

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

LUAN POPAZOGLO KARINO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS À
MUSCULATURA DUPLA EM BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2023**

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

LUAN POPAZOGLO KARINO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS À
MUSCULATURA DUPLA EM BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferreira Lima

**FLORIANÓPOLIS - SC
2023**

Karino, Luan Popazoglo

Identificação de genótipos associados à musculatura dupla em bovinos da raça Braford / Luan Popazoglo Karino ; orientador, André Luís Ferreira Lima, 2023.

29 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Miostatina. 3. Genotipagem. 4. Polimorfismo. 5. PCR-RFLP. I. Lima, André Luís Ferreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Zootecnia. III. Título.

Luan Popazoglo Karino

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS ASSOCIADOS À MUSCULATURA DUPLA EM BOVINOS DA RAÇA BRAFORD

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

Florianópolis, 23 de novembro de 2023.

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

Andre Luis Ferreira Lima

Data: 14/12/2023 12:43:02-0300

CPF: ***.135.588-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

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



Documento assinado digitalmente

RAFAEL PEREIRA HECKLER

Data: 14/12/2023 08:08:20-0300

CPF: ***.851.791-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Médico Veterinário Rafael Pereira Heckler,
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente

Marcio Cinachi Pereira

Data: 14/12/2023 07:56:33-0300

CPF: ***.731.298-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira,
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Silvana Popazoglo e José Keiti Karino, e meu padrasto Carlos Scaravonatti por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem independente da situação.

A minha namorada Isadora Ferreira dos Anjos pela parceria e apoio durante toda a graduação e durante todas as etapas deste trabalho.

Agradeço o meu orientador Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima pelo tema, pelo suporte e ensinamentos durante todo o processo de confecção deste trabalho.

RESUMO

A proteína Miostatina é um fator que fisiologicamente relaciona-se ao crescimento muscular e possui um papel importante na produção de carne e na reprodução bovina. A seleção e acasalamentos direcionados para a formação de algumas raças levou à expressão de alelos que inibem a ação da Miostatina, ocasionando entre outros fatores, a hipertrofia muscular que determina o fenótipo conhecido como dupla musculatura (DM) nos animais portadores. Dentre estes alelos, destacam-se os alelos C (selvagem) e A (mutado), associado ao fenótipo DM. A Associação Brasileira de Hereford e Braford (ABHB) possui avaliadores credenciados que realizam a certificação e registro do animal com base visual e genealógica. Animais que, fenotípicamente, apresentam DM fogem aos padrões raciais determinados pela associação, o que impede o seu registro para utilização como reprodutores. Este trabalho teve como objetivo identificar a possível existência de genótipos diferentes para o gene da Miostatina, possibilitando assim uma ferramenta de genotipagem ao nascimento dos animais para a identificação de indivíduos portadores dos genótipos de DM. Foram avaliados 29 animais da raça Braford pertencentes ao rebanho da Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC. Após a extração do DNA de amostras de sangue coletadas dos animais, a região correspondente ao Exon - I do gene da Miostatina foi isolada e amplificada utilizando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As genotipagens foram realizadas utilizando-se a técnica de Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) com a endonuclease *TaqI* para identificar polimorfismos na região de interesse. Foram identificados, para o grupo de animais avaliados, os padrões de migração dos genótipos CC e CA com frequências iguais a 0.931 e 0.069, respectivamente. As frequências alélicas obtidas (C = 0.9655 / A = 0,0345) foram testadas à aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (χ^2 a 5% de significância) e mostram-se em equilíbrio. Isto pode ser atribuído ao tamanho de amostra de animais testados ou à seleção fenotípica contra a DM em bovinos da raça Braford. Os resultados obtidos permitiram a padronização de uma técnica de marcação molecular que pode ser utilizada pela associação da raça para identificação precoce de animais portadores de alelos associados à DM.

Palavras-chave: Miostatina; Genotipagem; Polimorfismo; PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo do papel da Miostatina no crescimento muscular. Com a expressão da Miostatina e sem a expressão da Miostatina.....	15
Figura 2 - Animal da raça Belgian Blue com dupla musculatura	16
Figura 3 - Resultados obtidos da extração de DNA das amostras através do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Eletroforese em gel de agarose 0,5%	22
Figura 4 - Imagem do resultado do PCR gradiente de temperatura. Gel de agarose 3%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.....	22
Figura 5 - Resultados da aplicação das análises de PCR mostrando a amplificação do gene da Miostatina. Gel de agarose 2%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.....	23
Figura 6 - Imagem representativa dos resultados das análises de RFLP. Gel de Agarose 3%. Eletroforograma representativo dos padrões de migração caracterizados dos genótipos CA e CC	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências Gênicas e Genotípicas da população	24
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1. Panorama da bovinocultura brasileira	13
3.2. Raças bovinas com aptidão para corte	13
3.3. Raça Braford	14
3.4. Miostatina e a dupla musculatura em bovinos.....	14
3.5. Marcadores moleculares e seleção assistida	17
4. METODOLOGIA	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a bovinocultura é de grande importância, visto que é a segunda maior cultura de produção animal no país e possui o segundo maior rebanho do mundo com cerca de 234 milhões de cabeças, ficando atrás apenas da Índia. Em 2021, ao todo foram produzidas 9,7 milhões de toneladas de carne bovina, sendo 2,4 milhões de toneladas exportadas, gerando um faturamento de 9,2 bilhões de dólares. A região sul do país conta aproximadamente 24 milhões de cabeças, 90 mil toneladas de carne exportadas e um faturamento correspondente a 417 milhões de dólares. (IBGE, 2023)

O Brasil é um país cujas temperaturas médias e umidade relativa do ar são altas por conta da forte predominância dos climas equatorial e tropical, portanto na bovinocultura de corte é necessário que se tenha animais com facilidade de adaptação a climas como estes. Porém, a região sul possui clima temperado, ou seja, têm as quatro estações do ano bem definidas, com chuvas espaçadas ao longo de todo o ano.

As raças bovinas podem ser divididas em três grandes grupos, os zebuínos que são originários em sua grande maioria da Índia, os taurinos de origem europeia e ao cruzar animais de diferentes raças de ambos os grupos se obtém as raças sintéticas. Esses cruzamentos têm como objetivo a complementaridade e heterose, gerando um animal mais produtivo e que se adapte melhor ao meio, como a raça Braford, oriunda inicialmente do cruzamento da raça Hereford que é taurina e da Brahman que é zebuína.

No estado de Santa Catarina (SC) mais da metade do rebanho bovino é destinado à pecuária de corte e segundo a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) dos 295 municípios de Santa Catarina, a bovinocultura está presente em 291. Dentre as raças criadas no estado, a Braford vem crescendo, contando com mais de 15 criadores registrados (ABHB, 2022).

Pela combinação de 5/8 de Hereford e 3/8 de zebuíno (Brahman ou Nelore), a raça Braford tem como característica a rusticidade, boa resistência a ectoparasitas e endoparasitas e boa habilidade materna herdadas do zebuíno, alta fertilidade, precocidade e docilidade herdados do taurino. A carne Braford está conquistando

espaço no mercado. Com o Programa Carne Pampa® a agregação de valor da carcaça cresce significativamente. Para ter o diferencial de outras carcaças, o animal deve passar por uma certificação da associação da raça que contém uma série de normas para a certificação do animal. Conforme o art. 49 do Regulamento do Registro Genealógico da Raça Braford podem ser considerados alguns defeitos desclassificatórios para obtenção do registro, incluem a DM (Culard). (ABHB, 2022)

A DM pode ser descrita como hipertrofia muscular localizada no quarto traseiro do animal, onde é visível o contorno e protuberância muscular. Essa característica está associada a proteína Miostatina que tem função de regular o crescimento muscular excessivo e é codificada pelo gene recessivo GDF-8 (*Growth and differentiation factor – 8*). Indivíduos com esta característica tendem a ter ossos mais finos, menor porcentagem de gordura, maior porcentagem de cortes nobres, 20% mais carne, menor conversão alimentar (CA), baixa fertilidade, partos distócicos, baixa viabilidade dos bezerros e aumento da susceptibilidade ao estresse (Teixeira *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Identificar a possível existência de genótipos diferentes para o gene da Miostatina em animais da raça Braford pertencentes ao rebanho do laboratório de bovinocultura de corte da Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC.

2.2. Específicos

- Extrair o DNA de amostras de sangue coletadas dos animais;
- Isolar e amplificar a região correspondente ao Exon-I do gene da Miostatina bovina utilizando a técnica de PCR;
- Aplicar a técnica RFLP para identificar polimorfismos na região de interesse e caso identificados, realizar a genotipagem dos animais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Panorama da bovinocultura brasileira

O Brasil é o maior país da América do Sul, com uma extensão de 8.5 milhões de km², número que lhe consagra a 5ª maior extensão territorial do mundo. Sua economia em 2022 ficou em 9º no ranking mundial e contou com um faturamento de R\$ 9,9 trilhões, dos quais 25% são provém do agronegócio. Dentre todos os setores que o agronegócio engloba, a pecuária de corte é uma atividade que vem crescendo ao longo dos anos, agregando valor aos seus produtos e se tornando cada vez mais significativa na economia e mercados brasileiro e mundial (IBGE, 2022).

Os primeiros bovinos trazidos ao Brasil foram predominantemente animais europeus, também conhecidos como taurinos (*Bos taurus taurus*) na época das Grandes Navegações, oriundos da península Ibérica e da Ilha de Cabo Verde, e em minoria, na mesma época, o gado zebu (*Bos taurus indicus*) também foi introduzido (Barbosa *et al.*, 2015).

3.2. Raças bovinas com aptidão para corte

As raças bovinas dividem-se em três grandes grupos, que são os de origem europeia (taurinos), de origem indiana (zebuínos) e as raças sintéticas que são o resultado do cruzamento das raças dos dois grupos citados anteriormente (Franco, 2007).

No grupo dos taurinos é feita a divisão em dois subgrupos segundo suas origens, que são os continentais e os britânicos. Como exemplos de taurinos continentais têm-se as raças Charolês, Blonde D'Aquitane e Limosin que possuem como características marcantes o seu grande porte, pouquíssima gordura, muito músculo e alto índice de distocia no parto. Como alguns exemplos de taurinos britânicos têm-se as raças Aberdeem Angus, Hereford e Devon, que se diferenciam das outras raças pelo seu pequeno porte, alta fertilidade, alta deposição de gordura intramuscular e sua precocidade. No grupo dos zebuínos, não há subgrupos, e suas raças se caracterizam pela rusticidade, adaptabilidade a climas quentes, resistência a

ectoparasitas, ótima habilidade materna e baixos índices reprodutivos. O grupo das raças sintéticas resultante do cruzamento das raças dos dois grupos citados anteriormente, é o grupo que objetivou animais com qualidades superiores aos seus pais e que desempenhem melhor suas funções (complementariedade e heterose), ou seja, um animal de grande porte (carcaças mais pesadas), com alta eficiência reprodutiva (precocidade reprodutiva, número de bezerros desmamados, intervalo entre partos e sobrevivência dos bezerros até a desmama), desempenho produtivo de carne e ótimas características de carcaça (rendimento de carcaça e deposição de gordura) (Kepler Euclides Filho, 1997).

3.3. Raça Braford

Originada na Florida (EUA), na década de 60, a raça Braford é o resultado do cruzamento com até 5/8 da raça taurina Hereford e até 3/8 de raças zebuínas (Tabapuã, Nelore, Brahman), obtendo um animal com o corpo vermelho e cara branca, sendo reconhecido como padrão Mercosul. Esse animal adveio da necessidade de criar um espécime mais adaptado a climas adversos e que possuísse pigmentação ocular, em virtude da incidência solar direta e dos problemas causados por isso, como os tumores (ABHB, 2015).

Como características dos machos têm-se a ótima fertilidade, virilidade, precocidade e grande quantidade de massa muscular, herdados do taurino, adaptabilidade e resistência a ectoparasitas, herdados dos zebuínos. As fêmeas possuem ótima habilidade materna, precocidade e fertilidade. No geral, a raça apresenta boa conformidade de carcaça, bom perfil muscular, alto rendimento e boa cobertura de gordura e marmoreio (ABHB, 2015).

Apesar de a maioria possuir essas características, alguns exemplares da raça herdam congenitamente o gene da DM o que os faz serem extremamente superiores em produtividade de carne quando comparado a outros animais da sua raça. Porém, a presença deste gene não traz apenas benefícios, mas também problemas em relação a produção e reprodução (Teixeira *et al.*, 2006).

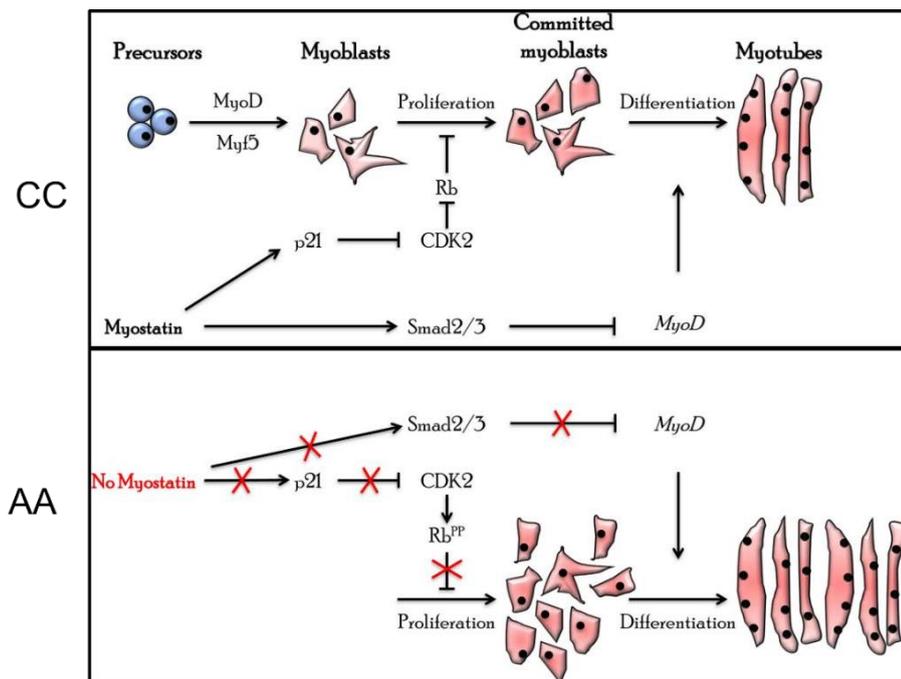
3.4. Miostatina e a dupla musculatura em bovinos

A DM é caracterizada, dentre outros fatores, pela alta deposição de massa muscular e foi observada há centenas de anos, sendo documentada pela primeira vez em 1807 por Culley e descrita por Kaiser em 1888. No início foi proposto por Wriedt, 1929, que a determinação genética para essa síndrome era monogênica e, posteriormente, vários pesquisadores concluíram que o gene envolvido, que determinava essa característica, era autossômico (Hanset *et al.*, 1985).

Em 1997, McPherron e colaboradores concluíram que a DM era causada pela proteína Miostatina, codificada pelo gene *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor 8*), pertencente à família *TGF- β* (*Transforming Growth Factor β*).

Na Figura 1, existem dois exemplos de animais, o animal “CC” e o “AA”. O Animal “CC” é aquele com musculatura normal, onde a Miostatina exerce seu papel de “freio” sobre proliferação de miotubos e conseqüentemente de fibras musculares, ou seja, inibe o crescimento excessivo da musculatura. No animal “AA” já não há a expressão da Miostatina, ou seja, não existe o papel de “freio” e conseqüentemente há um crescimento totalmente desregulado da musculatura como demonstra a figura abaixo.

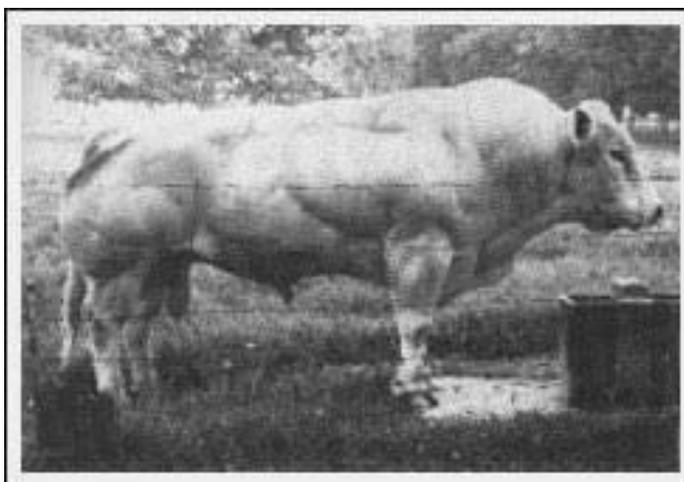
Figura 1 – Modelo do papel da Miostatina no crescimento muscular. Com a expressão da Miostatina e sem a expressão da Miostatina



Fonte: Thomas *et al.*, 2000

Desta forma, animais que possuem DM têm o efeito da Miostatina inibido, ocasionando a hipertrofia muscular característica deste fenótipo, como retrata a Figura 2. Durante os processos de seleção e acasalamentos para formação de raças, houve uma maior disseminação de alelos relacionados a essa inibição. Segundo Kambadur *et al.* (1997) nas populações das raças Belgian Blue e Piemontesa, por exemplo, estes alelos aparecem em alta frequência o que resulta em maior incidência de animais apresentando DM.

Figura 2 – Animal da raça Belgian Blue com dupla musculatura



Fonte: Google Imagens

Várias mutações pontuais atribuídas a polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) foram relatadas para raças bovinas, além das mencionadas, também: Asturiana, Blonde d'Aquitaine, Limousin, Angus, Santa Gertrudes, Braford e Charolesa, Marchigiana e Nelore (Kambadur *et al.* 1997; Grobet, *et al.* 1997, Grisolia *et al.* 1999).

Dentre os SNPs relatados na literatura para o gene da Miostatina, existe um posicionado no Exon I na posição 282. Nesse SNP ocorre a alteração de um nucleotídeo C (citosina) no alelo selvagem por um nucleotídeo A (adenina), denominado alelo mutante. Esta alteração causa a mudança na proteína na posição 94, de uma Fenilalanina (C) por uma Leucina (A), respectivamente. Sellick *et al.* (2007) e Esmailzadeh *et al.* (2008) relataram a existência de efeito aditivo em característica

de carcaça associado a DM em animais AA, ou seja, existe associação deste alelo com o fenótipo.

Goyache *et al.*, (1996) descreveram que as mudanças anatômicas atribuídas à DM são: os músculos do corpo aumentados, quantidade reduzida de gordura tanto subcutânea como intramuscular. A parte do corpo onde pode-se evidenciar a presença ou não da síndrome é o quarto traseiro do animal que, quando comparado a outros animais, é muito mais musculoso. Estas alterações podem parecer positivas para características de desempenho como, por exemplo, o rendimento de carcaça, porém a inibição da Miostatina também ocasiona mudanças fisiológicas associadas à redução significativa de fertilidade, de volume de sêmen, alta porcentagem de partos distócicos e, conseqüentemente, maiores necessidades de cesarianas. Embora haja maior deposição de músculo na carcaça, existe correlação negativa com as quantidades de gordura subcutânea e intramuscular, o que influencia negativamente nas características organolépticas da carne (maciez, cor, suculência, sabor e aroma) (Teixeira *et al.*, 2006).

3.5. Marcadores moleculares e seleção assistida

A partir do século XX, surgiu uma crescente demanda por animais que desempenham melhor suas funções e que fossem mais adaptáveis ao meio em que estariam inseridos. A partir desta demanda começou-se a desenvolver programas de melhoramento para as raças de produção e de interesse econômico, que são principalmente os bovinos, caprinos, ovinos, suínos e aves. Inicialmente foram selecionados os indivíduos que demonstrassem melhores características fenotípicas desejadas e por conseqüência disto, obteve-se animais com os alelos favoráveis à certas características de produção selecionadas. Porém, apenas pelo embasamento fenotípico, essa seleção demonstrou limitações como, por exemplo, como saber a quantidade de gordura intermuscular sem abater o animal ou, como avaliar o rendimento de carcaça. Por isso, as taxas de melhoramento foram limitadas e necessitavam de outros métodos que possibilitassem a avaliação mais detalhada das características desses animais (Coutinho *et al.*, 2010).

Considerando o conjunto de respostas fisiológicas à atuação da Miostatina, deve-se considerar a utilização de técnicas de genotipagem no gene desta proteína. Dentre estas técnicas, a PCR-RFLP se destaca pelo seu baixo custo operacional e boa eficiência na detecção dos polimorfismos. Considerando que estes polimorfismos estão associados à DM nos animais, a seleção pelos genótipos obtidos na marcação molecular pode ser feita ao nascimento, o que pode promover o ganho genético por vários aspectos:

- Aumentando a acurácia;
- Reduzindo o intervalo de gerações;
- Melhorando a eficiência das avaliações genéticas;
- Permitindo melhor aproveitamento da complementaridade entre os indivíduos.

4. METODOLOGIA

A utilização de animais para a realização desta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº: 6432220223). Para extração do DNA genômico dos animais, foram utilizadas amostras do sangue de 29 bovinos da raça Braford mantidos pelo Laboratório de Bovino de Corte da Fazenda Experimental da Ressacada (CCA/UFSC). As amostras foram coletadas por venopunção coccígea utilizando-se agulhas descartáveis e tubos do tipo vacutainer com EDTA potássico, em um volume de 4 mL/tubo/animal. Para o procedimento, os animais foram contidos em tronco de manejo, com a cauda erguida para melhor localização da veia e de maneira minimamente invasiva, buscando-se evitar qualquer tipo de estresse. Após a coleta, os tubos devidamente identificados foram acondicionados em freezer a -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

As etapas laboratoriais 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. Para o procedimento de extração do DNA da fase leucocitária, 1,5 mL de sangue/amostra foram transferidos para tubos de 2 mL e centrifugados por 15 minutos, logo em seguida, descartou-se o sobrenadante com cuidado para que as células brancas não sejam removidas da interface. Posteriormente, o volume dos tubos foi ajustado para 5 mL com uma solução A (250 µL Tris HCl pH 7.6 1 M; 250 µL MgCl₂ 0.5M; 50 µL NaCl 5 M). Em seguida foram adicionados 1 mL do tampão da solução A e homogeneizado no agitador automático tipo vórtex até a obtenção de uma coloração escura e homogênea. Após esta etapa foi novamente centrifugado por 10 minutos e dispensou-se o sobrenadante por inversão e foi deixado o líquido escorrer lentamente. O sedimento foi ressuscitado em 2 mL do tampão de hemólise e misturado por inversão e em seguida foi centrifugado por mais 10 minutos e descartou-se novamente o sobrenadante. Essa lavagem foi realizada quatro vezes, e em seguida, as células brancas foram ressuscitadas em 500 µL do tampão de hemólise e colocadas em microtubos de 1,5 mL.

Em seguida, foram adicionados 500 μ L de solução de Proteinase K (5 μ L de Tris HCl pH 8.0 1 M; 10 μ L de NaCl 5 M; 10 μ L de EDTA pH 8.0 0.5 M; 12.5 μ L de SDS a 20% e completar o volume com 460,5 μ L de água ultrapura e adicionar 2 μ L de solução de proteinase K na concentração 20 mg/mL no momento do uso) ao sedimento de leucócitos armazenados na etapa anterior e misturados no vórtex até que se desprenda do fundo do tubo. Em seguida foi incubado a 55°C em banho-maria até que se dissolva o precipitado (4 a 6 horas). Após a incubação adicionou-se 210 μ L de TE pH 7.6 e 240 μ L de NaCl 5 M e agitou-se por inversão e incubou no gelo por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para dois tubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e os tubos foram agitados por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi realizada a lavagem com 500 μ L de etanol a 70% gelado e centrifugado por 5 minutos e realizou-se a secagem em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 100 μ L de solução TE e 0,25 mL de solução de RNase (10 mg/ μ L) e incubado por 12 horas a 4°C. Após as extrações, uma alíquota de 5 μ L de cada amostra foi diluída com 5 μ L de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização do DNA genômico foi feita em luz ultravioleta (UV), e o gel foi foto documentado.

Para a realização das reações de PCR, as sequências FWD e REV dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para isolar o Exon I do gene da Miostatina foram desenhadas a partir de informações disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em cada amostra, as reações continham 100 ng de DNA, 0,5 μ M de cada iniciador, 1X PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl], 100 μ M de dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase num volume final de 25 μ L.

A otimização da PCR foi realizada em uma etapa prévia com gradiente de temperaturas de anelamento ajustada para apenas uma amostra repetida 12 vezes, uma para cada temperatura de anelamento testada, seguindo a programação: 1º ciclo 94 °C por 3 minutos, 2º ciclo escala gradiente de temperaturas (conforme Figura 3) por 1 minuto, 3º ciclo 72 °C por 1 minuto, repetidos 33 vezes. Após a amplificação,

uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização dos produtos de PCR foi feita em luz ultravioleta (UV), e o gel foi foto documentado para avaliar a eficiência da reação em função do tamanho do fragmento amplificado. Com os resultados da reação de gradiente de temperaturas, foi escolhida a temperatura de anelamento de 54°C, sendo esta então utilizada em uma nova reação subsequente, com as mesmas condições mencionadas anteriormente, mas agora para todas as amostras.

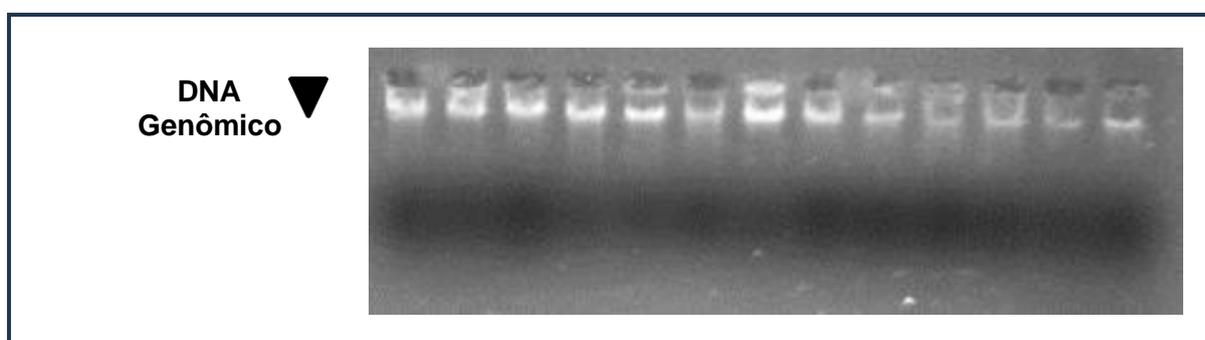
Na etapa seguinte, foi realizada a técnica de marcação molecular (genotipagem) com PCR-RFLP. Para tanto, foi utilizada a endonuclease Taq I (New England Biolabs) que possui o sítio de restrição 5' - T↓CGA - 3'. Os produtos obtidos nas reações de PCR foram digeridos em banho-maria, com tempo e temperatura descrito no protocolo fornecido pelo fabricante das enzimas, utilizando-se 10 µL da reação de amplificação, 1/10 de tampão para a enzima de restrição e 5 unidades da enzima de restrição, em um volume final de 20 µL. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3,0%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foi fotodocumentado.

As frequências gênicas e genotípicas obtidas foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados. As frequências genotípicas esperadas em equilíbrio, foram estimadas a partir da expansão binomial, conforme descrito por FALCONER & MCKAY, (1996). Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o software estatístico GENEPOP versão 3.1 (Raymond e Rousset, 1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração do DNA genômico adaptado de Zadworny & Kuhlein (1990), referente ao sangue coletado dos bovinos demonstrou-se eficiente, como mostra a Figura 2. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,5%, corados com tampão de corrida azul e expostos à luz UV. A partir da exposição foi possível visualizar a migração de DNA.

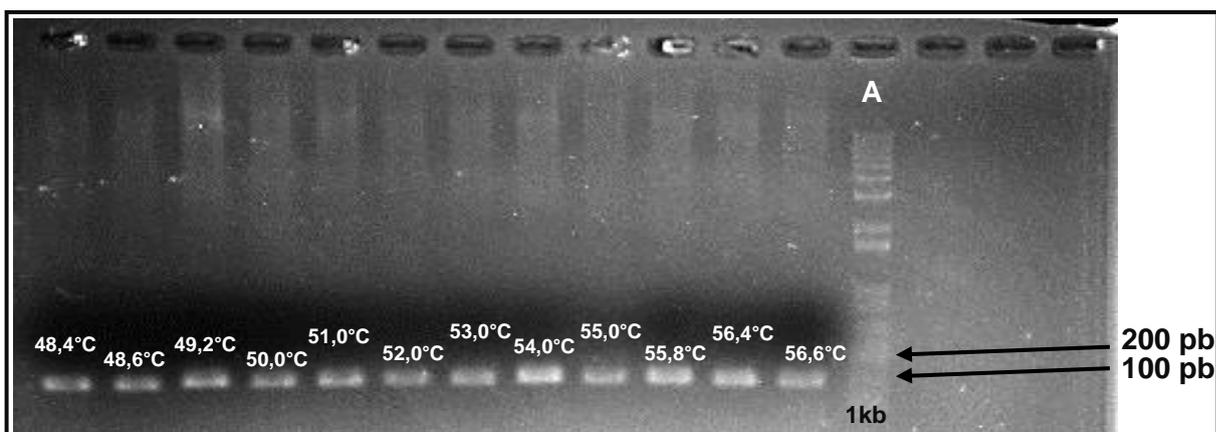
Figura 3 - Resultados obtidos da extração de DNA das amostras através do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Eletroforese em gel de agarose 0,5%.



Fonte: Autor

A Figura 3 mostra o resultado da reação preliminar com gradiente de temperaturas de anelamento. Todas as temperaturas testadas mostraram êxito na reação de PCR, porém, a banda que apresentou maior intensidade foi a repetição número 9, com a temperatura de anelamento de 54°C.

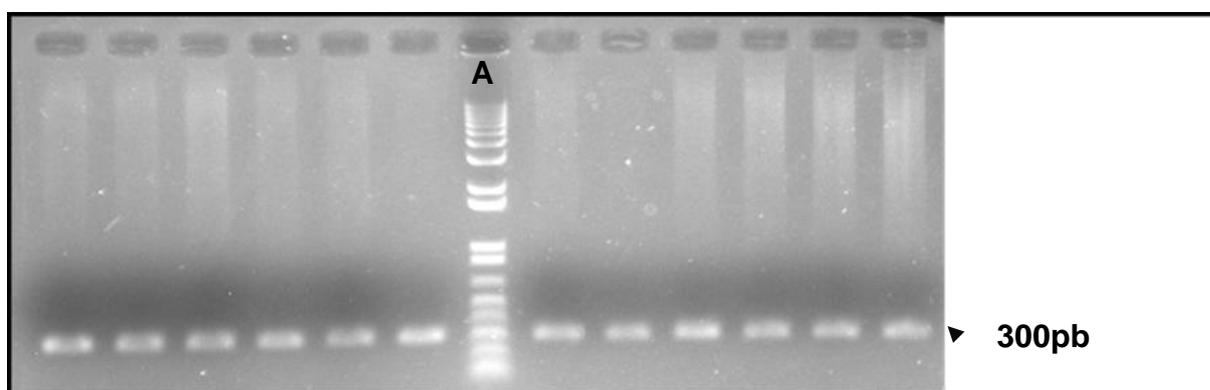
Figura 4 - Imagem do resultado do PCR gradiente de temperatura. Gel de agarose 3%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.



Fonte: Autor

Os resultados obtidos para a etapa de PCR da região correspondente ao Exon I do gene da Miostatina, nas amostras dos 29 animais, estão apresentados na Figura 4. Nela, é possível observar que os iniciadores utilizados neste trabalho foram eficientes no isolamento e amplificação da região estudada, onde todas as amostras apresentaram o fragmento de aproximadamente 300 pb.

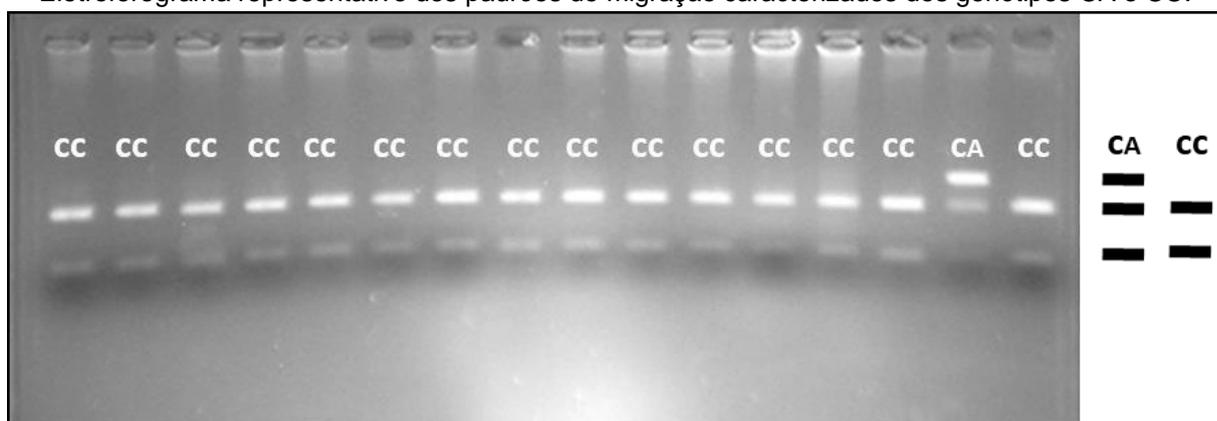
Figura 5 - Resultados da aplicação das análises de PCR mostrando a amplificação do gene da Miostatina. Gel de agarose 2%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.



Fonte: Autor

Na Figura 5 estão descritos os resultados obtidos nas reações de RFLP utilizando-se a enzima *TaqI*. Foram observados 2 padrões de migração distintos: um com dois fragmentos de aproximadamente 118pb e 92pb, respectivamente, correspondente ao genótipo CC e outro com três fragmentos de 210pb, 118pb e 92pb, respectivamente, que corresponde ao genótipo heterozigoto AC. Neste trabalho, não foram observados animais com o padrão de migração AA.

Figura 6 - Imagem representativa dos resultados das análises de RFLP. Gel de Agarose 3%. Eletroforograma representativo dos padrões de migração caracterizados dos genótipos CA e CC.



Fonte: Autor

Foi possível identificar dois tipos diferentes de migração de bandas, conforme mostra a Figura 5, o qual é um indicativo de homozigotos (CC) e heterozigotos (CA), sendo uma banda com 300pb, outra com 230pb e outra com 90pb caracterizando assim, a existência de polimorfismo genético para a região do gene da proteína Miostatina.

As frequências gênicas e genotípicas obtidas entre os 29 animais testados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequências Gênicas e Genotípicas da população

Frequências %	Genótipos			Alelos ^{ns}	
	CC	CA	AA	C	A
	0.931	0.069	0.000	0.9655	0.0345

ns= Não significativo para o teste de χ^2 ao nível de 5% de significância.

Avaliando a mesma região de interesse e com a mesma marcação molecular em 160 animais da raça Limousin, Esmailzadeh *et al.* (2008) encontraram frequências genotípicas iguais a 0.33 (AA), 0.57 (AC) e 0.10(CC). As frequências alélicas para esta raça foram 0.61 (A) e 0.39 (C), respectivamente. Estes mesmos autores, trabalhando com 203 animais da raça Jersey encontraram frequências genotípicas

iguais a 0.00 (AA), 0.51 (AC) e 0.49 (CC), respectivamente. As frequências alélicas para esta raça foram iguais a 0.75 (C) e 0.25 (A).

Os resultados obtidos neste estudo também corroboram Konovalova *et al.* (2008), que avaliaram 238 animais da raça Aberdeen Angus e encontraram as respectivas frequências genotípicas e alélicas iguais a 0.931 (CC), 0.690 (CA), 0.000 (AA), 0.93 (C) e 0.07 (A).

As análises estatísticas referentes ao teste de χ^2 para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg das frequências alélicas obtidas neste estudo indicaram que a população testada se encontra em equilíbrio para a região estudada. Este resultado pode ser atribuído ao tamanho reduzido de amostra ou a elevada conservação genética da região testada em animais da raça Braford. Estudos futuros envolvendo um maior número de animais devem ser realizados para auxiliar na compreensão efetiva deste resultado.

O presente resultado evidencia que existem animais heterozigotos para o gene da proteína Miostatina presentes nesse rebanho, o que possibilita um melhor direcionamento dos acasalamentos dos animais e/ou a definição de suas respectivas utilizações como reprodutores. Ao consultar a base de dados do rebanho, identificou-se que os animais portadores do genótipo AC identificados neste estudo são duas matrizes.

É recomendado para este rebanho que seja feito a genotipagem dos touros utilizados na inseminação artificial e a criação de uma lista que contenha todos os animais do rebanho e seus respectivos genótipos para que se possa selecionar os acasalamentos sempre evitando a ocorrência do genótipo AA.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que foi possível identificar a existência de genótipos diferentes para a região estudada (Exon I) do gene da Miostatina nos animais da raça Braford pertencentes à Fazenda Experimental da Ressacada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12ª JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA GADO DE CORTE, 12., 2016, Brasília, Df. Jornada Científica da Embrapa Gado de Corte. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2016. 114 p.

13ª JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA GADO DE CORTE, 13., 2017, Brasília, Df. Jornada Científica da Embrapa Gado de Corte. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2017. 114 p.

9ª JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA GADO DE CORTE, 12., 2016, Brasília, Df. Jornada Científica da Embrapa Gado de Corte. Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2016. 114 p.

Arthur, P.F. 1995. **Double muscling in cattle: a review**. Austr. J. Agric. Res. 46: 1493

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD (ABHB). **REGULAMENTO DO REGISTRO GENEALÓGICO DA RAÇA BRAFORD**. Bagé: ABHB, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD. **Programa Carne Pampa**. Bagé: Abhb, 2014. 17 p.

BARBOSA, Fabiano Alvim *et al.* **Cenários para a pecuária de corte amazônica**. Belo Horizonte: Igc / Ufmg, 2015.

BARBOSA, Fabiano Alvim *et al.* **Cenários para a pecuária de corte amazônica**. Belo Horizonte: Igc / Ufmg, 2015.

BERED, Fernanda; BARBOSA NETO, José Fernandes; CARVALHO, Fernando Irajá Félix de. **Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas**. Ciência Rural, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 513-520, ago. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781997000300026>.

CEPEA/ESALQ-USP. **PIB do agronegócio brasileiro**. 2022. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 20 out. 2022.

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

ESMAILIZADEH, A.K.; BOTTEMA, C.D.K.; SELICK, G.S.; VERBYLA, A.P.; MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; PITCHFORD, W.S. **Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits**¹. J. Anim. Sci. 2008, 86, 1038–1046.

FALEIRO, Fábio Gelape. **MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES**: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa, 2007. 99 p.

FRANCO, Gumerindo Loriano. **Raças de Bovinos**. 2007. Disponível em: <https://www.bibliotecaagpatea.org.br/zootecnia/bovinocultura/livros/RACAS%20DE%20BOVINOS%20DE%20CORTE.pdf>. Acesso em: 23 out. 2022.

GOYACHE, F., A. Villa, S. Dunner, J.P.Gutierrez, L. Alonso, M. Vallejo, I. Canon, 1996. **Importancia de la hipertrofia muscular hereditária en la raza Asturiana de los Valles**. 45-61

GROBET, L.; MARTIN, L.J.R.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; *et al.* **A deletion in the Bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle**. Nat. Genet. 1997, 17, 71–74.

GRISOLIA, A.; ANGELO, G.D.; NETO, L.P.; SIQUEIRA, F.; GARCÍA, J. **Myostatin (GDF8) single nucleotide polymorphisms in Nellore cattle**. Genet. Mol. Res. 2009, 8, 822–830.

HANSET, R.; MICHAUX, C. **On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed**. I. Experimental data. Génét. Sèl. Evol., v. 17, n. 3, p. 359-368, 1985.

IBGE. **Produto Interno Bruto - PIB**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/pib.php>. Acesso em: 20 out. 2022.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. 2023. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 DEZ. 2023.

KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.; BASS, J.J. **Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscling Belgian Blue and Piedmontese Cattle**. Genome Res. 1997, 7, 910–915.

KEPLER EUCLIDES FILHO. **O MELHORAMENTO GENÉTICO E OS CRUZAMENTOS EM BOVINO DE CORTE**. 1997. Disponível em: <https://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc63/index.html>. Acesso em: 23 out. 2022.

KONOVALOVA, E.; ROMANENKOVA, O.; ZIMINA, A.; VOLKOVA, V.; SERMYAGIN, A. **Genetic Variations and Haplotypic Diversity in the Myostatin Gene of Different Cattle Breeds in Russia**. Animals 2021,11, 2810.

LORENZONI, Rodrigo Monte. **OS MARCADORES MOLECULARES: TIPOS E APLICAÇÕES**. 2019. Disponível em: <https://www.laborgene.com.br/marcadores-moleculares/>. Acesso em: 31 out. 2022.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member.** Nature, v. 387, p. 83–90, 1997.

MUSCULATURA DUPLA. I – CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E DA CARÇA DE BOVINOS. Belo Horizonte: Alpa, 2006.

PAULUSSI, Karoline Silva. **VIABILIDADE DO NASCIMENTO DE BEZERROS DA RAÇA NELORE COM MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA OBTIDOS POR CONGENIA.** 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Unesp, Araçatuba - Sp, 2018.

SELLICK, G.S.; PITCHFORD, W.S.; MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; CRAWFORD, A.M.; RAADSMA, H.W.; BOTTEMA, C.D.K. **Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle.** Anim. Genet. 2007, 38, 440–446.

SUMÁRIO SENEPOL. Brasília, Df: Embrapa, 2015.

TEIXEIRA, C.S.; OLIVEIRA, D.A.A.. Freqüência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 805-809, 31 maio 2007.

TEIXEIRA, C. Salviano *et al.* **Musculatura dupla. I – Características de desempenho e da carça de bovinos.** 2006. 7 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.