (sem cornos) é dominante sobre o aspado (com cornos). Para Peripolli (2014), o melhoramento genético pode ser descrito como 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. Ainda segundo o mesmo autor, marcadores moleculares são amplamente utilizados nos estudos de genética populacional, no mapeamento e nas análises de similaridade.

Jorge (2013) menciona que todas as características morfológicas de etiologia genética são determinadas por genes que são sequências específicas de bases nitrogenadas.

Muitas espécies de animais domésticos de produção consideradas atualmente como raças brasileiras têm em comum sua origem nos primeiros animais trazidos para o país a partir da Península Ibérica, no período colonial. O bovino Pantaneiro e o Curraleiro Pé-Duro são exemplos dessas raças, que são resultado de um processo de seleção natural, tendo como principal característica a rusticidade, adaptação e resistência a amplas variações ambientais, fundamentos da sobrevivência nos ambientes onde vivem atualmente, constituindo-se, portanto, em um precioso recurso genético.

A raça Crioula Lageana e sua variedade mocha foram reconhecidas pelo ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA - pela Portaria n° 1.048 de 31/10/2008. Esta raça descende diretamente dos bovinos Ibéricos remanescentes das Missões Jesuíticas. Estes animais receberam, também, na sua formação a contribuição genética dos bovinos de origem portuguesa, igualmente do tronco ibérico, introduzidos por Martim Afonso de Souza em 1534. A Crioula Lageana é produto da miscigenação de diferentes raças Ibéricas e de sua exposição às condições agrestes a que foi submetida por três centenas de anos de seleção natural no planalto sul brasileiro (VEIGA, 2011).

Segundo os apontamentos de Veiga (2009), alguns fatores importantes da raça Crioulo Lageana devem ser levados em consideração, como por exemplo: a mansidão e grande beleza das vacas, com cornos longos, pelagem de cor exuberante, e também a grande importância histórica, cultural e preservacionista, uma vez que a raça é parte integrante do ecossistema campo

nativo. Quem produz a raça acredita que a beleza dos cornos e da pelagem são inclusive fator de valorização dos animais.

No passado, a raça Crioula Lageana dominava a paisagem dos campos da Planato Catarinense. Porém com a introdução de novas raças de gado de origem europeia no final do século XIX e início do século XX a raça Crioula Lageana começou a ser substituída pelos produtores. Atualmente a população da raça Crioula Lageana gira em torno de 3.000 animais. Isso fez com que a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) a colocasse na lista de raças em risco de extinção e a incluísse na área de conservação de recursos genéticos (CAMARGO e MARTINS, 2005).

O presente estudo foi conduzido com o intuito de munir os produtores da raça crioula lageana de informações que os ajudem a definir os acasalamentos dirigidos na sua população para animais mochos. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de polimorfismo no gene KAP8 em bovinos da raça crioula lageana.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de polimorfismo no gene KAP8 em animais da raça Crioula Lageana.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Isolar e amplificar a região correspondente ao exon I e parte do intron I pertencente ao gene KAP8;
- Verificar a existência de polimorfismos genéticos na região correspondente ao exon I e parte do intron I pertencente ao gene KAP8;
- Verificar, em caso de polimorfismos, as possíveis associações fenotípicas com o caráter mocho nos animais avaliados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PANORAMA DA BOVINOCULTURA

Dados da FAO (2018), indicam que o rebanho bovino mundial superava 1 bilhão de animais distribuídos por todo o mundo, mas com grandes concentrações em Índia, Brasil, China, Estados Unidos e União Europeia, que são os maiores produtores. O rebanho brasileiro desenvolve dois grandes segmentos para o país, a produção de carne e leite. A importância da bovinocultura nesses dois segmentos se dá, principalmente, por apresentarem atividades em todos os estados brasileiros. O rebanho bovino brasileiro já superou o número de habitantes do país. Em 2018 o rebanho já contava 214 milhões de cabeças, 4 milhões à frente da população do país, estimada em 210 milhões no mesmo ano. Apesar de a Índia possuir 282 milhões de cabeças de gado, por motivos religiosos e culturais nem todo esse rebanho pode ser tratado como comercial. Logo, o Brasil é o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (IBGE, 2018).

Ainda segundo o IBGE (2018) o rebanho brasileiro encontra-se distribuído 22% na Região Norte do País, 12,5% na Região Nordeste, 17% na região Sudeste, 12% na região Sul e os restantes 34% na região que mais produz bovinos no país, a região Centro-Oeste. A amostra por raças apresenta uma composição de mais de 80% do rebanho composto por raças de origem indiana (*Bos taurus indicus*), devido a sua maior rusticidade, resistência a endo e ectoparasitas e adaptabilidade às condições climáticas predominantes de um país tropical. Com um clima subtropical mais ameno e uma maior disponibilidade e variedade de pastagens, a região Sul do país é mais propícia para a criação de raças taurinas, *Bos taurus taurus* (EUCLIDES FILHO e EUCLIDES, 2010).

Segundo a Revista Agropecuária (2012), essa representatividade da bovinocultura do Brasil se dá, principalmente, pelo clima tropical e a extensão territorial, permitindo a criação da maioria do gado em pastagens. Outros fatores são o investimento em tecnologia e capacitação profissional nessa área, além das políticas públicas de rastreamento do animal desde seu nascimento até o

abate, e o controle da sanidade animal e segurança alimentar, instituídas por meio de normativas do Ministério da Agricultura e Abastecimento – MAPA, via Coordenadoria de Boas Práticas e Bem Estar Animal (CBPA), que asseguraram que o país atendesse às exigências do mercado internacional.

3.2. RAÇAS BOVINAS E AS RAÇAS BOVINAS BRASILEIRAS

O gado doméstico (*Bos taurus*) é um bovino do gênero *Bos* e da ordem Artiodactyla, sendo um mamífero ungulado que apresenta dois dígitos em cada membro. É um ruminante, regurgita o alimento de volta a boca após a sua ingestão para ser novamente mastigado e deglutido. Acredita-se que a domesticação de bovinos começou aproximadamente entre 8.000 a 10.000 anos atrás.

Considera-se que o ancestral do gado doméstico seja o auroque (*Bos primigenius*), um bovino selvagem que habitou Europa, Ásia e norte da África. Assim, o processo de domesticação da subespécie de bovinos indianos originou o gado zebuino (*Bos taurus indicus*) enquanto o processo de domesticação da subespécie bovina eurasiática resultou no gado taurino (*Bos taurus taurus*). O auroque tornou-se extinto em 1627.

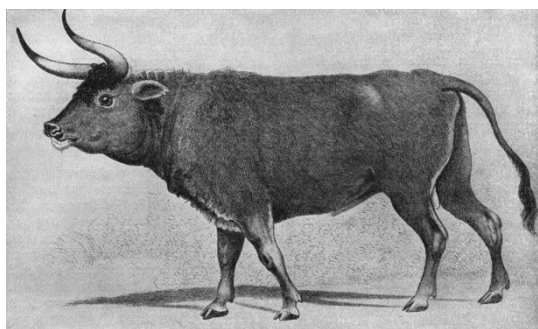


Figura 3.1 Gravura encontrada no século XIX em Augsburg. Ela pode representar um auroque (Fonte: Charles Hamilton Smith).

Segundo Felix (2016), o termo "raça" é comumente utilizado em relação a animais domesticados. Uma raça pode ser definida como sendo um grupo de subespécie de animais domésticos com características externas definíveis e

identificáveis que lhe permitem ser separadas por avaliação visual de outros grupos definidos de forma semelhante, dentro da mesma espécie. Um grupo para o qual a separação geográfica e/ou cultural de grupos fenotipicamente semelhantes levou à aceitação de sua identidade própria também formam raças distintas.

Da subespécie taurina podemos citar como representantes as raças Alentejana, Angus, Caracu, Charolais ou charolês, Devon, Frísia ou Holstein (Holandês), Hereford, Jersey, Limousin, Minhota ou Galega, Nguni e Simental. Alguns representantes na subespécie zebuína são as Brahman ou zebu americano, Gir, Guzerá, Hariana, Indubrasil, Nelore (nome brasileiro, já que na Índia ele é chamado de Ongole) e Tabapuã. O termo zebu é usado para definir todas as raças desta subespécie.

Muitas espécies de animais domésticos de produção consideradas atualmente como raças brasileiras têm em comum sua origem nos primeiros animais trazidos para o país a partir da Península Ibérica durante o período colonial. O bovino Pantaneiro e o Curraleiro Pé-Duro são exemplos dessas raças, que são resultado de um processo de seleção natural, tendo como principal característica a rusticidade, adaptação e resistência a amplas variações ambientais, fundamentos da sobrevivência nos ambientes onde vivem atualmente, constituindo-se, portanto, em um precioso recurso genético.

Felix (2016) relata que, no Brasil, os primeiros rebanhos bovinos desembarcaram na capitania de São Vicente no ano de 1534. Considera-se que existiam três rotas principais de introdução: São Vicente (São Paulo), Pernambuco e Bahia. Enquanto todos os outros países sul-americanos receberam somente raças espanholas, o Brasil foi o único país do continente americano que recebeu além das raças espanholas as raças portuguesas devido à colonização lusitana. Os bovinos desembarcados em São Vicente foram irradiados para os campos sulinos, Goiás e o Vale do São Francisco (Minas e Bahia), chegando também até o Piauí e o Ceará. Os que desembarcaram em Pernambuco e na Bahia emigraram para os sertões nordestinos, norte de Minas, oeste da Bahia, onde encontraram os rebanhos originários de São Vicente. A autora conclui que a seleção natural destes rebanhos atuando em ambientes extremamente variáveis em todo o país, juntamente com os eventos recorrentes

da miscigenação destas raças, levaram ao desenvolvimento das raças adaptadas a uma ampla gama de ambientes com variabilidade fenotípica e adequação às condições locais.

3.3. A RAÇA CRIOULA LAGEANA

GOULART (1965) aponta que o gado crioulo do sul do Brasil tem como origem muito provavelmente o tronco Ibérico. Acredita-se que os jesuítas tenham introduzido, a partir de 1730, algo em torno de 80 mil animais nos campos da Serra. Porém, em 1750, o Tratado de Madrid pôs fim às disputas pelos limites das colônias sul-americanas portuguesas e espanholas, já que o Tratado de Tordesilhas há muito era desrespeitado. Por ele Portugal cedia a colônia de Sacramento à Espanha e recebia em troca o que hoje são os estados do Rio Grande do Sul, partes de Santa Catarina e Paraná, território que era ocupado pelos missionários jesuítas espanhóis (O TRATADO DE MADRI, 2019). Com essa união de Espanha e Portugal, os jesuítas foram expulsos da América do Sul. Quem não foi morto, fugiu. O gado que era criado pelos jesuítas foi abandonado e criou-se sozinho, comendo folhas, arbustos e musgos. (KUSTER, 2014).

Segundo Spritze *et al.* (2003) os Bandeirantes capturavam os bovinos que estavam sem rumo e os levavam para a região de Franca, SP, de onde surgiu a denominação de bovino Franqueiro. Supõe-se que muitos animais tenham se extraviado das tropas ao longo do caminho, sendo que na região do planalto catarinense voltaram a embrenharam-se nas matas e, com o tempo, passaram a formar rebanhos nos campos de Lages. Com a colonização do planalto catarinense, os colonos trouxeram o gado Franqueiro de volta, que, provavelmente, cruzou com bovinos ali existentes, originando o gado conhecido como Crioulo Lageano, que até o início do século passado era a raça predominante nos campos de Lages.

Em seu trabalho, Mariante e Cavalcante (2000) diz que o bovino Crioulo Lageano foi, por longo tempo, o principal esteio da bovinocultura das regiões

fisiográficas dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul e do Planalto Catarinense.

Spritze *et al.* (2003) concluíram que a partir do final do século passado, esses bovinos passaram a ser cruzados com animais de raças européias e zebuínas. Admite-se que os resultados obtidos com os cruzamentos favoreceram as importações de reprodutores de outras raças, causando o desaparecimento quase que total dos bovinos Crioulos.



Figura 3.2 Exemplo de vaca da Raça Crioulo Lageano (Autor)

Fenotipicamente os animais da raça Crioulo Lageano apresentam perfil de cabeça retilíneo ou subconcavilíneo, com as mucosas na maioria das vezes pigmentadas em tons escuros, possuem as orelhas redondas, pequenas e leves. A pele é grossa e pigmentada, coberta de pêlos que variam do branco até o preto. De corpo mediano e cilíndrico, com o tórax medianamente profundo e as costelas levemente arqueadas para trás, possuem uma boa conformação de garupa, com a inserção de cauda alta, expondo a região pélvica, característica esta que facilita na hora do parto. Devido a uma falta de seleção, a massa muscular desses animais não é muito desenvolvida (CAMARGO e MARTINS, 2005).

Em entrevistas com produtores da raça Crioula Lageana, de outras raças, proprietários de hotéis fazenda e turistas, Veiga *et al.* (2009) identificaram atributos para o desenvolvimento de produtos diferenciados focando a

territorialidade e visando agregar valor em mercados diferenciados e aumentar a renda dos proprietários. A raça é um recurso genético que deve ser conservado e dividir harmonicamente o espaço físico com os recursos naturais de beleza singular (MARTINS *et al.* 2009). Como outras raças ainda pouco exploradas pelo setor agropecuário, Crioula Lageana é uma excelente fonte de diversidade genética, já que são animais rústicos, possuem boa fertilidade, não apresentam dificuldade de parto além do excelente comportamento materno e fêmeas com boa produção leiteira (ANDRADE, 2017)

Trabalhos já realizados com a raça Crioulo Lageano vêm demonstrando interesse nesse excelente recurso genético. Rosa (2016) e Amorim (2017) pesquisaram o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) que está relacionado com a precocidade sexual. Pereira (2018) analisou o alelo A2 para a proteína beta-caseína e Andrade (2017) verificou a existência de polimorfismos no gene do hormônio da prolactina.

3.4. OS CORNOS BOVINOS

Os cornos são projeções permanentes na cabeça de vários animais, e são constituídos de queratina e outras proteínas que envolvem um núcleo de osso vivo. Se diferem dos chifres pelo fato destes não serem permanentes.

Segundo Camargo (2017), foi possível chegar-se a um entendimento de que a mutação referente à presença e/ou ausência de cornos, em bovinos, é de natureza mendeliana autossômica, caracterizada pela manifestação de um gene com dois alelos. Ainda segundo o autor, o alelo dominante condiciona o caráter mocho e o alelo recessivo condiciona a presença de cornos. O fenótipo aspado (com corno), corresponde ao genótipo formado pelo homocigoto com dois alelos recessivos, e o fenótipo mocho corresponde ao heterocigoto e ao homocigoto com dois alelos dominantes. Estes estudos evidenciaram, também, uma região no cromossomo 1 (BTA1) de bovinos que contém o loco P, a qual é responsável pelo caráter mocho. Vários autores como: Allais Bonnet *et al* (2013); Drogemuller *et al* (2005); Weidemar *et al* (2014), em suas pesquisas e testes identificaram dois haplótipos distintos na região previamente sinalizada do BTA1, tendo como

comprovar que vários animais mochos carregavam o genótipo na raça Simental. Esses testes foram aplicados, também, em várias outras raças, tais como: Angus; Galloway; Blonde D'Aquitane; Braunvieh; Hareford, Norueguesa Vermelha e Pinzqauer. Da mesma forma, os pesquisadores Medugorac et al (2012) ao estudarem 31 raças reconheceram a mesma região destacada pelos pesquisadores anteriormente mencionados.

Um outro haplótipo foi encontrado em bovinos da raça Holandês (Weidemar *et al.*,2014). O genótipo mencionado anteriormente, que foi identificado em outras raças, embora inserido na mesma região, não evidencia o caráter mocho na raça Holandês, portanto, os autores identificaram dois haplótipos independentes para marcar essa característica.

Essa descoberta é ratificada por Medugorac et al (2012), embora não tenham conseguido sustentar os resultados do estudo, pois essa pesquisa se deu com número menor de animais. Em estudo com a raça Holandês, Rothammer et al (2014) chegaram mais perto da provável mutação causal, ou seja, uma das 182 variantes detectadas por Weidemar et al (2014). Cabe ressaltar que nenhuma das duas variantes, descobertas por Weidemar e demais pesquisadores, está em regiões codificantes. Isso nos leva a crer que ainda há muito a se pesquisar, nesse sentido, com técnicas mais avançadas, já que a ligação entre o caráter mocho e as raças podem ser mutações específicas de raças, além de malformações congênitas, indicando que mutações novas e esporádicas podem afetar o fenótipo. Isso é reforçado por Medugorac et al (2012), ao destacar que o caráter mocho pode estar associado a uma heterogeneidade genética em que duas variantes distintas podem ocasionar o mesmo fenótipo, indicando, assim, que a mutação causal não foi encontrada e esses haplótipos sinalizam a mutação causal por estarem em ligação com ela, podendo variar de acordo com a população e ser desfeita por recombinação.

Os cornos são uma característica distinta nos animais da família Bovidae e possuem uma grande diversidade morfológica. São permanentes e de crescimento constante. Schafberg (2015) sustenta que como uma arma poderosa na luta contra os predadores e entre si, os indivíduos que portam cornos fortes tiveram uma vantagem evolutiva na natureza. O caráter aspado sofreu, seleção natural dada as vantagens dos portadores de cornos, sendo um

dos poucos exemplos de caracteres de ordem recessiva que sofreram seleção natural. Entretanto, ainda segundo Schafberg (2015), existem relatos de gravuras de bovinos mochos em acasalamento no Egito Antigo e também existem evidências de sua criação no Império Romano, bem como anterior a esses eventos, há fósseis de bovinos mochos que datam do período Neolítico.

Portanto, ressalta-se a importância de que as pesquisas precisam dar continuidade para identificar, com maior precisão, os mecanismos genéticos que definem essa característica.

3.5. HERANÇA DO CARÁTER MOCHO-ASPADO EM BOVINOS

Para Campos (2008), os fatores de herança que controlam a presença ou ausência de chifres nos bovinos de corte são citados frequentemente como um exemplo clássico da ação de dominância e recessividade dos genes, sendo bem conhecidos, porém mal interpretados por causa da presença do gene para batoque e do gene para chifre africano que fazem o assunto ficar mais complexo. O autor define as seguintes letras para descrever o processo de herança destes 3 genes diferentes:

- M: gene para mocho
- m: gene para aspado
- B: gene para batoque
- b: ausência de gene para batoque
- AF: presença do gene para chifre africano
- af: ausência do gene para chifre africano

A herança genética para o fator mocho-aspado é controlada por um par de genes, sendo o gene para mocho (M) dominante sobre o gene para aspado (m), podendo haver animais homozigotos MM ou mm assim como animais heterozigotos Mm. Visualmente sabe-se que um animal aspado possui os genes mm, porém um animal mocho não pode ter o par de genes presente determinado visualmente. O animal mocho tanto pode ser “MM” como “Mm”. O autor ainda explica que nos dois casos o indivíduo será mocho, mas quando acasalado, por exemplo, com vacas aspadadas, a percentagem de seus filhos que apresentará o caráter mocho vai variar de 50% para 100%.

A presença do gene para batoques (“scurs” na língua inglesa) é algo totalmente separado do processo que determina o caráter mocho. A presença deste gene provoca o crescimento de protuberâncias semelhantes as aspas, porém são, na verdade, cornos incompletos, soltos e usualmente móveis embaixo do couro do animal (CAMPOS, 2008). Os batoques podem variar de pequenas até grandes protuberâncias, que então as tornam de difícil diferenciação dos cornos. Porém, o autor aponta que pressupor que estes rudimentos córneos chamados de batoques e o caráter para mocho estejam associados está incorreto e pode conduzir a resultados inesperados e que existe uma certa confusão no que se refere à influenciados batoques na produção de progênie mocha ou aspada.

Os batoques só ocorrem em animais geneticamente mochos, caso em que o alelo B domina epistaticamente. O caráter batoque pode ser influenciado por sexo ocorrendo em machos homozigotos (BB) ou heterozigotos (Bb), mas unicamente em fêmeas homozigotas (BB) (Schafberg, 2015). A tabela 1 mostra as combinações possíveis da interação deste genótipo com o mocho/aspado. Cruzamentos de animais com genótipos homozigotos MM e BB geram descendentes machos e fêmeas com batoques. Já cruzamentos de animais com genótipos homozigotos recessivo (mm) geram animais aspados, machos ou fêmeas para todas as condições de genótipos batoque (BB, Bb, bb).

:

Tabela 1 Composição Genética e Fenotípica por Sexo para os genes M e B (CAMPOS, 2008)

<i>Composição Genética</i>			<i>Fenótipo</i>	
Genótipo			Machos	Fêmeas
MM	-	BB	Batoque	Batoque
MM	-	Bb	Mocho	Mocho
MM	-	bb	Mocho	Mocho
Mm	-	BB	Batoque	Batoque
Mm	-	Bb	Batoque	Mocho
Mm	-	bb	Mocho	Mocho
mm	-	BB	Aspado	Aspado
mm	-	Bb	Aspado	Aspado
mm	-	bb	Aspado	Aspado

Onde M: Gene dominante para mocho
B: Gene para batoque

Na Figura 3.3 é possível observar os três fenótipos diferentes em animais da raça Simmental.

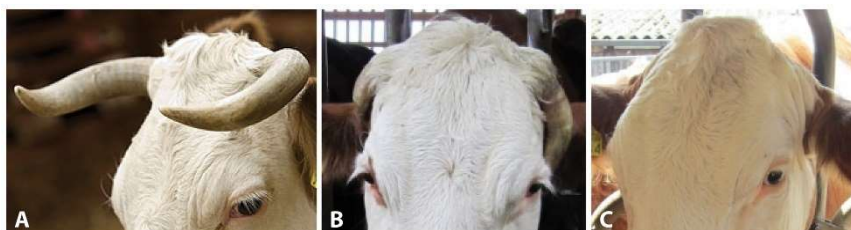


Figura 3.3 Fenótipos de Cornos em gado Simmental, (A) aspado (B) batoque (C) mocho. (WIEDEMAR, 2014)

3.6. PRÁTICAS DE MANEJO PARA DESCORNA/AMOCAMENTO

A criação de gado sem chifre está se tornando cada vez mais uma alternativa favorável nos sistemas modernos de criação, devido à maior conveniência na prática do manejo do rebanho. Para a FAO (2015), após o

processo de domesticação, a seleção, em alguns casos, foi feita para o caráter mocho devido a estas vantagens e facilidades de manejo.

As vantagens e facilidades de manejo de animais sem corno são o de evitar danos entre os animais, no caso de brigas que ocasionam ferimentos e queda no desempenho, e, também em injúrias causadas aos trabalhadores na rotina diária, evitando afastamentos por questões de saúde (SCHAFBERG, 2015). Por fim, diminuem as perdas de carcaça no pré-abate e transporte até o/no frigorífico. Como visto por Mendonça et al (2016) em lotes de animais aspados em comparação com lotes de animais mistos (mochos e aspados) ocorrem perdas na qualidade de carne/carcaça, como lacerações, que levam a perdas econômicas, principalmente se os animais forem de raças zebuínas.

O botão do corno nasce nos primeiros meses de vida do bezerro, e o tecido que prende os cornos ao crânio só é formado depois de uns 2 meses (LA FONTAINE, 2002). Ainda segundo este autor durante os estes dois meses de vida o botão dos cornos fica flutuando na camada de pele acima do crânio do bezerro, sendo, assim, recomendado fazer o amochamento antes do botão formar esta ligação com o crânio, diminuindo o dano ao animal.

Cardoso (2014) expõe que o amochamento se refere à destruição das células da derme que produzem os chifres, destruindo o botão do corno, localizado na região do cório. Já a descorna se refere à remoção dos chifres já crescidos. O método mais utilizado no amochamento de bezerros no mundo é o método de cauterização com ferro quente, existindo também o método da pasta cáustica. A descorna por outro lado já é uma intervenção cirúrgica.

Entretanto como revela Canozzi (2015), os procedimentos de manejo que provoquem dor e sofrimento, como descorna, amochamento e castração em bovinos de corte, podem ser interpretados de forma negativa pelas pessoas. Ao longo dos últimos anos, preocupações advindas da sociedade com relação ao tratamento moral e ético dos animais tornaram-se recorrentes. Cardoso (2014) então opina que a formação de rebanhos mochos eliminaria de forma natural todo o constrangimento ético que envolve a descorna.

3.7. AS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À QUERATINA

A queratina é parte de uma família de proteínas estruturais fibrosas, sendo o principal material estrutural que compõe cabelos, unhas, penas, chifres/cornos, garras, cascos e a camada externa da pele. As proteínas associadas à queratina (keratin-associated proteins – KAP ou KRTAP) são componentes fundamentais das fibras capilares e de lã e, em parte, acredita-se que sejam responsáveis por algumas das propriedades dessas fibras. Elas foram identificadas e divididas em três grupos: as KAPs de alto teor de enxofre (HS); as KAPs de ultra-alto teor de enxofre (UHS); e as KAPs de alta glicina-tirosina (HGT) (Gong *et al.*, 2014). As proteínas associadas à queratina de alta glicina-tirosina (HGT-KAP) compreendem as famílias KAP6, KAP7 e KAP8. As proteínas da família KAP6 são codificadas por uma família multigênica de pelo menos três membros. Já as o KAP7-1 e o KAP8-1 são codificados por genes únicos, KRTAP7-1 e KRTAP8-1, na maioria das espécies desempenhando um papel essencial na determinação da forma e das propriedades mecânicas da fibra, como resistência e rigidez (Daverio, 2019).

Harlizius *et al.* (1997) avaliaram um conjunto de seis marcadores moleculares localizados no cromossomo 1 bovino para verificar suas possíveis associações com o caráter mocho em animais da raça Simental e Pinzgauer. Estes autores verificaram que, dentre todo o conjunto de marcadores testados para a característica, os que tiveram maior efeito de associação foram os microssatélites INRA212 e os alelos do gene KAP8 bovino.

3.8. MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AO MELHORAMENTO ANIMAL

Marcadores genéticos são características de herança mendeliana simples, que possibilitam a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, permitindo que a segregação do gene marcador seja acompanhada. A análise da segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador (REGITANO &

COUTINHO, 2001). Para estudar polimorfismo em um gene, pode-se utilizar de técnicas de biologia molecular, tal como a PCR-RFLP.

A PCR ("Reação em Cadeia pela Polimerase" - "Polymerase Chain Reaction") é uma técnica usada para isolar e ampliar pequenas sequências específicas de nucleotídeos multiplicando-os em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima quantidade de DNA. Esta técnica baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença de uma enzima DNA polimerase e de primers específicos ou não. Estes primers delimitam a sequência de DNA de fita dupla que deve ser amplificada e que resultam em milhões de cópias idênticas (MULLIS & FALOONA, 1987).

Outra técnica de utilização subsequente à PCR é a RFLP ("Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição" - "Restriction Fragment Length Polymorphism") como descrito por Botstein *et al.* (1980). Na RFLP, quando clivadas com enzimas de restrição, as regiões do gene de interesse previamente isoladas e amplificadas via PCR, geram bandas com padrões de migração que podem ser visualizados em géis de agarose após eletroforese. Dependendo do número de sítios de corte para enzima que existam no fragmento de DNA estudado, estes padrões podem ser idênticos ou distintos entre os animais, evidenciando respectivamente o monomorfismo ou polimorfismo genético. Segundo Guimarães (2012), as vantagens da técnica RFLP estão relacionadas com o seu baixo custo e rapidez quando a mesma é aplicada em estudos populacionais, permitindo a genotipagem dos indivíduos no caso da identificação de polimorfismos.

A principal aplicação dos marcadores moleculares em melhoramento animal é caracterizada pela seleção assistida. Nela, se um determinado genótipo pode ser associado a um ou vários loci de efeito no fenótipo de uma característica de interesse, a seleção pelo genótipo pode antecipar a seleção tradicional, a qual ocorre após a expressão do fenótipo para a característica selecionada. Isto pode proporcionar maiores ganhos genéticos devido ao aumento na intensidade de seleção e diminuição do intervalo de gerações. (SHORT *et al.* 1995; REGITANO & COUTINHO, 2001; OLIVEIRA & HENKES, 2001)

Em virtude destes fatos, o presente estudo será conduzido com o objetivo de avaliar a possível existência de polimorfismos em uma região do gene KAP8 de animais da raça Crioula Lageana com a técnica PCR-RFLP, verificando assim a viabilidade de uma ferramenta molecular que possa auxiliar a compreensão dos mecanismos de herança para a característica aspado/mocho, de maneira a complementar o direcionamento de acasalamentos para esta característica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizadas amostras de 109 animais, aspados e mochos, pertencentes a três propriedades localizadas no município de Lages-SC. Foram coletados pelos da vassoura da cauda dos animais. Cada amostra continha ao menos 50 pelos e foram acondicionadas em embalagens individuais devidamente identificadas. Após as coletas, as amostras foram processadas para a retirada do excesso de pelos, cortando-se apenas a extremidade que continha o folículo piloso em, aproximadamente, 25 a 30 folículos por amostra. Os tubos contendo os folículos foram devidamente identificados e armazenados a -20°C até a etapa de extração do DNA genômico.

A extração do material genômico foi feita seguindo-se o protocolo PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) adaptado de Lima (2003). Cada amostra de pelo contendo os folículos pilosos em um micro tubo de 1,5 µL foi então adicionada de 500 µL de solução TE-TWEEN (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20). A seguir, foi feita a incubação em banho-maria a uma temperatura de 65°C por 90 minutos com agitação feita manualmente em intervalos fixos de 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se 10 µL de proteinase K (20 mg/µL) e as amostras voltaram para a incubação, desta vez a uma temperatura de 55°C por 6 horas. Nesta etapa as amostras foram agitadas por inversão a cada 30 minutos e depois deixadas descansar a 37°C overnight.

A seguir, foi então adicionado 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos foram vigorosamente agitados durante 10 segundos em agitador automático tipo vórtex. O conjunto de amostras foi centrifugado a 12.000 RPMs por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo devidamente identificado, obtendo-se assim um volume final de aproximadamente 300 µL.

O DNA foi precipitado em 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (cerca de 30 µL) e álcool etílico absoluto gelado (1000 µL) por imersão. Após um novo repouso de 90 minutos a 20 °C negativos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPMs por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante final foi descartado, e o DNA remanescente foi deixado secar a temperatura ambiente

para ser ressuspendido em 100 µL de água ultrapura e armazenado a 4°C até o uso.

Procedeu-se a verificação da eficiência da metodologia da extração de DNA das amostras. Misturou-se 4 µL de cada amostra com 4 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e então as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%) com 3 µL de brometo de etídio, 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). As imagens dos géis foram registradas com o software L-Pix Imagem Ex® para análises posteriores.

Para o isolamento e amplificação da região contendo o exon I e parte do intron I do gene KAP8 bovino, dois primers foram desenhados contendo a seguinte sequência.

KAP8 Forward 5' - ACGCCTTGTGTTTTTCGCC - 3'

KAP8 Reverse 5' - CAGCTAACTGGGAGGCTGAT - 3'

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL por amostra, contendo 100 ng de DNA, 0.5 mM de cada primer, 1 X PCR “buffer” [(10 mM Tris-HCl) (pH 9.0)], 1.5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 mM de dNTPS, 0,5 U da enzima EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, e seguiram as seguintes programações que foi programado com os ciclos conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 Programação das condições do termociclador para a Reação de PCR

Etapas	Reação de PCR (<i>Touchdown</i>)			
	1ª Etapa (10 ciclos)		2ª etapa (25 ciclos)	
	T °C	Tempo	T °C	Tempo
Desnaturação	95	5'	95	1'
Anelamento	70 (↓ 1°C/ciclo)	1'	60	1'
Extensão	72	1'	72	1'
Conservação			4	

Uma vez amplificado o material foi feito uma eletroforese para a confirmação dos resultados. Uma alíquota de 4 µL de cada amostra adicionada

a 4 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol). O meio foi gel de agarose a 1,0% com brometo de etídio num volume de 3 µL e tampão TBE 1X a 70V por aproximadamente 50 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® 25 (Loccus Biotecnologia) e as imagens registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

Após amplificação da região de interesse com a reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras foram submetidas à técnica de PCR-RFLP. A enzima de restrição escolhida foi a BsrI da BioLabs, com o seguinte sítio de restrição:



A digestão enzimática foi realizada em volume final de 20 µL por amostra, sendo 10 µL do produto da PCR, 3 µL de tampão 1X NEBuffer™ 3.1, 0,3 µL da enzima BsrI e 6,7 µL de água. A reação foi incubada no mesmo termociclador Biometra® que foi usado seguindo a seguinte programação (tabela 3):

Tabela 3 Programação das condições do termociclador para a digestão enzimática.

ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (minutos)
1ª etapa	65	20
2ª etapa	80	20
Conservação	4	

O resultado final visualizado num gel de agarose de 2,5% com 3 µL de brometo de etídio. Nele 4 µL de cada amostra foi misturado a 4 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol). A eletroforese foi realizada a 100V por 60 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) e as imagens registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex® e gravadas em computador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo usado para extrair o DNA genômico dos folículos pilosos dos bovinos mostrou-se eficaz (figura 5.1). Nela pode-se observar no padrão de migração a formação de uma primeira banda com quantidade satisfatória de DNA extraído. Nesta figura também é visto um padrão de arraste, sugerindo sinais de degradação de DNA. Outra observação que foi feita do padrão de arraste e é que no final de cada canaleta temos o padrão fortemente visível de RNA. Todavia a amostra ter DNA degradado e RNA não comprometeu em nada as análises de PCR e PCR-RFLP posteriores.

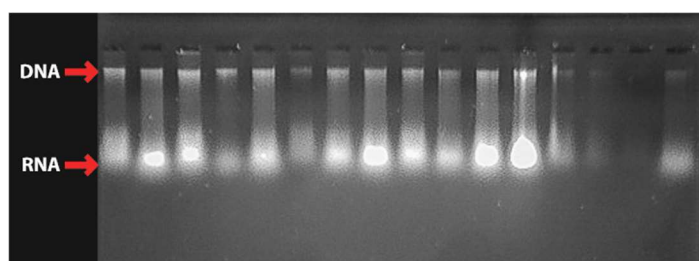


Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose 0,5% com amostras de DNA genômico extraído

Laureano *et al.* (2006), que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) para extração de DNA de pelos de novilhas da raça Nelore, obtiveram o mesmo padrão de banda de DNA genômico ao final da extração.

Para um melhor anelamento dos primers e visando a eficácia da técnica de PCR, foi realizado um teste de gradiente de temperatura entre 52 °C e 67 °C, para garantir a escolha da temperatura ideal de anelamento dos primers. A temperatura que resultou visualmente em um melhor anelamento foi 60 °C, pois não foram observadas bandas inespecíficas no gel. Após testes iniciais, optou-se por um programa de touchdown a partir dos 70 °C. O termociclador foi programado para executar 10 ciclos de anelamento desde os 70 °C, e em cada ciclo a temperatura era diminuída em 1 °C. Os fragmentos amplificados tinham em torno de 390 pares de base (pb), indicando que os primers desenhados foram efetivos em amplificar a área desejada (figura 5.2) Nela pode-se observar a presença de apenas um fragmento de DNA (banda).

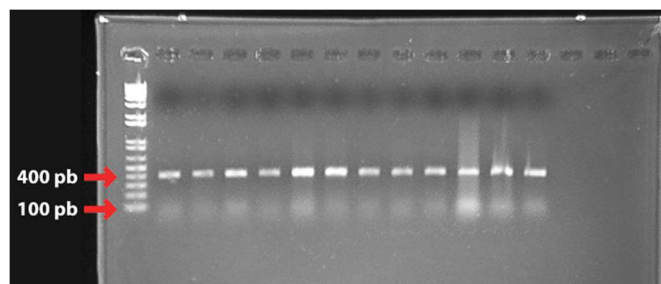


Figura 5.2 Resultados da PCR touchdown com os primers para KAP8. Eletroforese em gel de agarose a 1%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Com estes resultados obtidos foi a seguir realizada a técnica de PCR-RFLP, onde o produto da PCR foi digerido com a enzima BsrI. Os resultados podem ser observados na figura 5.3.

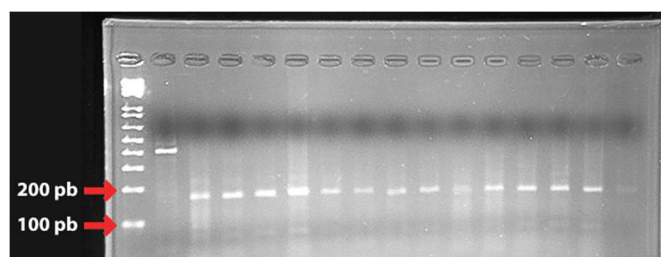


Figura 5.3 Resultados da PCR-RFLP com a endonuclease BsrI. Eletroforese em gel de agarose a 2,5%. A= marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Os produtos amplificados de PCR, após digestão enzimática, apresentaram 1 fragmento visualizável com aproximadamente 200pb. O mesmo padrão de corte foi obtido em todas as 109 amostras utilizadas, caracterizando um monomorfismo genético utilizando-se a enzima BsrI. Tal resultado pode sugerir uma forte conservação genética para a região avaliada (exon-I e parte do intron-I). Essa conservação pode ter sido obtida após diferentes pressões seletivas de ordem natural ou artificial, ao longo do processo adaptativo dos animais desta raça.

Nos estudos de Harlizius *et al.* (1997), os autores inferem que os alelos do gene KAP8 bovino possuem uma forte associação com o caráter mocho nas raças Simental e Pinzgauer. Apesar de não estar pesquisando caráter mocho/aspado, Khan *et al.* (2014) identificaram a presença dos dois alelos da KAP8 na espécie bovina.

Desta forma, outros estudos devem ser realizados. Como foram usados animais sabidamente mochos e aspados o polimorfismo existe, pode-se atestar isto visualmente. Logo o uso de outras enzimas de restrição ou a escolha de outras áreas do gene KAP8 devem ser avaliadas a fim de buscar o polimorfismo existente na população da raça Crioula Lageana, para viabilizar o uso de marcadores moleculares no processo de melhoramento genético e auxiliar os produtores com interesse nesta característica a direcionar os acasalamentos em seu rebanho.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que foi obtido êxito nas técnicas de extração de DNA genômico e a aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região do exon I e parte do intron I pertencente ao gene KAP8. Contudo, a região avaliada é monomórfica para o sítio de clivagem da enzima de restrição BsrI no gene da KAP8 em animais da raça Crioula Lageana.

7. REFERÊNCIAS

- ALLAIS-BONNET, A. *et al.* **Novel Insights into the Bovine Polled Phenotype and Horn Ontogenesis in Bovidae.** PloS one. 8. e63512. 10.1371/journal.pone.0063512, 2013.
- AMORIM, S. T. **APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NA REGIÃO DO EXON 6 DO GENE DO IGF-I EM ANIMAIS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2017.
- ANDRADE, A. L. & LIMA, A. L. F. **Análise de polimorfismo de genes relacionados a características de interesse econômico da raça crioula lageana.** 2017 Monografia (TCC) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017
- CAMARGO, G. M. F. Aspectos genéticos da presença/ausência de cornos em bovinos. 2017 **Zootecnia Ativa**, disponível em: <<https://zootecniaativa.com/colunas/1574>>. Acesso em 05 out. 2019.
- 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.
- CAMPOS, L. T. Herança do caráter mocho-aspado em bovinos **Angus@newS**, p. 46, Outubro de 2008.
- CANOZZI, M. E. A. **CASTRAÇÃO E DESCORNA/AMOCAMENTO EM BOVINOS DE CORTE: REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE.** 2015 229 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.
- CARDOSO, C. S. **SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NO SUL DO BRASIL: ATITUDES E PRÁTICAS DE AGRICULTORES FAMILIARES SOBRE AMOCAMENTO E DESCORNA DE BEZERROS** 2014 98 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. 2014
- DROGEMULLER, C., *et al.* Fine mapping of the polled locus to a 1-Mb region on bovine chromosome 1q12. **Mamm Genome** 16:613-20, 2005.
- EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P.B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: **Bovinocultura de Corte.** Ed. Pires, A.V. – Piracicaba: FEALQ, v.1, p.11-40, 2010.
- FELIX, G. A. **Identificação de raças bovinas brasileiras por meio de análise tricológica.** 2016 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.
- FIORAVANTI, M. C. S. *et al.* DESCORNA DE BOVINOS UTILIZANDO GRAMPOS DE METAL NA DERMORRAFIA, 1999, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 507-510, 1999.
- GEIST v. & WALTHER F. The behaviour of ungulates and its relation to management. **The papers of an International Symposium held at the University of Calgary**, Alberta, Canada 2-5 November 1971
- GRANDIN, T. "Bruises on Southwestern Feedlot Cattle." **Journal of Animal Science**, volume 53, Supplement 1,p. 213, 1981.

- GUIMARÃES, Simone E. F.. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Embrapa. p. 614-647, 2012.
- HARLIZIUS, B. *et al.* New markers on bovine Chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle, **Mammalian Genome** 8, 255-257, 1997.
- JORGE, W. A genômica bovina - Origem e evolução de taurinos e zebrinos. **Vet. e Zootec.** 2013 jun.; 20(2): 217-237.
- KHAN, I. *et al.* Mammalian Keratin Associated Proteins (KRTAPs) Subgenomes: Disentangling Hair Diversity and Adaptation to Terrestrial and Aquatic **Environments** .**BMC Genomics** , (779) : 1 -18.
https://nsuworks.nova.edu/occ_facarticles/346. 2014
- KUSTER, Susana (2014) Raça Crioula serrana surgiu com jesuítas , **Correio Lageano** disponível em: <<http://cl.clmais.com.br/informacao/68205/raça-crioula-serrana-surgiu-com-jesuítas>>. Acesso em 05 out. 2014.
- LA FONTAINE, D. Dehorning and castration of calves under six months of age. **Agnote**, n.J83, 2002.
- 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, 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.
- 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, V. M. V. **Raça Crioula Lageana: o esteio do ontem, o labor do hoje e a oportunidade do amanhã**. Ed. ABCCL, Lages, 2009
- MEDUGORAC, I *et al.* Bovine Polledness – An Autosomal Dominant Trait with Allelic Heterogeneity. **PLoS ONE** 7(6): e39477.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039477> 2012
- MENDONÇA et al Genetic group and horns presence in bruises and economic losses in cattle carcasses. **Semina: Ciências Agrárias**, 37, 6, 4265-4274, 2016
- MULLIS, K.B. & FALOONA, F. Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155, 335-350, disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)> , 1987.
- TRATADO DE MADRI (1750) **Centro Cultura Luso Brasileiro**, Disponível em <<http://cclbdobrasil.blogspot.com/2018/11/tratado-de-madri-1750.html>> Acesso em 05 out. 2019.
- PEREIRA, T. C. **IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS A1 E A2 PARA O GENE DA BETA-CASEÍNA NA RAÇA CRIOULA LAGEANA**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2018
- PERIPOLLI, E. **APLICAÇÃO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA DE REPRODUTORAS SUÍNAS** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso

- (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2014
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.
- REVISTA AGROPECUÁRIA** A bovinocultura e a bubalinocultura no Brasil. Disponível em <<http://www.revistaagropecuaria.com.br/2012/11/27/a-bovinocultura-e-a-bubalinocultura-no-brasil/>> Acesso em 05 out. 2019.
- ROSA, V. L. **Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da raça Crioula Lageana**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2016.
- ROTHAMMER, S. *et al.* The 80-kb DNA duplication on BTA1 is the only remaining candidate mutation for the polled phenotype of Friesian origin **Genet Sel Evol** 46, 44 doi:10.1186/1297-9686-46-44, 2014
- SCHAFBERG, R. & SWALVE H. H. The history of breeding for polled cattle. **Livestock Science** 179 54–70, 2015
- SHORT, T.H. *et al.* Marker assisted selection for litter size in pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73 ,p. 109 , suppl. 1, 1995.
- SPRITZE, A *et al.* Caracterização genética da raça bovina Crioula Lageana por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1157-1164, 2003.
- VEIGA, T. F. *et. al.* Raça Crioula Lageana: percepções em relação às possibilidades de sua exploração na região do planalto catarinense. **Revista Brasileira de Agroecologia** (Online), v. 4, n.1, p. 29-38, 2009.
- 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.
- WIEDEMAR, N. *et al.* Independent Polled Mutations Leading to Complex Gene Expression Differences in Cattle. **PLoS ONE** 9(3): e93435. doi:10.1371/journal.pone.0093435, 2014