

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Avaliação e aplicação de métodos de genotipagem
para estudo da síndrome da musculatura dupla em
bovinos da raça Senepol

Acadêmica: Arianna da Silva Costa Urquiza

Aquidauana-MS
Agosto/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Avaliação e aplicação de métodos de genotipagem
para estudo da síndrome da musculatura dupla em
bovinos da raça Senepol

Acadêmica: Arianna da Silva Costa Urquiza
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz
Co-orientadora: Dra. Fabiane Siqueira

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”.

Aquidauana-MS
Agosto/2017

C876a Costa-Urquiza, Arianna da Silva

Avaliação e aplicação de métodos de genotipagem para estudo da síndrome da musculatura dupla em bovinos da raça Senepol / Arianna da Silva Costa Urquiza. – Aquidauana, MS: UEMS, 2017.

67p. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Unidade Universitária de Aquidauana, 2017.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz.

1. Gene GDF-8 2. Mutação 3. Sequenciamento I. Título.

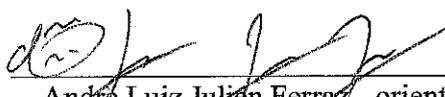
CDD 23.ed. 636.21

*Os pontos de interrogações serão preenchidos pela Bibliotecária.

ARIANNA DA SILVA COSTA URQUIZA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

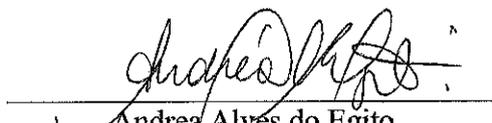
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/08/2017.



André Luiz Julián Ferraz - orientador



Fabiane Siqueira



Andrea Alves do Egito



Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

“É exatamente disso que a vida é feita: de **momentos**! Momentos os quais temos que passar, sendo **bons** ou **não**, para o nosso próprio aprendizado, por algum **motivo**. Nunca esquecendo o mais importante: nada na vida **É POR ACASO.**”

Chico Xavier

*Aos meus amados Pais **Ariel Ribeiro da Costa** e **Ana Maria da Silva Costa**
por não medirem esforços para me dar tudo o que precisei e pelos
exemplos de dignidade, sabedoria e humildade.*

*Ao meu amado esposo **Marcus Vinícius Santiago Urquiza** minha eterna
gratidão pelo amor e carinho dispensado em todos os momentos e por
compreender a minha ausência durante esses anos.*

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado, que foram essenciais para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Ariel e Ana Maria, meu infinito agradecimento. Por sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo, isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu amado esposo, Marcus Vinícius, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz “Splinter”, pela orientação, dedicação, confiança, incentivo, compreensão, advertências ao longo do processo, o que facilitou muito a execução deste trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Fabiane Siqueira, pela oportunidade, apoio, orientação, confiança, dedicação e paciência.

À minha irmã Ana Carolina que foi minha parceira durante esses anos me aturando e ouvindo minhas reclamações.

Aos meus amigos de pós-graduação e de convivência em Aquidauana que fizeram parte do mestrado e da vida (Fúlvia, Michelly, Mayara e Lucas).

Ao meu amigo Dr. Wilson W. Koller pelas caronas, lanches e conversas amigas.

Aos meus amigos do laboratório GEMA (Fran, Paula, Ana, Thiago, Maitê, Sallene e Brayan) pelos momentos divididos juntos, especialmente à Catherine, Thalles e Isabella que se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas conversas fiadas rsrsrs... Foi bom poder contar com vocês!

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela bolsa de mestrado e pelo financiamento desta pesquisa.

À Embrapa Gado de Corte pela infraestrutura laboratorial e por ter contribuído para o meu crescimento profissional.

Ao técnico do Programa de Melhoramento Genético Geneplus/Embrapa, Lucas Nascimento Silva, pela coleta das amostras de pelo dos animais portadores de musculatura dupla.

Ao Núcleo de Melhoramento da Raça Senepol e ao Dr. Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes, responsável técnico pelas Provas de Avaliação de Desempenho a pasto do Senepol, por terem gentilmente cedido as amostras biológicas e os dados fenotípicos dos animais participantes das PADS.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e aos que participaram de todos os momentos bons e difíceis, minha gratidão e meu muito obrigado.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
<i>ABSTRACT</i>	XII
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. ORIGEM DA RAÇA SENEPOL.....	15
2.2. SÍNDROME DA MUSCULATURA DUPLA OU HIPERTROFIA MUSCULAR.....	17
2.3. GENOTIPAGEM.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO 2. ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE GENOTIPAGEM PARA AVALIAÇÃO DA HIPERTROFIA MUSCULAR EM BOVINOS DE CORTE.....	27
RESUMO.....	27
<i>ABSTRACT</i>	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
CONCLUSÕES.....	41
AGRADECIMENTOS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3. ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO NT821 COM CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE ECONÔMICO EM BOVINOS DA RAÇA SENEPOL.....	50
RESUMO.....	50
<i>ABSTRACT</i>	51
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
CONCLUSÕES.....	60
AGRADECIMENTOS.....	61
REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. TOURO SENEPOL. FONTE: ABCB SENEPOL, 2016..... 16

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. ELETROFEROGRAMAS OBSERVADOS NA GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO NT821 NO EXON III DO GENE *GDF-8* POR MEIO DA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DIRETO. EXEMPLO DE UM ANIMAL SENEPOL HOMOZIGOTO (DEL/DEL) COM A DELEÇÃO DE 11 PARES DE BASES (PB). A SETA INDICA O PONTO EXATO DA AUSÊNCIA DOS 11 PB..... 45

FIGURA 2. ELETROFEROGRAMAS OBSERVADOS NA GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO NT821 NO EXON III DO GENE *GDF-8* POR MEIO DA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DIRETO. EXEMPLO DE UM ANIMAL SENEPOL HOMOZIGOTO (+/+) SEM A DELEÇÃO DE 11 PARES DE BASES (PB). A SETA INDICA O PONTO EXATO DA PRESENÇA DOS 11 PB..... 45

FIGURA 3. ELETROFEROGRAMAS OBSERVADOS NA GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO NT821 NO EXON III DO GENE *GDF-8* POR MEIO DA METODOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DIRETO. EXEMPLO DE UM ANIMAL SENEPOL HETEROZIGOTO (+/DEL). O PONTO ONDE COMEÇAM A SURTIR PICOS DUPLOS NA SEQUÊNCIA INDICAM A PRESENÇA DE UM ALELO NORMAL E OUTRO CONTENDO A MUTAÇÃO..... 46

FIGURA 4. GEL DE AGAROSE 4% COM PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DE UM SEGMENTO DE 142 PARES DE BASES (PB) DO GENE *GDF-8*. 100PB = PADRÃO MOLECULAR DE TAMANHO DE 100 PB. DEL/DEL = ANIMAIS HOMOZIGOTOS PARA A DELEÇÃO NT821. +/DEL = ANIMAIS HETEROZIGOTOS. +/+ = ANIMAIS HOMOZIGOTOS SEM A DELEÇÃO NT821. BRC= CONTROLE NEGATIVO. 50PB = PADRÃO MOLECULAR DE TAMANHO DE 50 PB..... 46

FIGURA 5. ELETROFEROGRAMA OBSERVADO DA GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO NT821 NO EXON III DO GENE *GDF-8* POR MEIO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE FRAGMENTOS EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO DE DNA. EXEMPLO DE UM ANIMAL SENEPOL QUE NÃO APRESENTA A DELEÇÃO DE 11 PARES DE BASES..... 47

FIGURA 6. ELETROFEROGRAMA OBSERVADO DA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO NT821 NO EXON III DO GENE *GDF-8* POR MEIO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE FRAGMENTOS EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO DE DNA. EXEMPLO DE UM ANIMAL SENEPOL QUE APRESENTA A DELEÇÃO DE 11 PARES DE BASES..... 47

FIGURA 7. ELETROFEROGRAMA DA GENOTIPAGEM DE UM ANIMAL SENEPOL HETEROZIGOTO, CONTENDO OS PICOS TANTO NO ALELO DA MUTAÇÃO QUANTO NO ALELO NORMAL..... 47

FIGURA 8. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO TRÊS ANIMAIS GENOTIPADOS POR MEIO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE FRAGMENTOS EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO DE DNA. EM AZUL FLUORESCÊNCIA FAM (ANIMAL HOMOZIGOTO DEL/DEL), EM VERDE FLUORESCÊNCIA HEX (ANIMAL HOMOZIGOTO +/+) E EM AMARELO FLUORESCÊNCIA NED (ANIMAL HETEROZIGOTO +/DEL), QUE NO PROGRAMA *GENE MARKER* É REPRESENTADO EM PRETO..... 48

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. ELETROFEROGRAMA MOSTRANDO TRÊS ANIMAIS GENOTIPADOS POR MEIO DA METODOLOGIA DE DETECÇÃO DE FRAGMENTOS EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO DE DNA. EM AZUL FLUORESCÊNCIA FAM (ANIMAL HOMOZIGOTO DEL/DEL), EM VERDE FLUORESCÊNCIA HEX (ANIMAL HOMOZIGOTO +/+) E EM AMARELO FLUORESCÊNCIA NED (ANIMAL HETEROZIGOTO +/DEL), QUE NO PROGRAMA *GENE MARKER* É REPRESENTADO EM PRETO..... 65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1. CUSTOS DA GENOTIPAGEM DA MUTAÇÃO NT821, PELAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE A 4%, SEQUENCIAMENTO DIRETO DO EXON III DO GENE <i>GDF-8</i> E DETECÇÃO DE FRAGMENTOS EM SEQUENCIADOR AUTOMÁTICO DE DNA.....	49
--	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1. VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS AVALIADAS COM RELAÇÃO À MUTAÇÃO NT821 EM ANIMAIS SENEPOL.....	65
--	----

Resumo

Em várias raças de bovinos de corte é observada a síndrome da musculatura dupla, caracterizada pela presença do fenótipo de hipertrofia muscular, sendo esta uma condição hereditária e controlada pelo gene *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor-8*). Em bovinos da raça Senepol, a mutação nt821, localizada no exon III deste gene, é responsável por esta síndrome. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar três metodologias de genotipagem desta mutação, com o intuito de verificar qual a mais adequada em relação a custo/benefício e verificar a associação do alelo mutado com características de interesse econômico em touros jovens da raça Senepol. Foram extraídos DNA genômico de amostras biológicas de 17 bezerros, sendo sete com o fenótipo da musculatura dupla e dez sem o fenótipo. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria e suas integridades avaliadas em gel de agarose 0,8%. Posteriormente, foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do exon III. Foram testadas as metodologias: 1) sequenciamento direto do exon III do gene *GDF-8*; 2) detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose a 4% e 3) detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA. Na primeira metodologia testada, foi possível detectar com precisão os genótipos de todos os indivíduos, entretanto, esta metodologia foi a mais onerosa. A técnica de detecção de fragmentos em gel de agarose a 4% resultou em 100% de concordância com os genótipos obtidos destes mesmos animais por sequenciamento. Porém, em toda corrida eletroforética é necessário acrescentar amostras de DNA controle de animais previamente genotipados, para garantir uma melhor visualização dos genótipos esperados, reduzindo, assim, artefatos técnicos. Esta metodologia foi a que apresentou o menor custo. Com o desenvolvimento de um sistema *poolplexing*, a detecção de fragmentos em sequenciador automático apesar de ser uma metodologia mais onerosa e laboriosa do que a técnica de detecção de fragmentos em gel de agarose apresenta a grande vantagem de poder ser realizada junto com os testes de paternidade de bovinos que são realizados rotineiramente pelos produtores, apresentando, assim, a melhor relação custo/benefício. Por meio do sistema *poolplexing*, foram genotipados 346 touros jovens Senepol, dos quais 70 animais (20,23%) apresentaram o genótipo heterozigoto (+/del) e 276 apresentaram o genótipo

homozigoto (+/+), sem a presença da deleção nt821. Os touros Senepol heterozigotos apresentaram maior área de olho de lombo (AOL) e menor perímetro escrotal (PE), ambas as características ajustadas para 550 dias. Para os outros fenótipos avaliados não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Alguns desses efeitos causados pela mutação nt821 podem ser considerados vantajosos do ponto de vista do produtor, como AOL enquanto que outros são desvantajosos, como foi para PE. Neste sentido, cabe ao produtor à decisão de manter ou não este alelo na população.

Palavras-chaves: Gene *GDF-8*, Mutação, Seleção, Sequenciamento.

Abstract

In several breeds of beef cattle, double musculature syndrome is observed, characterized by the presence of muscle hypertrophy phenotype, which is a hereditary condition controlled by the GDF-8 (Growth Differentiation Factor-8) gene. In Senepol cattle, the mutation nt821, located in exon III of this gene, is responsible for this syndrome. In this context, the objectives of this work were to evaluate three genotyping methodologies of this mutation, in order to verify the most appropriate cost/benefit relationship and verify the association of the mutated allele with economic traits in young Senepol bulls. Genomic DNA was extracted from biological samples of 17 calves, seven with the phenotype of the double musculature and ten without the phenotype. The DNA samples were quantified by spectrophotometry and their integrity evaluated in 0.8% agarose gel. Subsequently, they were submitted to the polymerase chain reaction (PCR) for exon III amplification. The methodologies were tested: 1) direct sequencing of exon III of the GDF-8 gene; 2) detection of DNA fragments in 4% agarose gel and 3) detection of fragments in automatic DNA sequencing. In the first methodology tested, it was possible to accurately detect the genotypes of all individuals, however, this methodology was the most onerous. The detection technique of 4% agarose gel fragments resulted in 100% agreement with the genotypes obtained from these same animals by sequencing. However, in every electrophoretic run it is necessary to add control DNA samples from previously genotyped animals to ensure a better visualization of the expected

genotypes, thus reducing technical artifacts. This methodology was the one that presented the lowest cost. With the development of a poolplexing system, the detection of fragments in an automatic sequencing despite being a more costly and laborious methodology than the technique of detecting fragments in agarose gel has the great advantage of being able to be carried out together with the paternity tests of cattle that are routinely carried out by producers, thus presenting the best cost/benefit ratio. A total of 346 Senepol bulls were genotyped, of which 70 animals (20.23%) had the heterozygous genotype (+/del) and 276 had the genotype homozygous (+/+), without the presence of the nt821 deletion. Heterozygous Senepol bulls presented greater loin eye area (AOL) and lower scrotal circumference (PE), both traits adjusted for 550 days. For the other phenotypes evaluated, no significant statistical differences were observed ($p < 0.05$). Some of these effects caused by the nt821 mutation can be considered advantageous from the producer's point of view, such as AOL while others are disadvantageous, as it was for PE. In this sense, it is up to the producer to decide whether or not to maintain this allele in the population.

Keywords: Gene GDF-8, Mutation, Selection, Sequencing.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Há centenas de anos vem sendo observada, em várias partes do mundo, à presença do fenótipo da hipertrofia muscular em muitas raças de bovinos de corte (BASS, 1999; TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007), sendo as maiores frequências deste fenótipo descritas nas raças Belgian Blue e Piemontês (ARTHUR, 1995). Esta característica é causada pela perda da função do gene *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor-8*), que codifica a proteína miostatina, responsável por regular de forma negativa o desenvolvimento da massa muscular esquelética (MCPHERRON & LEE, 1997; TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007; LEAL et al., 2008; PATRUNO et al., 2008).

Há relatos na literatura de que seis mutações nas regiões codificantes do gene *GDF-8* causam *stop códons* que alteram a estrutura e a função da proteína miostatina, destas nt821 e C313Y afetam fortemente o fenótipo dos bovinos (MARCHITELLI et al., 2003). Animais que exibem esta característica em grau extremo apresentam desenvolvimento excessivo de todos os músculos do corpo. Em bovinos, principalmente, na região do quarto traseiro os músculos se tornam protuberantes com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele (MÉNISSIER, 1982; BASS, 1999). Em outras espécies, tais como camundongos, ovinos, suínos e aves, também se observam o aumento da massa muscular atribuído a mutações neste gene (TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007).

Quando comparados com bovinos considerados normais, animais com musculatura dupla apresentam algumas desvantagens, como redução de fertilidade das fêmeas; genitália externa infantilizada; baixa viabilidade dos bezerros; aumento da sensibilidade ao estresse; susceptibilidade a doenças respiratórias e, principalmente, a necessidade de cesariana para contornar a alta incidência de distocia (MÉNISSIER, 1982; ARTHUR et al., 1988; CHARLIER et al., 1995).

Apesar destas limitações, o gado com musculatura dupla possui maior rendimento de carcaça, melhor conversão alimentar, ossos mais finos, maior proporção de cortes “nobres” e menor quantidade de gordura, tanto subcutânea como intramuscular, conferindo, em média, cerca de 20% a mais de músculos em cada animal (MÉNISSIER, 1982; KAMBADUR et al., 1997). Diante deste cenário,

alguns produtores têm relevado os custos com tais problemas, levando à seleção sistemática de animais com musculatura dupla ou o seu uso em programas de cruzamentos (KARIM et al., 2000).

Na raça Senepol, até 2014 não havia relatos na literatura sobre a ocorrência desta síndrome. Sendo assim, Xavier (2014) desenvolveu na Embrapa Gado de Corte, um trabalho de prospecção de polimorfismos no gene *GDF-8* em animais desta raça. Neste trabalho, o sequenciamento deste gene em dois animais com hipertrofia muscular revelou 11 mutações, sendo dez polimorfismos de troca de base única (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) e a deleção de 11 pares de bases no éxon III, denominada de nt821. Como a mutação nt821 inativa a proteína miostatina, apresentando efeito maior quando comparada com outros polimorfismos descritos na literatura e sendo uma das mutações que causam a síndrome de hipertrofia muscular em diversas raças bovinas, pode-se afirmar que esta mutação também é responsável por este fenótipo em bovinos Senepol.

Diante do exposto, o desenvolvimento de um teste de DNA para avaliar a mutação nt821 possibilitará a identificação precoce de animais Senepol portadores dos alelos que conferem hipertrofia muscular. Com base nessas informações, os produtores poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações.

O método mais frequente para genotipar este polimorfismo é o sequenciamento direto do gene, entretanto esta metodologia é relativamente cara e demorada (CAETANO, 2009; YANG et al., 2013). Assim, objetivou-se avaliar três metodologias de genotipagem, com o intuito de verificar a mais adequada em relação a custo/benefício para determinar a frequência do alelo portador da mutação nt821 e verificar sua associação com características produtivas em touros jovens da raça Senepol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem da raça Senepol

Em meados do século XIX, Henry C. Nelthrop importou do Oeste do Continente Africano para Saint Croix, condado e distrito das Ilhas Virgens

americanas, os primeiros bovinos da raça N' Dama que se destacavam pela boa adaptação às condições tropicais e a resistência a parasitas. Entretanto, apesar dessas qualidades esses animais apresentavam baixo desempenho produtivo (MENEZES, 2013).

Com o intuito de mochar o seu rebanho, para facilitar o manejo e evitar prejuízos, em 1918 Bromley Neltrop (filho de Henry) viajou a Trinidad com o objetivo de adquirir um touro que fosse de uma raça taurina pura, a fim de cruzar este com as vacas N' Dama de seu rebanho. Sendo assim, ele adquiriu um touro Red Poll (taurino britânico) que passou a cobrir todas as fêmeas N' Dama da sua propriedade, introduzindo, assim, a genética deste touro no seu rebanho (DE PAULA, 2014).

Em 1949, a nova linhagem de gado de Bromley já havia se espalhado por toda a ilha. O cruzamento de vacas N' Dama com touro Red Poll forneceu produtos que, posteriormente, foram chamados de Senepol (Figura 1), taurino resistente à doenças, vermelho, dócil, mocho e com excelente qualidade de carne (MENEZES, 2013; DE PAULA, 2014).



Figura 1. Touro Senepol. Fonte: ABCB Senepol, 2016. <http://senepol.org.br/>

Em 1954 a marca Senepol foi registrada em Porto Rico e Estados Unidos, como raça desenvolvida e criada em Saint Croix (HUPP, 1978). Atualmente, rebanhos Senepol são encontrados nos principais países de clima tropical do

mundo. No Brasil, esses animais ingressaram no ano 2000, sendo hoje o país detentor do maior plantel (MENEZES, 2013).

2.2. Síndrome da musculatura dupla ou hipertrofia muscular

A primeira descrição do fenótipo da musculatura dupla foi realizada por Culley em 1807 na Inglaterra (CHARLIER et al., 1995; BASS, 1999). Este autor observou em alguns animais da raça Shorthorn um desenvolvimento muscular acima do normal e, além disso, esses indivíduos possuíam carcaças com menor cobertura de gordura.

Anos mais tarde, Charlier et al. (1995) mapearam o cromossomo 2 bovino, confirmando a proposta de Wriedt (1929) de que a determinação genética da musculatura dupla é simples e autossômica. Esta síndrome é controlada pelo gene *GDF-8*, descrito na literatura como parcialmente recessivo, pois quando apenas um alelo está presente há algum efeito na expressão dessa característica (CHARLIER et al., 1995; MCPHERRON & LEE, 1997; BASS et al., 1999).

Em estudos envolvendo análises moleculares McPherron e Lee (1997), fizeram testes em ratos e demonstraram que, com o bloqueio da atividade do gene *GDF-8*, ocorre um aumento significativo na massa muscular dos animais, tendo a quantidade de gordura reduzida. Estes mesmos autores também compararam as sequências gênicas da miostatina em dez espécies diferentes, confirmando que a hipertrofia muscular é causada pela perda da função da proteína miostatina.

Desde a descoberta de McPherron e Lee (1997), alterações no gene da miostatina têm sido descritas por diversos pesquisadores, determinando a síndrome da musculatura dupla (MD) ou hipertrofia muscular em diversas raças bovinas (DUNNER et al., 1997; GROBET et al., 1997; KARIM et al., 2000; TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007).

A miostatina é uma proteína pertencente à superfamília *TGF- β* (Fator de crescimento transformante - β) e sua principal função é regular de forma negativa o desenvolvimento da massa muscular esquelética (LEAL et al., 2008; PATRUNO et al., 2008). Esta proteína também controla a formação de novas fibras musculares e inibe a hipertrofia das fibras existentes por meio da diminuição da expressão dos MRFs (Fatores de Regulação Miogênica) (LEE et al., 2009).

Estudos sobre a expressão gênica da miostatina têm mostrado que esta proteína atua no início do período gestacional e é mantida até a idade adulta em certos músculos (BASS et al., 1999). No início do desenvolvimento embrionário, quando o crescimento muscular ocorre, predominantemente, por hiperplasia, ou seja, pelo aumento do número de fibras musculares, os níveis de expressão da miostatina são baixos. Estes níveis aumentam significativamente nos estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia se torna menos intensa (BASS et al., 1999). Durante o período de crescimento pós-natal do animal, o crescimento muscular ocorre somente por hipertrofia, ou seja, pelo aumento do tamanho das fibras, principalmente, pelo acréscimo de proteína e de núcleos originados da proliferação e fusão das células satélites à célula muscular (JOHNSTON, 1999).

Em bovinos, o aumento muscular é observado principalmente, na região do quarto traseiro, onde os músculos são protuberantes com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele (BELLINGE et al., 2005).

Quando comparados com bovinos considerados normais, o gado com hipertrofia muscular apresenta algumas desvantagens, como massa óssea e órgãos internos reduzidos (DUMONT, 1982), circulação sanguínea reduzida, sendo observado que quando expostos a exercícios físicos, esses animais apresentam fadiga mais rapidamente, por conta da redução do metabolismo aeróbio (HOLMES et al., 1973; MÉNISSIER, 1982) e susceptibilidade a doenças respiratórias (HANSET, 1991).

Problemas reprodutivos também estão relacionados a este fenótipo, como: redução de fertilidade das fêmeas, baixa viabilidade dos bezerros, aumento da sensibilidade ao estresse, e principalmente, a necessidade de cesariana para contornar a alta incidência de distocia (VISSAC et al., 1973; MÉNISSIER, 1982; ARTHUR et al., 1988; ARTHUR, 1995; CHARLIER et al., 1995; BELLINGE et al., 2005).

Michaux e Hanset (1981) relataram casos de infantilismo genital e atrasos na puberdade (tanto em fêmeas quanto em machos) e, nos machos, também foi relatada a redução dos testículos. Nos bezerros recém-nascidos foram observadas anormalidades como língua hipertrofiada (macroglossia), fazendo com que haja dificuldade ou até impossibilidade do bezerro de se alimentar e raquitismo (HANSET, 1982).

Apesar destas limitações o gado com musculatura dupla possui maior rendimento de carcaça, melhor conversão alimentar, maior proporção de cortes “nobres” de carne, menos teor de gordura e, em média, cerca de 20% a mais de músculos em cada animal (MÉNISSIER, 1982; KAMBADUR et al., 1997).

Originária da Itália, a raça Piemontesa apresentou ao longo dos anos aumento de cerca de 80% da frequência do gene da síndrome da musculatura dupla, o que sugere a ocorrência de seleção a favor dos alelos que condicionam essa característica (RAIMONDI, 1965).

Na França, os touros com musculatura dupla têm sido utilizados há muito tempo em centros de inseminação artificial (MÉNISSIER, 1982). E na raça Belgian Blue, onde esta característica é mais predominante, os touros utilizados para a inseminação artificial foram progressivamente substituídos por touros com musculatura dupla (HANSET, 1982), indicando que houve seleção de animais que apresentavam este fenótipo.

Teixeira e Oliveira (2007) em estudos realizados no Brasil com a raça Marchigiana identificaram nos animais amostrados em seu trabalho 55,2% de indivíduos heterozigotos, 6,9% de homozigotos recessivos e 37,9% de homozigoto normal (sem a mutação). Em vista desses resultados, os autores sugeriram que os criadores desta raça estavam praticando seleção a favor dos animais portadores da mutação no referido gene.

Atualmente, são conhecidas três mutações sinônimas (F94L, S105C e D182N) (GADANHO, 2014) e seis mutações que afetam o código sequencial do gene *GDF-8* (nt821, C313Y, nt419, Q204X, E226X e E291X). Dentre estas nt821 e C313Y são as que afetam fortemente o fenótipo dos bovinos (MARCHITELLI et al., 2003). Essas mutações são frequentemente encontradas em raças como Belgian Blue, Charolês, Piemontês, Blond d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturiana de los Valles, Rubia Galega, Gasconne, Marchigiana, Maine Anjou e South Devon (DUNNER et al., 1997; MCPHERRON & LEE, 1997; SMITH et al., 1997; GROBET et al., 1998; KARIM et al., 2000; LEE & MCPHERRON, 2001; TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007).

A mutação nt821 é observada nas raças Belgian Blue e Austuriana de Los Valles e ocorre devido a uma deleção de 11 pares de bases (pb) no exon III, com início no nucleotídeo 821 e término no nucleotídeo 831. Esta mutação ocorre numa zona altamente conservada nos membros da família TGF- β , zona bioativa do

terminal carboxílico (C-terminal), provocando uma alteração na estrutura da miostatina e aparecimento de *stop códon* prematuro (GROBET et al., 1997; MCPHERRON & LEE, 1997).

2.3. Genotipagem

O desenvolvimento de novas metodologias e avanços em estudos de biologia molecular tem permitido a análise do genoma bovino por meio do uso rotineiro de técnicas como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), genotipagem e sequenciamento de DNA (COUTINHO et al., 2010). A utilização de metodologias para a identificação de mutações que interferem na expressão de características de relevância econômica surgiu como um complemento às metodologias tradicionalmente empregadas no melhoramento genético animal (REGITANO & COUTINHO, 2001; COUTINHO et al., 2010).

Os primeiros métodos desenvolvidos para genotipagem de uma região específica do genoma tiveram início com técnicas básicas de biologia molecular como, por exemplo, identificação de marcadores do tipo RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição). Esta técnica consistia em cortar o DNA genômico com enzimas de restrição e analisar o grande número de fragmentos gerados. Para isso, eram utilizados radioisótopos, sendo necessário, em média, cinco dias de trabalho para obtenção dos resultados esperados (MAEDA et al., 1989; CAETANO, 2009).

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, Sanger (1977) desenvolveu uma técnica para determinar a sequência dos nucleotídeos em fitas de DNA. Com este método, sequências com até 96% de similaridade, como a de humanos e chimpanzés, puderam ser diferenciadas. Esta ferramenta consiste na incorporação de didesoxinucleotídeos (ddNTP), que não possuem o grupo hidroxila (OH)_{3'} necessário para ligar o próximo desoxinucleotídeo (dNTP), interrompendo, assim, a extensão da fita de DNA. Com o advento da computação e da bioinformática esta técnica foi automatizada sendo os ddNTPs marcados com fluoróforos, sendo possível identificá-los em sequenciador automático capilar (REGITANO et al., 2001).

Quando poucos locos são considerados e o objetivo é a avaliação de uma região específica do genoma, a genotipagem por meio de sequenciadores automáticos de DNA tem sido a técnica mais utilizada para diferenciação de alelos. Este método consiste em uma eletroforese capilar de produtos de PCR marcados com corantes fluorescentes. No entanto, os custos envolvidos nesta análise e o tempo dispendido são relativamente altos quando se pretende genotipar um grande número de animais (CAETANO, 2009).

Desta forma, existe a necessidade de avaliação e de desenvolvimento de novas metodologias para genotipagem de um ou de poucos locos simultaneamente, com o intuito de se encontrar formas mais eficientes de genotipagem, que sejam menos laboriosas e onerosas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar três metodologias de genotipagem da mutação nt821, com o intuito de verificar qual a mais adequada em relação a custo/benefício e verificar a associação do alelo mutado com características de interesse econômico em touros jovens da raça Senepol, provenientes de Provas de Avaliação de Desempenho a pasto (PADS).

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Testar e comparar três metodologias de genotipagem para identificação da mutação nt821 localizada no exon III do gene *GDF-8*;

3.2.2 Avaliar qual a melhor metodologia para identificação desta mutação levando-se em conta a relação custo/benefício;

3.2.3 Estimar as frequências alélicas e genotípicas e avaliar a associação da mutação nt821 com características de interesse econômico em touros jovens da raça Senepol.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB SENEPOL - Associação Brasileira de Criadores de Bovinos Senepol [2016]. **Histórico da Raça**. Disponível em <<http://senepol.org.br/sobre-a-raca/historia-da-raca/>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

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

ARTHUR, P. F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M. A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 2, p. 163, 1988.

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

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

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 64-71, 2009 (suplemento especial).

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

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

DE PAULA, D. F. **Senepol feito para o Brasil, ABCB Senepol**, Ed. 1, Campo Grande, MS, p. 161, 2014.

DUMONT, B. L. Carcass composition and muscle structure in hypertrophied animals. In: **Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production**. Springer Netlands, p. 111-133, 1982.

DUNNER, S.; CHARLIER, C.; FANIR, F.; BROUWERS, B.; CANON, J.; GEORGES, M. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double muscling in the Asturiana de 22 los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 430-435, 1997.

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

GROBET, L.; MARTIN, L. J. R.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71-74, 1997.

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

HANSET, R. The major gene of muscular hypertrophy in the Belgian Blue cattle breed. **Proceedings of the Breeding for disease resistance in farm animals**, n. 23, p. 467-478, 1991.

HANSET, R. Muscular Hypertrophy as a Racial Characteristic: The Case of the Belgian Blue Breed. In: **MUSCLE HYPERTROPHY OF GENETIC ORIGIN AND ITS USE TO IMPROVE BEEF PRODUCTION**, p. 437-449, 1982.

HOLMES, J. H. G.; ASHMORE, C. R.; ROBINSON, D. W. Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy. **Journal of Animal Science**, v. 36, n. 4, p. 684-694, 1973.

HUPP, H. D. History and development of Senepol cattle. College of the Virgin Islands. **Agricultural Experiment Station Report**, p. 12, 1978.

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

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

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

LEAL, M. L.; SANTOS, A. R.; AOKI, M. S. Adaptações moleculares ao treinamento de força: Recentes descobertas sobre o papel da miostatina. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, p. 161-167, 2008.

LEE, C. Y.; HU, S. Y.; GONG, H. Y.; CHEN, M. H. C.; LU, J. K.; WU, J. L. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 387, p.766-771, 2009.

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

MAEDA, M.; URYU, N.; MURAYAMA, N.; ISHII, H.; OTA, M.; TISUJI, K.; INOKO, H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens**, v. 34, n. 5, p. 290-298, 1989.

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

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 94, p. 12457-12461, 1997.

MENEZES, G. R. O.; Silva, L. O. C; NOBRE, P. R. C; TORRES Jr, R. A. A. In: **SUMÁRIO DE TOUROS SENEPOL – GENEPLUS | EMBRAPA**. A raça Senepol. Campo Grande, MS: RICA Soluções em agronegócio, p. 8-10, 2013.

MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. **Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**, v. 16, p. 23-53, 1982.

MICHAUX, C.; HANSET, R. Sexual Development of Double-muscled and Conventional bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 98, n. 1-4, p. 29-37, 1981.

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

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

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia Molecular aplicada à produção animal*. Brasília: **Embrapa Informação tecnológica**, p. 2015, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

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

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

VISSAC, B.; PERREAU, B. Étude du caractère culard. VII.–Croissance et musculature des femelles, déséquilibre morphologique au vêlage. In: **Annales de génétique et de sélection animale**. BioMed Central, 1973. p. 23.

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

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

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity, **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1-6, 2013.

1 **CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO DE ACORDO COM AS**
2 **NORMAS DA REVISTA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB).**

3
4
5 **Análise comparativa de métodos de genotipagem para avaliação da hipertrofia**
6 **muscular em bovinos de corte**

7
8 Autores: Arianna da Silva Costa Urquiza⁽¹⁾, Fabiane Siqueira⁽²⁾ e André Luiz Julien Ferraz⁽¹⁾

9
10 ⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do
11 Sul, Unidade Universitária de Aquidauana. Rodovia Aquidauana-UEMS Km 12, Caixa
12 Postal 25 - CEP 79200-000, Aquidauana/MS, Brasil. ariannaurquiza@yahoo.com.br,
13 splinter@uems.br.

14 ⁽²⁾ Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte. Av. Rádio Maia, 830 - Vila Popular, CEP
15 79106-550, Campo Grande/MS, Brasil. fabiane.siqueira@embrapa.br.

16
17 **Resumo**

18 Objetivou-se comparar três metodologias de genotipagem da mutação nt821, responsável
19 pela hipertrofia muscular em algumas raças bovinas, visando identificar qual a mais
20 adequada em relação a custo/benefício. Foram extraídas amostras de DNA de sete bezerros
21 com hipertrofia muscular e 10 sem o fenótipo. As amostras de DNA foram quantificadas por
22 espectrofotometria, suas integridades avaliadas em gel de agarose e submetidas à reação em
23 cadeia da polimerase para amplificação do exon III do gene *GDF-8*. Foram testadas as
24 metodologias de sequenciamento direto do exon III; detecção de fragmentos em gel de
25 agarose a 4% e detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA. Com a
26 primeira metodologia foi possível detectar com precisão os genótipos dos 17 indivíduos,

27 entretanto, foi a mais onerosa. A segunda metodologia testada apresentou o menor custo e
28 resultou em 100% de concordância com os genótipos obtidos destes mesmos animais por
29 sequenciamento. Porém, em toda corrida eletroforética é necessário acrescentar amostras de
30 DNA controle de animais previamente genotipados, para garantir uma melhor visualização
31 dos genótipos esperados, reduzindo, assim, artefatos técnicos. A terceira metodologia
32 apresentou maior sensibilidade e a melhor relação custo/benefício, sendo, portanto, a mais
33 adequada para identificação de animais portadores da mutação nt821 em bovinos de corte.

34

35 Termos para indexação: *Bos taurus*, miostatina, musculatura dupla, seleção

36

37 ***Comparative analysis of genotyping methods for evaluation of muscle hypertrophy in beef***

38 ***cattle***

39

40 ***Abstract***

41 *The objective of this study was to compare three genotyping methodologies of the nt821*
42 *mutation, responsible for muscular hypertrophy in some bovine breeds, in order to identify*
43 *which one is most appropriate in terms of cost/benefit. DNA samples were extracted from*
44 *seven calves with muscular hypertrophy and 10 without the phenotype. DNA samples were*
45 *quantified by spectrophotometry, their integrity assessed on agarose gel and submitted to*
46 *the polymerase chain reaction for amplification of exon III of the GDF-8 gene. The*
47 *methodologies were tested: direct sequencing of exon III; detection of fragments on 4%*
48 *agarose gel and detection of fragments in an automatic DNA sequencer. With the first*
49 *methodology it was possible to accurately detect the genotypes of the 17 individuals,*
50 *however, it was the most costly. The second methodology tested showed the lowest cost and*
51 *resulted in 100% agreement with the genotypes obtained from these same animals by*

52 *sequencing. However, in every electrophoretic run it is necessary to add control DNA*
53 *samples from previously genotyped animals to ensure a better visualization of the expected*
54 *genotypes, thus reducing technical artifacts. The third methodology presented higher*
55 *sensitivity and better cost/benefit ratio, being therefore the most suitable for identification of*
56 *animals bearing the nt821 mutation in beef cattle.*

57

58 *Index terms: Bos taurus, double musculature, myostatin, selection*

59

60

Introdução

61 A síndrome da musculatura dupla ou hipertrofia muscular é causada por mutações
62 que ocorrem no gene *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor-8*) e acarretam na inativação da
63 proteína miostatina, um regulador negativo da miogênese. Há relatos na literatura de que
64 seis mutações nas regiões codificantes deste gene causam *stop códons* que alteram a
65 estrutura e a função da miostatina, destas nt821 e C313Y afetam fortemente o fenótipo dos
66 bovinos (MARCHITELLI et al., 2003).

67 Animais que exibem esta característica em grau extremo apresentam
68 desenvolvimento excessivo de todos os músculos do corpo. Quando comparados com
69 bovinos considerados normais, esses animais apresentam algumas desvantagens, como
70 redução de fertilidade das fêmeas; genitália externa infantilizada; baixa viabilidade dos
71 bezerros; aumento da sensibilidade ao estresse; susceptibilidade a doenças respiratórias e,
72 principalmente, alta incidência de distocia (MÉNISSIER, 1982; ARTHUR et al., 1988;
73 CHARLIER et al.,1995).

74 Apesar destas limitações, o gado com musculatura dupla possui maior rendimento
75 de carcaça, melhor conversão alimentar, ossos mais finos, maior proporção de cortes

76 “nobres” e menor quantidade de gordura, tanto subcutânea como intramuscular, conferindo,
77 em média, cerca de 20% a mais de músculos em cada animal (KAMBADUR et al., 1997).

78 Animais portadores de alelos mutantes podem ser identificados por meio de
79 técnicas de biologia molecular, podendo tornar mais eficiente para os produtores o processo
80 de eliminação ou de manutenção dos indivíduos que possuem estes alelos nos rebanhos.
81 Atualmente, marcadores de DNA podem ser divididos em três categorias principais: os
82 baseados em hibridização, os baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase*
83 *Chain Reaction* – PCR) e os baseados em sequenciamento (TURCHETTO-ZOLET et al.,
84 2017). A escolha da utilização de uma destas metodologias depende basicamente do tipo de
85 avaliação que se pretende fazer, levando-se em consideração as necessidades e as
86 possibilidades de cada centro de pesquisa ou laboratório.

87 Quando o objetivo é a avaliação de uma região específica do genoma, a
88 genotipagem por meio de sequenciadores automáticos de DNA tem sido a técnica mais
89 utilizada para diferenciação de alelos. No entanto, os custos envolvidos nesta análise e o
90 tempo dispendido são relativamente altos quando se pretende genotipar um grande número
91 de animais (CAETANO, 2009).

92 Neste contexto, objetivou-se comparar três metodologias de genotipagem da
93 mutação nt821, responsável pela hipertrofia muscular em algumas raças bovinas, visando
94 identificar qual a mais adequada em relação a custo/benefício.

95

96

Material e Métodos

97 1. Coleta de amostras biológicas

98 Foram coletadas amostras de pelo de sete animais que apresentavam o fenótipo da
99 musculatura dupla e amostras de sangue de dez animais que não apresentavam o fenótipo
100 (grupo controle). Os animais foram provenientes de rebanhos participantes do Programa

101 Embrapa de Melhoramento Genético de Gado de Corte – Geneplus e foram avaliados
102 fenotipicamente pelo técnico do Geneplus que considerou a presença das seguintes
103 características: 1) volume e convexidade muscular proeminente, principalmente nos quartos
104 traseiros, paleta e pescoço; 2) língua externalizada, ou seja, a língua apresentava hipertrofia
105 e não cabia dentro da boca do animal; e 3) ausência de gordura de cobertura muscular,
106 evidenciando os frisos da musculatura bem desenvolvida.

107

108 **2. Extração e quantificação de amostras de DNA**

109 As amostras de pelo foram coletadas das caudas dos animais e acondicionadas em
110 envelopes à temperatura ambiente. A extração de DNA das amostras de pelo foi realizada
111 utilizando o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA extraction* (Invitrogen), conforme o
112 protocolo descrito pelo fabricante.

113 As amostras de sangue foram coletadas por via endovenosa em tubos para coleta de
114 sangue a vácuo (*Vacutainer*) de 4,5 mL contendo K3 EDTA a 15%. Em seguida, foram
115 homogeneizadas cuidadosamente e enviadas ao Laboratório de Genômica e Melhoramento
116 Animal da Embrapa Gado de Corte para processamento e obtenção de leucócitos. Os
117 leucócitos foram armazenados em tubos de 1,5 mL e congelados a - 20 °C até o momento da
118 extração do DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o método descrito por Regitano
119 e Coutinho (2001).

120 Todas as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho
121 NanoDrop (Thermo Scientific) e suas integridades foram avaliadas em gel de agarose 0,8%,
122 por meio de comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas (50, 100 e 200
123 ng/μL), corado com *SyberGold* (1:10.000), visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

124

125 **3. Amplificação do exon III do gene *GDF-8* por PCR e verificação por eletroforese**

126 A amplificação do exon III do gene *GDF-8* foi realizada utilizando os *primers*
127 descritos por Xavier (2014), que amplificam um fragmento de 550 pares de bases (pb). As
128 reações de amplificação (PCR) foram padronizadas com um volume final de 25 µL contendo
129 40 ng de DNA genômico; 0,164 µM de cada um dos *primers* (*Forward* (F) e *Reverse* (R));
130 Tampão de PCR 10 X (10 mM Tris-HCl; pH 8,0 e 50 mM de KCl); 3,0 mM de MgCl₂; 0,2
131 mM de cada dNTP; 1,0 unidade (UI) de Taq DNA polimerase e completado com água ultra
132 pura. O protocolo da PCR foi de 95 °C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30
133 segundos; temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos,
134 com extensão final de 72 °C por 7 minutos (XAVIER, 2014).

135 O produto amplificado foi separado por eletroforese horizontal em gel de agarose
136 1% em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Foram utilizados cerca de 3 µL da solução de
137 produto de PCR acrescidos de 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl, 0,1 mM, pH 6,8; azul
138 de bromofenol 0,02 g; glicerol 50%). Após a corrida eletroforética, o géis foram corados em
139 solução contendo *SyberGold* (1:10.000) para observação dos fragmentos amplificados.

140 O tamanho do fragmento amplificado foi determinado pela comparação com um
141 marcador de peso molecular de 100 pb e a imagem de cada gel foi fotografada por um
142 sistema digital de foto-documentação *Gel-Doc*, com transiluminador ultravioleta.

143

144 **4. Avaliação de metodologias de genotipagem**

145 Foram analisadas três metodologias para genotipagem do exon III do gene *GDF-8*:
146 1) sequenciamento direto do exon III; 2) detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose
147 a 4% e, 3) detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA. Posteriormente,
148 essas metodologias foram avaliadas com relação ao custo/benefício levando-se em
149 consideração os seguintes critérios: custo de genotipagem por amostra, tempo de
150 genotipagem e a sensibilidade da técnica.

151 **4.1. Sequenciamento direto do exon III do gene *GDF-8***

152 A purificação da reação de amplificação do exon III foi realizada com 10 µL do
153 produto de PCR (item 3), acrescidos de 0,05 unidade (UI) de Exonuclease I (EXO), de 0,5
154 unidade (UI) de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e incubados a 37 °C por 30 minutos,
155 seguido de 20 minutos a 80 °C.

156 Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *kit Big Dye® Terminator Cycle*
157 *Sequencing* (versão 3.1, *Applied Biosystems*, Foster City CA, USA), sendo a mesma
158 preparada em um volume final de 10 µL com 1,6 µM *primer F* ou *primer R* e,
159 aproximadamente, 1,5 µL do produto de PCR purificado com *EXO-SAP*. Foram realizadas
160 duas amplificações para cada amostra, uma com o *primer F* e outro com o *primer R*.

161 Em seguida, as amostras foram colocadas em termociclador *Veriti® Thermal*
162 *Cycler da Applied Biosystems*, utilizando o seguinte programa: 96 °C por 1 minuto, seguido
163 de 25 ciclos de 96 °C por 10 minutos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Por fim,
164 uma nova etapa de purificação foi realizada utilizando-se EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol
165 70%, etanol absoluto e ressuspendido em 10 µL de formamida Hi-Di. Os produtos da PCR
166 purificados foram sequenciados em um sequenciador automático modelo ABI-3130®
167 (*Applied Biosystems*) e separados por eletroforese capilar.

168 Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foram editados e
169 analisados usando o *Software Bio Edit*. Inicialmente, as sequências foram editadas para
170 remoção de trechos de baixa qualidade. Em seguida, foram alinhadas às sequências geradas
171 para cada produto de PCR (uma com *primer F* e outra com *primer R*). Por fim, as sequências
172 consenso geradas a partir das sequências obtidas para cada produto de PCR foram alinhadas
173 contra a sequência de referência do gene *GDF-8* da versão Btau_4. 6.1 do genoma de *Bos*
174 *taurus* obtida no *Genbank* (AB076403.1).

175

176 **4.2. Detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose a 4%**

177 A segunda metodologia testada foi baseada na reação em cadeia da polimerase
178 seguida de eletroforese horizontal em gel de agarose à 4% para visualização dos alelos
179 contendo ou não a deleção nt821. Nesta metodologia foram utilizados novos *primers*
180 (*Primer* F: 5'-GGAGAGATTTTGGGCTTGATTGT-3'; *Primer* R: 3'-
181 TCTCCAGAGCAGTAATTGGCC-5') que amplificam uma região menor do exon III de
182 apenas 142 pb, englobando o sítio da deleção (XAVIER, 2014). O protocolo utilizado para a
183 reação de amplificação foi o mesmo descrito no item 3.

184

185 **4.3. Detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA**

186 Para avaliar esta terceira metodologia, foram utilizados os mesmos *primers*
187 desenhados para a amplificação do fragmento de 550 pb do item 3, porém o *primer* F foi
188 marcado com um dos três fluoróforos (FAM6, HEX ou NED) e os fragmentos amplificados
189 foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático. Cada amostra de DNA
190 a ser genotipada foi amplificada com um dos três pares de *primers*, ou seja, para cada animal
191 foi gerado um perfil genotípico com uma determinada marcação (FAM6, HEX ou NED). O
192 protocolo utilizado para as reações de amplificação foi o mesmo descrito no item 3.

193 Em seguida, essas amostras foram diluídas à 5X, onde foi utilizado 2 µL dessa
194 diluição, acrescidos de 0,3 µL do reagente *Size Standard* (65400HDRox) e 7,7 µL de
195 formamida Hi-Di. Os produtos amplificados foram então separados por eletroforese capilar
196 em sequenciador automático modelo ABI-3130® (*Applied Biosystems*) e genotipados por
197 meio do programa *Gene Marker*, utilizando o filtro DS30 do equipamento.

198

199 **5. Estimativas do custo e do tempo dispendido para genotipagem da mutação nt821**

200 Dada à importância de se conhecer os animais portadores do alelo nt821 que
201 confere a síndrome da musculatura dupla em algumas raças de bovinos de corte, objetivou-
202 se a padronização de uma metodologia de genotipagem prática, rápida e com baixo custo.
203 Sendo assim, avaliou-se o custo de genotipagem da mutação nt821, comparando as técnicas
204 de sequenciamento direto do exon III do gene *GDF-8*; detecção de fragmentos de DNA em
205 gel de agarose a 4% e detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA.

206 Para obtenção dos dados e cálculo dos valores médios foram construídas planilhas
207 utilizando como base orçamentos obtidos com empresas que vendem reagentes e produtos
208 para biologia molecular. Assim, foi feita a média em reais (R\$) do custo bruto e do custo por
209 unidade medida, ou seja, por grama (g), mililitro (mL), microlitro (μL) ou por unidade (U)
210 de cada reagente. Após a obtenção do valor médio de cada reagente foi calculado o valor
211 médio de todas as soluções utilizadas para a genotipagem da mutação nt821 por meio das
212 três técnicas avaliadas.

213 Com o valor final de cada solução, o volume total da solução e a quantidade
214 utilizada por amostra, foram estimados o custo unitário médio de cada reagente utilizado
215 para cada etapa do processo. Posteriormente, foi realizada a somatória dos custos de todas as
216 etapas para obtenção de um valor final aproximado do custo de insumo de genotipagem por
217 amostra, por técnica avaliada.

218 O custo bruto dos materiais foi obtido por meio de orçamentos de, no mínimo, três
219 fornecedores e as cotações foram realizadas num período de cinco meses (julho a dezembro
220 de 2016). O custo da mão de obra e o desgaste dos equipamentos não foram incluídos neste
221 trabalho.

222 O tempo gasto para realização de cada procedimento (extração do DNA, reações de
223 amplificação, eletroforese e genotipagem) foi estimado, a fim de gerar a média total do

224 tempo gasto. O tempo de execução de cada método foi calculado pelos minutos necessários
225 para processar um grupo de, no máximo, 17 amostras.

226

227

Resultados e Discussões

228

229 1. Avaliação comparativa de três metodologias de genotipagem da mutação nt821

230

231 1.1. Sequenciamento direto do exon III do gene *GDF-8*

232 Para confirmação e identificação dos genótipos de interesse, as sequências geradas
233 no sequenciamento foram alinhadas contra a sequência de referência deste gene no genoma
234 de *Bos taurus* obtida no *Genbank* (AB076403.1). Nesta análise, foi possível identificar a
235 presença ou ausência de 11 pb no sítio da deleção localizado no exon III do gene *GDF-8*.

236 Com base nas avaliações fenotípicas realizadas pelo técnico do Geneplus em
237 animais da raça Senepol, foram encontrados os genótipos (del/del) homozigotos para a
238 deleção em todos os sete animais sequenciados que apresentavam hipertrofia muscular. Na
239 Figura 1, observa-se o ponto exato da ausência dos 11 pb para o alelo com a mutação nt821 .

240 Entre os 10 animais sequenciados que não apresentavam hipertrofia muscular foram
241 identificados sete animais homozigotos para o alelo sem a mutação nt821 e três animais
242 heterozigotos para a mutação nt821. A Figura 2 mostra um animal homozigoto para o alelo
243 normal (+/+), podendo ser observado a presença dos 11 pb e a Figura 3 mostra um animal
244 heterozigoto (+/del), no qual pode-se observar o ponto onde começam a surgir picos duplos
245 na sequência, indicando a presença de um alelo normal e outro contendo a mutação.

246 Há relatos na literatura de que esta metodologia já foi utilizada para detectar, além
247 da mutação nt821, outras mutações que causam a síndrome da musculatura dupla em
248 bovinos. Na raça Maine-Anjou, por exemplo, foi identificada uma deleção de 7 pb e uma

249 inserção de 10 pb no exon III do gene *GDF-8* (GROBET et al., 1998). O sequenciamento
250 também foi muito utilizado para detecção de marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide*
251 *Polymorphism*), sendo todos estes SNPs associados à síndrome da musculatura dupla
252 (KARIM et al., 2000; MARCHITELLI et al., 2003; TEIXEIRA & OLIVEIRA, 2007;
253 GADANHO, 2014).

254 O sequenciamento direto dos produtos da PCR obtidos por meio da amplificação do
255 exon III do gene *GDF-8* em bovinos Senepol apresentou alta sensibilidade, indicando com
256 precisão a sequência completa do fragmento amplificado e o genótipo de todos os 17
257 animais avaliados.

258

259 **1.2. Detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose a 4%**

260 Nesta metodologia foi possível observar no gel de agarose a 4% a presença do
261 produto de PCR amplificado, com um fragmento de 142 pb, onde animais *+/+* (sem a
262 deleção) apresentam uma única banda na altura de 142 pb, animais *+del* (heterozigotos)
263 apresentam uma banda de 142 pb e outra de 131 pb e, por fim, animais *del/del* (com
264 deleção) apresentam uma única banda na altura de 131 pb (Figura 4).

265 Nesta metodologia não foi possível realizar a genotipagem dos 17 animais
266 avaliados anteriormente por falta de DNA de alguns animais para os quais foram obtidas
267 apenas amostras de pelo. Extrações de DNA realizadas com amostras de pelo nem sempre
268 resultam em DNA de boa qualidade e em quantidade suficiente para as análises. No entanto,
269 os quatorze animais que foram genotipados apresentaram 100% de concordância com os
270 genótipos obtidos destes mesmos animais por sequenciamento.

271 O processo de separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose
272 depende, basicamente, da concentração da agarose, da voltagem aplicada durante a
273 eletroforese e do tamanho do fragmento a ser analisado (FERREIRA & GRATTAPAGLIA,

274 1998). Sendo a principal limitação observada com a utilização desta técnica para a
275 genotipagem do alelo nt821 a dificuldade de distinção de indivíduos heterozigotos dos
276 homozigotos (Figura 4), devido a pequena diferença no tamanho dos fragmentos gerados de
277 apenas 11 pares de base. Desta forma, quando se utilizar esta metodologia para genotipagem
278 é necessário acrescentar, em todas as corridas eletroforéticas, amostras de DNA controle de
279 animais previamente genotipados por sequenciamento, reduzindo, assim, artefatos técnicos.

280 Apesar de todo o desenvolvimento tecnológico que ocorreu nos últimos anos com
281 as técnicas de biologia molecular, como genotipagem e sequenciamento em larga escala, a
282 genotipagem por meio da eletroforese em gel de agarose ainda não está em desuso. Esta
283 metodologia é utilizada em diversos laboratórios e centros de pesquisa quando o objetivo é a
284 avaliação de uma região genômica específica, em um número reduzido de indivíduos e
285 quando a disponibilidade de recursos financeiros é limitada (GOETZE et al., 2017).

286 Eletroforese em gel de agarose também é bastante empregada para detecção de
287 SNPs em análises de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment*
288 *Length Polymorphism*), tendo sido utilizada por alguns autores para detectar polimorfismos
289 relacionados a hipertrofia muscular em bovinos de corte como, por exemplo, o SNP E29IX
290 que foi identificado em animais da raça Marchigiana (TEIXEIRA& OLIVEIRA, 2007). Já
291 Wiener et al. (2002) utilizaram eletroforese em gel de agarose para genotipar a mutação
292 nt821 em bovinos da raça South Devon.

293

294 **1.3. Detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA**

295 A identificação dos genótipos dos animais avaliados por esta técnica resultou em
296 100% de concordância com os genótipos obtidos destes mesmos animais por
297 sequenciamento direto e por PCR seguida de eletroforese em gel de agarose a 4%, com alta
298 sensibilidade de detecção. Nesta metodologia foram encontrados os genótipos homozigoto

299 para o alelo normal (+/+) (Figura 5), homocigoto para deleção (del/del) (Figura 6) e
300 heterocigoto (+/del) (Figura 7).

301 O uso da eletroforese capilar para a análise de produtos de PCR possui diversas
302 vantagens se comparada à tradicional técnica de eletroforese em gel de agarose, pois possui
303 a sensibilidade de separar rapidamente produtos de amplificação de DNA de forma
304 automática com resultados que apresentam alto grau de resolução (BUTLER, 2001).

305 A separação de fragmentos em eletroforese capilar, também pode ser realizada por
306 meio da utilização de *primers* marcados com fluoróforos em um processo de amplificação
307 seletiva. Com este método os *primers* podem ser marcados com até quatro fluoróforos
308 distintos e os produtos de cada um desses *primers* (fragmentos amplificados) podem ser
309 agrupados para análise em eletroforese capilar em um sistema denominado *poolplexing*
310 (GOETZE et al., 2017).

311 Neste trabalho, um sistema *poolplexing* foi padronizado para detecção da deleção
312 nt821, sendo que para cada amostra analisada foi utilizado um *primer* F marcado com uma
313 fluorescência diferente (Figura 8). Os *primers* utilizados para o desenvolvimento deste
314 sistema foram os mesmos usados na metodologia de sequenciamento direto, porém foram
315 sintetizados novamente e marcados com os fluoróforos FAM6, HEX ou NED. Após a
316 realização das PCRs, os fragmentos amplificados com os *primers* marcados foram
317 submetidos à eletroforese capilar para identificação dos genótipos.

318 Os *primers* marcados foram desenhados com o intuito de gerar fragmentos de
319 aproximadamente 550 pares de bases e, dessa forma, maximizar o seu uso pelos criadores,
320 pois, além da genotipagem da mutação nt821, este sistema pode ser associado aos testes de
321 paternidade que são rotineiramente realizados por meio de laboratórios credenciados ao
322 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes testes são feitos
323 utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, os quais também são marcados

324 com fluoróforos e analisados por eletroforese capilar em sequenciamento automático de
325 DNA. Como os fragmentos analisados no teste de paternidade estão entre 100 e 300 pb não
326 haverá sobreposição de picos nos eletroferogramas.

327 Esta metodologia poderá ser licenciada para laboratórios nacionais credenciados
328 pelo MAPA para a realização dos testes de paternidade, otimizando, assim, a relação
329 custo/benefício. No caso de bovinos da raça Senepol, cabe ressaltar que cerca de 80% a 90%
330 dos animais Senepol são obtidos por meio de fertilização *in vitro* e transferência de embriões
331 (FIV/TE), sendo obrigatório o teste de paternidade para o registro dos animais na
332 Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol (ABCB Senepol).

333

334 **2. Análise dos custos e do tempo gastos para genotipagem do polimorfismo nt821**

335 Como pode ser observado na Tabela 1, das três metodologias testadas, a detecção
336 de fragmentos em gel de agarose a 4% foi a que precisou de menos tempo para ser realizada,
337 aproximadamente, 11 horas e 34 minutos e foi a menos onerosa, custando cerca de R\$ 4,16
338 por amostra genotipada.

339 Apesar da técnica de detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA
340 ser mais onerosa (R\$ 21,90 por amostra) e mais laboriosa (aproximadamente 16 horas e 34
341 minutos) do que a metodologia de detecção de fragmentos em gel de agarose a 4%, neste
342 trabalho foi possível reduzir os custos desta análise com a marcação de cada *primer*
343 *Forward* com uma fluorescência diferente (FAM, HEX ou NED). O desenvolvimento deste
344 sistema tornou possível a genotipagem simultânea de três amostras pelos mesmos R\$ 15,00
345 gastos com a etapa de eletroforese capilar (Figura 8 e Tabela 1). Assim, para genotipar três
346 animais pela metodologia de sequenciamento direto do exon III custou, em média, R\$ 94,05
347 e para genotipar simultaneamente as mesmas três amostras pela metodologia de detecção de
348 fragmentos em sequenciador automático, usando o sistema *poolplexing*, custou, em média,

349 R\$ 65,70. Esta metodologia também apresenta a grande vantagem de poder ser realizada
350 junto com os testes de paternidade em bovinos que são realizados rotineiramente pelos
351 produtores, melhorando, assim, a relação custo/benefício.

352 Como já era esperado, a genotipagem por meio do sequenciamento automático de
353 DNA foi a metodologia que apresentou a pior relação custo/benefício, pois cada amostra
354 genotipada custou, em média, R\$ 31,35 e foram necessárias, aproximadamente, 18 horas
355 para sua realização (Tabela 1).

356

357 **Conclusões**

358 Cada uma das três metodologias testadas apresenta vantagens e desvantagens. A
359 escolha de qual delas usar depende, basicamente, da quantidade de DNA disponível para a
360 genotipagem, dos conhecimentos técnicos do investigador, das considerações monetárias e
361 dos equipamentos disponíveis no laboratório.

362 Com o desenvolvimento do sistema *poolplexing*, a detecção de fragmentos em
363 sequenciador automático apesar de ser uma metodologia mais onerosa e laboriosa do que a
364 técnica de detecção de fragmentos em gel de agarose a 4% apresenta a grande vantagem de
365 poder ser realizada junto com os testes de paternidade de bovinos que são realizados
366 rotineiramente pelos produtores. Esta metodologia poderá ser licenciada para laboratórios
367 nacionais credenciados pelo MAPA para a realização dos testes de paternidade, otimizando,
368 assim, a relação custo/benefício.

369

370 **Agradecimentos**

371 À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do
372 Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo financiamento do projeto de pesquisa e
373 pela concessão da bolsa de mestrado.

374

Referências

375 ARTHUR, P. F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M. A. Incidence of dystocia and perinatal
376 calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. **The**
377 **Canadian Veterinary Journal**, v.29, n.2, p.163, 1988.

378 BUTLER, J. M.; RUITBERG, C. M.; VALLONE, P. M. Capillary electrophoresis as a tool
379 for optimization of multiplex PCR reactions. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v.369, p.200-205,
380 2001.

381 CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no
382 melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38,
383 p.64-71, 2009 (suplemento especial).

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

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

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

393 GOETZE, M.; PASSAIA, G.; SPERB-LUDWIG, F. Marcadores moleculares baseados em
394 restrição: AFLP e suas variações. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.;
395 ZANELLA, C. M; PASSAIA, G. (Ed). **Marcadores moleculares na era genômica:**
396 **metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, p.60-
397 76.

- 398 GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L. J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.;
399 MICHAUX, C.; MENISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular
400 definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing
401 double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.210-213, 1998.
- 402 KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T. P. L.; BASS, J. J. Mutations in myostatin
403 (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7,
404 p.910-915, 1997.
- 405 KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M.
406 Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double muscling in cattle using
407 multiplex oligonucleotide ligation assay. **Animal Genetics**, p.31-396, 2000.
- 408 MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M. C.; CRISA, A.; NARDONE, A.; MARSAN, P. A.;
409 VALENTINI, A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in
410 the third exon of myostatin gene. **Mammalian Genome**, v.14, p.392-395, 2003.
- 411 MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance.
412 **Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science**, v.16, p.23-53, 1982.
- 413 REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia Molecular aplicada à produção**
414 **animal**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.2015, 2001.
- 415 TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. Frequência do gene miostatina (GDF-8) em
416 rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
417 **Zootecnia**, v.59, n.3, p.805-809, 2007.
- 418 TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M; PASSAIA, G.
419 **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto:
420 Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181p.

421 WIENER, P.; WOOLLIAMS, J. A.; FRANK-LAWALE, A.; RYAN, M.; RICHARDSON,
422 R. I.; NUTE, G. R.; WOOD, J. D.; HOMER, D.; WILLIAMS, J. L. The Effects of a
423 Mutation in the Myostatin Gene on Meat and carcass quality. **Meat Science**, v.83, n.1,
424 p.127-134, 2009.

425 WIENER, P.; SMITH, J. A.; LEWIS, A. M.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L.
426 Muscle-related traits in cattle: the role of the myostatin gene in the South Devon
427 breed. **Genetics Selection Evolution**, v.34, n.2, p.221, 2002.

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

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

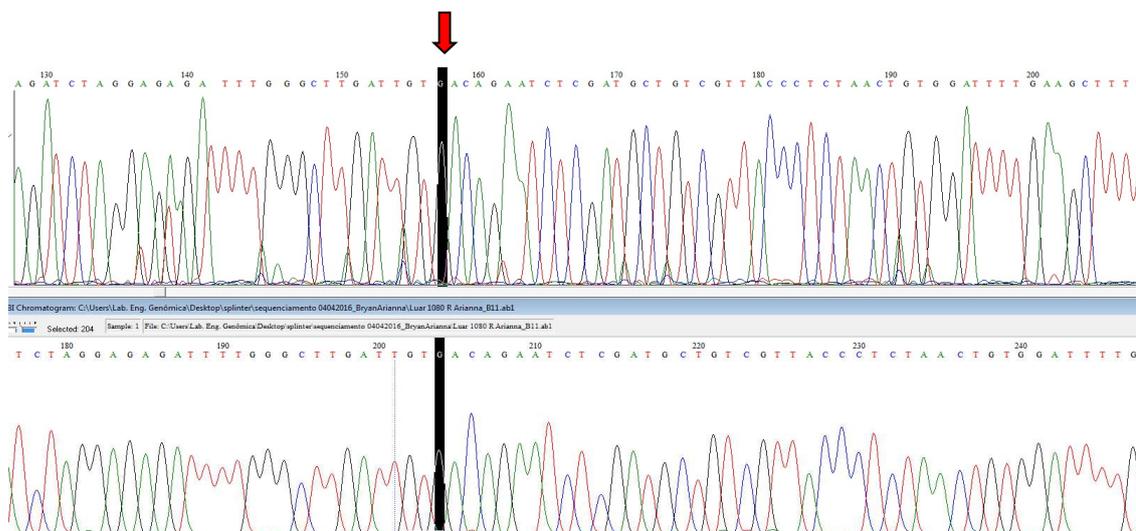
441

442

443

444

445



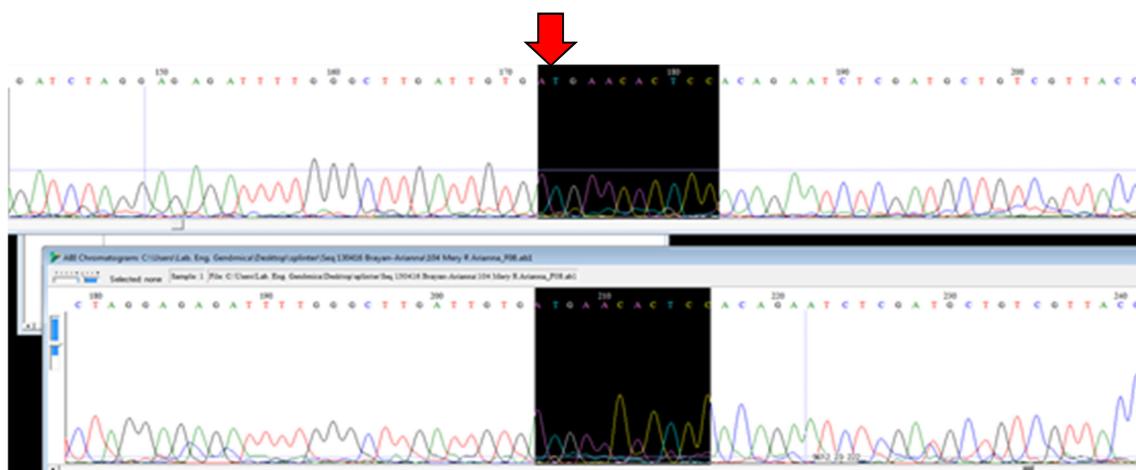
446

447 Figura 1. Eletroferogramas observados na genotipagem da mutação nt821 no exon III
 448 do gene *GDF-8* por meio da metodologia de sequenciamento direto. Exemplo de um
 449 animal Senepol homozigoto (del/del) para a deleção de 11 pares de bases (pb). A seta
 450 indica o ponto exato da ausência dos 11 pb.

451

452

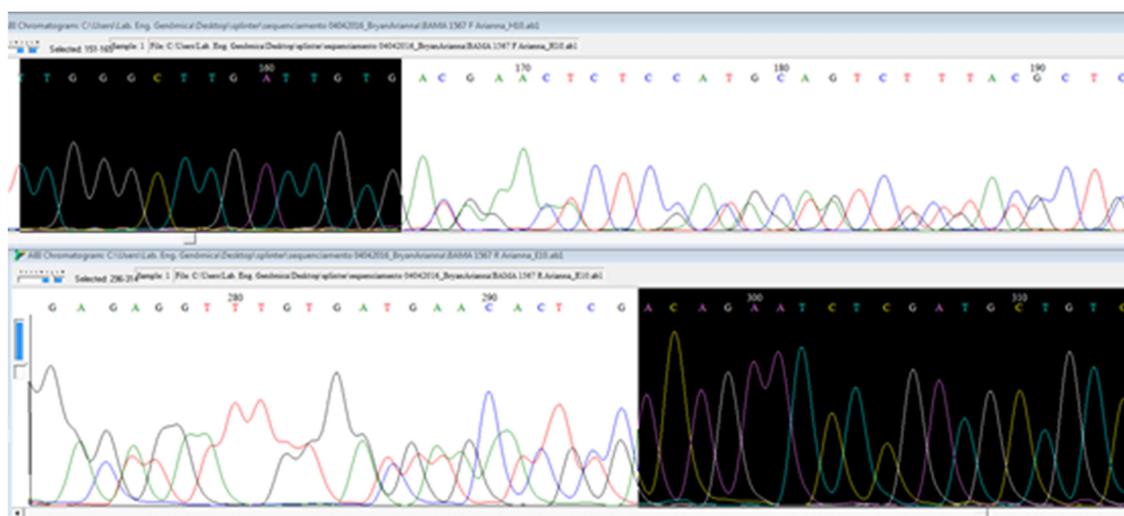
453



454

455 Figura 2. Eletroferogramas observados na genotipagem da mutação nt821 no exon III
 456 do gene *GDF-8* por meio da metodologia de sequenciamento direto. Exemplo de um
 457 animal Senepol homozigoto (+/+) sem a deleção de 11 pares de bases (pb). A seta
 458 indica o ponto exato da presença dos 11 pb.

459



460

461 Figura 3. Eletroferogramas observados na genotipagem da mutação nt821 no exon III
 462 do gene *GDF-8* por meio da metodologia de sequenciamento direto. Exemplo de um
 463 animal Senepol heterozigoto (+/del). O ponto onde começam a surgir picos duplos na
 464 seqüência indicam a presença de um alelo normal e outro contendo a mutação.

465

466



467

468 Figura 4. Gel de agarose 4% com produto de amplificação de um segmento de 142
 469 pares de bases (pb) do gene *GDF-8*. 100pb = Padrão molecular de tamanho de 100 pb.
 470 del/del = Animais homozigotos para a deleção nt821. +/-del = Animais heterozigotos.
 471 +/-+ = Animais homozigotos sem a deleção nt821 (+/+). BRC= controle negativo. 50pb
 472 = Padrão molecular de tamanho de 50 pb.

473

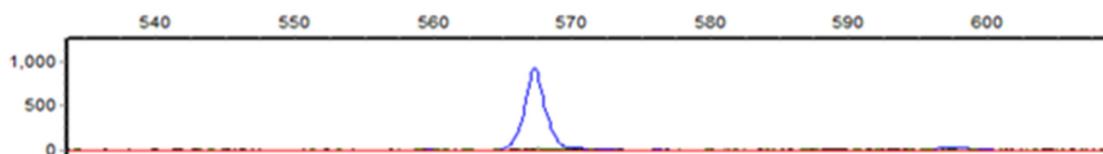


474

475 Figura 5. Eletroferograma observado da genotipagem da mutação nt821 no exon III do
 476 gene *GDF-8* por meio da metodologia de detecção de fragmentos em sequenciador
 477 automático de DNA. Exemplo de um animal Senepol que não apresenta a deleção de
 478 11 pares de bases.

479

480

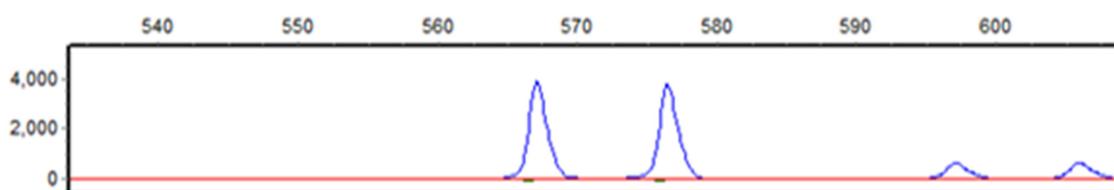


481

482 Figura 6. Eletroferograma observado da genotipagem do polimorfismo nt821 no exon
 483 III do gene *GDF-8* por meio da metodologia de detecção de fragmentos em
 484 sequenciador automático de DNA. Exemplo de um animal Senepol que apresenta a
 485 deleção de 11 pares de bases.

486

487



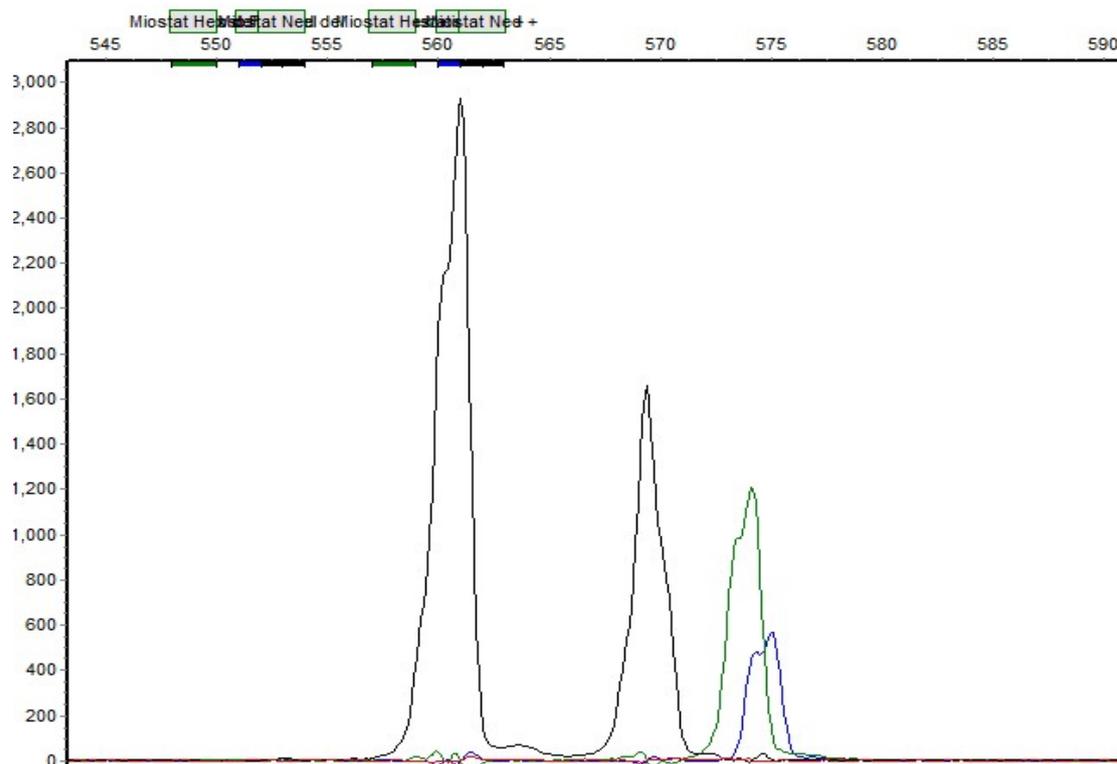
488

489 Figura 7. Eletroferograma observado da genotipagem do polimorfismo nt821 no exon
 490 III do gene *GDF-8* por meio da metodologia de detecção de fragmentos em
 491 sequenciador automático de DNA. Exemplo de um animal Senepol heterozigoto.

492

493

494



495

496 Figura 8. Eletroferograma mostrando três animais genotipados por meio da
 497 metodologia de detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA. Em
 498 azul fluorescência FAM (animal homozigoto del/del), em verde fluorescência HEX
 499 (animal homozigoto +/+) e em amarelo fluorescência NED (animal heterozigoto
 500 +/-del), que no programa *Gene Marker* é representado em preto.

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512 Tabela 1. Custos da genotipagem da mutação nt821, pelas técnicas de detecção de
 513 fragmentos de DNA em gel de agarose a 4%, sequenciamento direto do exon III do gene
 514 *GDF-8* e detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA.

Etapas	Detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose a 4%		Sequenciamento direto do exon III do gene <i>GDF-8</i>		Detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA	
	Valor unitário (R\$)	Tempo (min)	Valor unitário	Tempo (min)	Valor unitário	Tempo (min)
Extração de DNA genômico	R\$ 0,30	320	R\$ 0,30	320	R\$ 0,30	320
Gel de agarose para quantificação de DNA e corrida eletroforética	R\$ 0,50	140	R\$ 0,50	140	R\$ 0,50	140
PCR com <i>primers</i> não marcados	R\$ 0,50	100	R\$ 0,50	100	-----	-----
PCR com <i>primers</i> marcados com fluoróforos	-----	-----	-----	-----	R\$ 0,55	100
Gel de agarose do produto de PCR e corrida eletroforética	R\$ 0,86	120	R\$ 0,55	120	R\$ 0,55	120
Purificação da reação com Exo-Sap	-----	-----	R\$ 5,50	60	-----	-----
Reação de Sequenciamento	-----	-----	R\$ 4,00	150	-----	-----
Eletroforese capilar	-----	-----	R\$ 15,00	300	R\$ 15,00	300
Tubos, microtubos, placas, tubos falcons, ponteiras, e outros	R\$ 2,00	-----	R\$ 5,00	-----	R\$ 5,00	-----
Total	R\$ 4,16	680	R\$ 31,35	1.070	R\$ 21,90	980

515 *Na tabela estão expostos os valores para a realização de uma reação. Já o tempo foi
 516 calculado pelos minutos necessários para processar um grupo de, no máximo, dezessete
 517 amostras.

1 **CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO DE ACORDO COM AS**
2 **NORMAS DA REVISTA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB).**

3
4 **Associação da mutação nt821 com características de interesse econômico em bovinos**
5 **da raça Senepol**

6
7 Autores: Arianna da Silva Costa Urquiza⁽¹⁾, Fabiane Siqueira⁽²⁾ e André Luiz Julien Ferraz⁽¹⁾

8
9 ⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do
10 Sul, Unidade Universitária de Aquidauana. Rodovia Aquidauana-UEMS Km 12, Caixa
11 Postal 25 - CEP 79200-000, Aquidauana/MS, Brasil. ariannaurquiza@yahoo.com.br,
12 splinter@uems.br.

13 ⁽²⁾ Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte. Av. Rádio Maia, 830 - Vila Popular, CEP
14 79106-550, Campo Grande/MS, Brasil. fabiane.siqueira@embrapa.br.

15
16 **Resumo**

17 Objetivou-se genotipar a mutação nt821, localizada no exon III do gene *GDF-8*, e avaliar
18 sua associação com características de interesse econômico em touros jovens provenientes de
19 Provas de Avaliação de Desempenho a pasto (PADS) da raça Senepol. Para isso, o DNA
20 genômico de amostras biológicas de 346 animais foi extraído e quantificado por
21 espectrofotometria, tendo sua integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. Posteriormente,
22 estas amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) e à detecção de
23 fragmentos em sequenciador automático de DNA. Dos 346 touros jovens Senepol, 70
24 animais (20,23%) apresentaram o genótipo heterozigoto (+/del) e 276 animais apresentaram
25 o genótipo homozigoto (+/+). Os touros Senepol heterozigotos apresentaram maior área de

26 olho de lombo (AOL) e menor perímetro escrotal (PE) quando comparados com os
27 homozigotos sem a deleção nt821. Apesar de não ter sido observada diferença estatística
28 significativa ($p < 0,05$) para as características EGS550 e EGP550, os indivíduos heterozigotos
29 também apresentaram menor porcentagem de gordura. Assim, a identificação precoce de
30 animais que apresentam o fenótipo da hipertrofia muscular torna mais eficiente o processo
31 de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações, facilitando tanto a introdução
32 quanto à eliminação dos alelos de interesse na população.

33

34 Termos para indexação: *Bos taurus*, gene *GDF-8*, miostatina, musculatura dupla, seleção

35

36 *Association of mutation nt821 with economic traits in Senepol cattle*

37

38 **Abstract**

39 *The objective of this study was to genotype the mutation nt821, located in the exon III of the*
40 *GDF-8 gene, and to evaluate its association with economic traits in Senepol young bulls.*

41 *For this, genomic DNA from biological samples of 346 animals was extracted and*
42 *quantified by spectrophotometry, and its integrity was evaluated in 0.8% agarose gel.*

43 *Subsequently, these samples were submitted to the polymerase chain reaction (PCR) and the*
44 *detection of fragments in automatic DNA sequencer. Of the 346 Senepol young bulls, 70*

45 *animals (20.23%) had the heterozygous genotype (+/del) and 276 animals had the*
46 *homozygous (+/+) genotype. Heterozygous Senepol bulls presented greater loin eye area*

47 *(AOL) and lower scrotal circumference (PE) when compared to homozygotes without nt821*
48 *deletion. Although no significant statistical difference ($p < 0.05$) was observed for the*

49 *EGS550 and EGP550 traits, the heterozygous individuals also presented lower percentage*
50 *of fat. Thus, the early identification of animals that present the muscle hypertrophy*

51 *phenotype makes the selection process of the bulls that will be the parents of the next*
52 *generations easier, facilitating both the introduction and elimination of the alleles of interest*
53 *in the population.*

54

55 ***Index terms:*** *Bos taurus, double musculature, GDF-8 gene, myostatin, selection*

56

57 **Introdução**

58 O Senepol é um taurino adaptado com grande potencial de produção para colaborar
59 com a pecuária bovina brasileira. É originário de Saint Croix, condado e distrito das Ilhas
60 Virgens americanas e chegou ao Brasil no ano 2000. A raça Senepol pode ser utilizada em
61 diversas estratégias para a produção de carne, no entanto, seu grande diferencial é viabilizar
62 o uso de genética taurina em sistemas de produção desenvolvidos em condições tropicais
63 (MENEZES et al., 2013).

64 Alguns animais da raça Senepol apresentam a síndrome da musculatura dupla ou
65 hipertrofia muscular. Sendo assim, foi desenvolvido em 2014 na Embrapa Gado de Corte
66 um trabalho de prospecção de polimorfismos no gene *GDF-8 (Growth Differentiation*
67 *Factor - 8)* visando a identificação da mutação causal desta síndrome. Neste trabalho, o
68 sequenciamento deste gene em dois animais Senepol com hipertrofia muscular, revelou 11
69 mutações, sendo dez polimorfismos de troca de base única (*Single Nucleotide Polymorphism*
70 *- SNP*) e uma deleção de 11 pares de bases localizada no exon III e denominada de nt821
71 (XAVIER, 2014).

72 Animais que exibem esta característica possuem sérias limitações fisiológicas e
73 reprodutivas, no entanto, quanto a aspectos de interesse econômico esses animais possuem
74 menos gordura, mais músculos e alta proporção de cortes de carne com alto valor de

75 mercado, proporcionando, em média, 20% mais carne em cada animal (ARTHUR et al.,
76 1995; CHARLIER et al., 1995; KAMBADUR et al., 1997; JOHNSON, 1999).

77 O aprimoramento das técnicas em biologia molecular tem facilitado à identificação
78 de animais portadores de alelos mutantes que conferem a síndrome da musculatura dupla,
79 podendo tornar mais eficiente para os produtores o processo de eliminação ou de
80 manutenção dos indivíduos que possuam estes alelos nos rebanhos.

81 Neste contexto, objetivou-se com este trabalho genotipar o polimorfismo nt821 e
82 avaliar sua associação com características produtivas em animais da raça Senepol
83 participantes das Provas de Avaliação de Desempenho a pasto (PADS) realizadas nos anos
84 de 2011 a 2015.

85

86

Material e Métodos

87

1. Coleta de amostras biológicas e de dados fenotípicos

88 Foram coletadas informações fenotípicas e amostras biológicas de 346 animais
89 participantes de Provas de Avaliação de Desempenho a pasta da raça Senepol (PADS)
90 realizada nos anos de 2011 a 2015. Em todas as PADS, foram avaliadas características
91 fenotípicas como peso inicial ajustado para 330 dias (PESO330), peso final ajustado para
92 550 dias (PESO550), ganho de peso médio diário (GMD), perímetro escrotal (PE550),
93 espessura de gordura subcutânea (EGS550), espessura de gordura na picanha (EGP550),
94 área de olho de lombo (AOL550) e marmoreio (MARM550). As medidas das características
95 de carcaça foram coletadas transversalmente no músculo *Longissimus dorsi*, na região entre
96 a 12^a e 13^a costelas e no músculo da região da picanha com um equipamento de
97 ultrassonografia com transdutor linear de 3,5 MHz ASP 30C/18 cm, específico para
98 avaliação de carcaça. E as características de MARM550 e conformação frigorífica (NCF)
99 foram coletadas e classificadas visualmente por meio de escores.

100 Amostras de sangue foram coletadas por via endovenosa em tubos para coleta de
101 sangue a vácuo (Vacutainer) de 4,5 mL contendo K3 EDTA a 15%. Em seguida, foram
102 homogeneizadas cuidadosamente e enviadas ao Laboratório de Genômica e Melhoramento
103 Animal da Embrapa Gado de Corte para processamento e obtenção de leucócitos. Os
104 leucócitos foram armazenados em tubos de 1,5 mL e congelados a – 20 °C até o momento da
105 extração do DNA.

106

107 **2. Extração e quantificação de amostras de DNA**

108 O DNA genômico foi extraído utilizando o método descrito por Regitano e
109 Coutinho (2001). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em
110 aparelho NanoDrop (Thermo Scientific) e suas integridades foram avaliadas em gel de
111 agarose 0,8%, por meio de comparação com padrões de DNA de concentrações conhecidas
112 (50, 100 e 200 ng/μL), corado com SyberGold (1:10.000), visualizado e fotografado sob luz
113 ultravioleta.

114

115 **3. Detecção de fragmentos de DNA em sequenciador automático**

116 A separação de fragmentos de DNA por meio de eletroforese capilar pode ser
117 realizada com a utilização de *primers* marcados com diferentes fluoróforos em um processo
118 de amplificação seletiva. Com este método os *primers* podem ser marcados com até quatro
119 fluoróforos distintos e os produtos de cada um desses *primers* (fragmentos amplificados)
120 podem ser agrupados para análise simultânea em eletroforese capilar em um sistema
121 denominado *poolplexing* (GOETZE et al., 2017). Neste contexto, um sistema *poolplexing*
122 foi desenvolvido e padronizado para detecção da deleção nt821 em animais Senepol, sendo
123 que para cada amostra analisada foi utilizado um *primer* F marcado com uma fluorescência
124 diferente (Figura 1).

125 Os *primers* utilizados para amplificação do exon III do gene *GDF-8* foram os
126 mesmos descritos por Xavier (2014), que amplificam um fragmento de 550 pares de bases
127 (pb). Porém, o *primer* F foi marcado com um dos três fluoróforos (FAM6, HEX ou NED) e
128 os fragmentos amplificados foram submetidos, simultaneamente, à eletroforese capilar em
129 sequenciador automático. Cada amostra de DNA a ser genotipada foi amplificada com um
130 dos três pares de *primers*, ou seja, para cada animal foi gerado um perfil genotípico com
131 uma determinada marcação (FAM6, HEX ou NED).

132 As reações de amplificação (PCR) foram padronizadas com um volume final de 25
133 μL contendo 40 ng de DNA genômico; 0,164 μM de cada um dos *primers* (*Forward* (F) e
134 *Reverse* (R)); Tampão de PCR 10 X (10 mM Tris-HCl; pH 8,0 e 50 mM de KCl); 3,0 mM
135 de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 1,0 unidade (UI) de Taq DNA polimerase e completado
136 com água ultra pura. O protocolo da PCR foi de 95 °C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos
137 de 94 °C por 30 segundos; temperatura de anelamento de 60 °C por 30 segundos e 72 °C por
138 40 segundos, com extensão final de 72 °C por 7 minutos (XAVIER, 2014).

139 Para visualização dos fragmentos amplificados, primeiramente os produtos das
140 PCRs foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% em tampão TBE
141 1X (Tris-Borato-EDTA). Foram utilizados cerca de 3 μL da solução de produto de PCR
142 acrescidos de 3 μL de tampão de corrida (Tris-HCl, 0,1 mM, pH 6,8; azul de bromofenol
143 0,02 g; glicerol 50%). Após a corrida eletroforética, o géis foram corados em solução
144 contendo *SyberGold* (1:10.000). O tamanho do fragmento amplificado foi determinado pela
145 comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb e a imagem de cada gel foi
146 fotografada por um sistema digital de foto-documentação *Gel-Doc*, com transiluminador
147 ultravioleta.

148 Em seguida, essas amostras foram diluídas à 5X, onde foi utilizado 2 μL dessa
149 diluição, acrescidos de 0,3 μL do reagente *Size Standard* (65400HDRox) e 7,7 μL de

150 formamida Hi-Di. Os produtos amplificados para três animais diferentes foram então
151 separados, simultaneamente, por eletroforese capilar em sequenciador automático modelo
152 ABI-3130® (*Applied Biosystems*) e genotipados por meio do programa *Gene Marker*,
153 utilizando o filtro DS30 do equipamento.

154

155 **4. Análises estatísticas**

156 Foram realizadas as análises de frequência e distribuição do alelo portador da
157 deleção de 11 pb (nt821) nos 346 touros jovens Senepol, bem como a cada ano de avaliação.
158 A provável estimativa de surgimento de genótipos recessivos na população foi avaliada por
159 meio do princípio de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

160 Para corrigir os efeitos de diferentes idades e períodos de avaliação ao longo dos
161 anos as medidas foram ajustadas considerando início das PADS como 330 dias e final das
162 avaliações para 550 dias. Assim, o estudo de associação entre a mutação nt821 e as
163 características fenotípicas avaliadas foi realizado utilizando a Análise de Variância por meio
164 do procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa estatístico SAS (*Statistical*
165 *Analysis System*, 2002). Para essa análise foi utilizado um modelo misto contendo o efeito
166 aleatório do pai, efeito fixo do genótipo e ano de avaliação, com valor de probabilidade
167 menor ou igual a 5%.

168

Resultados e Discussões

169 O desenvolvimento de um sistema *poolplexing* para detecção da deleção nt821 em
170 animais Senepol foi realizado com o intuito de maximizar o seu uso pelos criadores, pois,
171 além da genotipagem da mutação nt821, este sistema pode ser associado aos testes de
172 paternidade que são rotineiramente realizados por meio de laboratórios credenciados ao
173 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes testes são feitos
174 utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites, os quais também são marcados

175 com fluoróforos e analisados por eletroforese capilar em sequenciamento automático de
176 DNA. Os *primers* marcados foram desenhados com o intuito de gerar fragmentos de
177 aproximadamente 550 pares de bases (pb) e, dessa forma, como os fragmentos analisados no
178 teste de paternidade estão entre 100 e 300 pb não haverá sobreposição de picos nos
179 eletroferogramas.

180 A metodologia desenvolvida neste trabalho poderá ser licenciada para laboratórios
181 nacionais credenciados pelo MAPA para a realização dos testes de paternidade, otimizando,
182 assim, a relação custo/benefício. No caso de bovinos da raça Senepol, cabe ressaltar que
183 cerca de 80% a 90% dos animais Senepol são obtidos por meio de fertilização *in vitro* e
184 transferência de embriões (FIV/TE), sendo obrigatório o teste de paternidade para o registro
185 dos animais na Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos Senepol (ABCB Senepol).

186 Dos 346 touros jovens Senepol genotipados por meio da detecção de fragmentos
187 em sequenciador automático, 70 (20,23%) apresentaram o genótipo heterozigoto (+/del) e
188 276 (79,77%) apresentaram o genótipo homozigoto (+/+) sem a presença da deleção nt821.
189 Não foram encontrados animais homozigotos (del/del) com fenótipo extremo para
190 musculatura dupla, já que estes animais são descartados dos rebanhos após o desmame.

191 As frequências do genótipo heterozigoto observadas foram 13,84%, 25,25%,
192 17,34% e 22,62%, respectivamente, para os anos de 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014 e
193 2015/2016. Baseado na teoria de equilíbrio de Hardy-Weinberg pode-se estimar que a
194 frequência do alelo mutado nesta população é de aproximadamente 10%. Caso esta
195 população estivesse em EHW a expectativa de nascimento de indivíduos recessivos,
196 portadores dos dois alelos mutados seria de 1%.

197 Com relação às características fenotípicas avaliadas somente área de olho de lombo
198 (AOL550) e perímetro escrotal (PE550) apresentaram diferenças estatísticas significativas
199 ($P < 0,05$) entre os animais com distintos genótipos (Tabela 1).

200 Os indivíduos heterozigotos (+/del) apresentaram maior AOL ajustada para 550
201 dias quando comparados com os homozigotos sem a mutação (+/+), apresentando
202 aproximadamente 8% a mais de carne neste músculo (Tabela 1). Outras pesquisas
203 reportaram resultados similares aos encontrados no presente trabalho. Martínez et al. (2014)
204 observaram maior AOL em animais heterozigotos da raça Asturiana de los Valles, sendo
205 62,7 cm² para heterozigotos e 57,2 cm² para os indivíduos homozigotos normais.
206 Trabalhando com animais da raça Charolês, Casas et al. (2004) encontraram,
207 aproximadamente, 10% a mais de carne neste músculo para animais heterozigotos.

208 No entanto, apesar dos animais Senepol apresentarem maior AOL, não foram
209 observadas diferenças estatisticamente significativas nos pesos avaliados (PESO330 e
210 PESO550) e ganho médio diário (GMD) entre os dois genótipos estudados (Tabela 1). Estes
211 resultados podem ser explicados pelo fato de o gado com musculatura dupla apresentar
212 menor proporção de gordura, ossos mais finos e à presença de trato digestivo menor,
213 resultando em menor consumo de ração durante o período pós-desmame (ARTHUR, 1995;
214 ALDAI et al., 2006; ALDAI et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2014). Estes mesmos
215 resultados foram encontrados em animais heterozigotos da raça Asturiana de los Valles
216 (MARTÍNEZ et al., 2014), South Devon (WIENER et al., 2002) e em animais da raça
217 Charolês (CASAS et al., 2004). Além disso, Arthur (1995) relatou que a modificação na
218 composição corporal de animais com musculatura dupla não é uniforme em todo o corpo.
219 Existem regiões "altamente hipertrofiadas" e até "hipotrofiadas" quando comparadas com
220 bovinos normais.

221 Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos
222 avaliados para as características relacionadas com deposição de gordura na carcaça
223 (MARM550, EGS550 e EGP550) (Tabela 1). Estes resultados são condizentes com os
224 encontrados por Aldai et al. (2006), que relataram para a raça Asturiana de los Valles

225 cobertura de gordura semelhante para animais heterozigotos e homozigotos normais (4,75
226 mm em ambos os genótipos). Contraditório a estes resultados, Casas et al. (2004) relataram
227 maior cobertura de gordura para animais homozigotos normais (1,10 cm) comparados com
228 heterozigotos (0,82 cm).

229 Para a característica MARM, Casas et al. (2004) relataram diferença expressiva
230 para a raça Charolês, com cerca de 12% menos teor de marmoreio em animais heterozigotos.
231 Esses resultados contraditórios podem ser indicativos de que outros genes estejam atuando
232 nas características de deposição de gordura em animais da raça Charolês, além do gene da
233 miostatina (MARTÍNEZ et al., 2014). Estes resultados mostram que a associação entre o
234 gene da miostatina e as características de carcaça não se limitam apenas à deleção de 11 pb,
235 sendo estas características quantitativas e sofrendo a influência de vários genes (WIENER et
236 al., 2009).

237 Os dados apresentados aqui mostram que a presença do alelo mutado nt821 (del)
238 está associada a níveis reduzidos de gordura em geral (Tabela 1). Embora não tenham sido
239 observadas diferenças estatísticas significativas, os indivíduos heterozigotos apresentaram
240 uma menor espessura de gordura (EGS550 e EGP550). Este fato mostra que o alelo mutado
241 nt821 (del), apresenta efeito recessivo para todas estas características avaliadas, de modo
242 que os heterozigotos (+/del) são mais parecidos com os homozigotos normais (+/+) do que
243 com os homozigotos mutados (del/del) (WIENER et al., 2009).

244 Com relação à característica perímetro escrotal (PE), a presença do alelo mutado
245 nos animais Senepol heterozigotos foi desfavorável, uma vez que, os animais homozigotos
246 normais apresentaram, aproximadamente, 1 cm a mais de PE do que os animais com
247 genótipo heterozigoto (Tabela 1). De acordo com Arthur (1995), PE reduzido está
248 relacionado com baixa fertilidade e comportamento sexual deficiente, especialmente, em
249 touros jovens. Problemas reprodutivos relacionados à musculatura dupla estão muito bem

250 relatados na literatura (FIEMS et al., 2001; SHORT et al., 2002; HOFLACK et al. 2006;
251 KOLKMAN et al., 2007; MAO et al., 2008; FIEMS et al., 2009). Michaux e Hanset (1981),
252 por exemplo, relataram casos de infantilismo genital e atrasos na puberdade (tanto em
253 fêmeas quanto em machos). Estes mesmos autores, observaram também a redução dos
254 testículos, conferindo ao animal baixa quantidade de sêmen, porém sem redução no número
255 de espermatozoides.

256 Para a característica de conformação frigorífica (NCF) não foi observada diferença
257 estatística significativa entre os genótipos avaliados. Para essa mesma característica
258 Martínez et al. (2014) também não encontraram diferenças significativas em animais da
259 raça Asturiana de los Valles. No entanto, Aldai et al. (2006) relataram para animais
260 heterozigotos índice de conformação frigorífica (CF) cerca de 20% maior. Vale ressaltar que
261 esses autores avaliaram a CF diretamente da carcaça, enquanto que neste trabalho esta
262 característica foi avaliada visualmente por meio de escores.

263 Wiener et al. (2009) sugeriram uma possível manutenção do gene da miostatina em
264 populações de bovinos de corte por meio dos animais heterozigotos, ou seja, limitar o
265 número de animais homozigotos para a mutação para evitar alguns dos aspectos negativos
266 mais graves associados a este genótipo. A natureza dos efeitos sobre as diferentes
267 características afetadas pelo gene deve ser considerada, levando em conta se eles atuam de
268 forma aditiva ou se há evidência de dominância.

269

270

Conclusões

271 Em bovinos Senepol, a presença de pelo menos um alelo mutado nt821 está
272 associada a maior área de AOL, menor perímetro escrotal e, apesar de não ter sido
273 observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para as características EGS550 e
274 EGP550, os indivíduos heterozigotos também apresentaram menor porcentagem de gordura.

275 Assim, a identificação precoce de animais que apresentam o fenótipo da hipertrofia
276 muscular torna mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das
277 próximas gerações, facilitando tanto a introdução quanto à eliminação dos alelos de interesse
278 na população.

279

280

Agradecimentos

281 À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do
282 Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo financiamento do projeto de pesquisa e
283 pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Núcleo de Melhoramento da Raça Senepol por ter
284 gentilmente cedido as amostras biológicas e os dados fenotípicos dos animais participantes
285 das Provas de Avaliação de Desempenho a pasto do Senepol (PADS).

286

287

Referências

288 ABCB SENEPOL - Associação Brasileira de Criadores de Bovinos Senepol [2016].

289 **Histórico da Raça.** Disponível em <<http://senepol.org.br/sobre-a-raca/historia-da-raca/>>.

290 Acesso em: 15 abril. 2016.

291 ALDAI, N.; NÁJERA, A. I.; MARTÍNEZ, A.; CELAYA, R.; OSORO, K. Correlation
292 between carcass conformation and fat cover degree, and muscle fatty acid profile of yearling
293 bulls depending on breed and mh-genotype. **Livestock Science**, v.107, n.2, p.199-212, 2007.

294 ALDAI, N.; MURRAY, B. E.; ÓLIVAN, M.; MARTÍNEZ, A.; TROY, D. J.; OSORO, K.;
295 NÁJERA, A. I. The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat
296 physico-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling
297 bulls. **Meat Science**, v.72, n.3, p.486-495, 2006.

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

- 300 CASAS, E.; BENNET, G. L.; SMITH, T. P. L.; CUNDIFF, L. V. Association of myostatin
301 on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. **Journal**
302 **of Animal Science**, v.82, n.10, p.2913-2918, 2004.
- 303 CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; GROBET, L.; LEROY, P. L.;
304 MICHAUX, C.; MNI, M. SCHWERS, A.; VANMANSHOVEN, P.; HANSET, R.;
305 GEORGES, M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine
306 chromosome 2. **Mammalian Genome**, v.6, p.788-790, 1995.
- 307 FIEMS, L. O.; DE BRABANDER, D. L. Optimum growth rate of Belgian Blue double-
308 muscled replacement heifers. **South Afr. J. Anim. Sci.**, v.39 (Suppl. 1), p.6-102, 2009.
- 309 FIEMS, L. O.; DE CAMPENEERE, S.; VAN CAELENBERGH, W.; BOUCQUÉ, C. V.
310 Relationship between dam and calf characteristics with regard to dystocia in Belgian Blue
311 double-muscled cows. **Animal Science**, v.72, p.389-394, 2001.
- 312 GOETZE, M.; PASSAIA, G.; SPERB-LUDWIG, F. Marcadores moleculares baseados em
313 restrição: AFLP e suas variações. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.;
314 ZANELLA, C. M; PASSAIA, G. (Ed). **Marcadores moleculares na era genômica:**
315 **metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017, p.60-
316 76.
- 317 HOFLACK, G.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A.;
318 DUCHATEAU, L. Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian
319 bulls. **Theriogenology**, v.66, p.1834-1846, 2006.
- 320 JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality
321 in fish. **Atlantic**, p.99-115, 1999.
- 322 KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T. P. L.; BASS, J. J. Mutations in myostatin
323 (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7,
324 p.910-915, 1997.

- 325 KOLKMAN, I.; DE VliegHER, S.; HOFLACK, G.; VAN AERT, M.; LAUREYNS, J.;
326 LIPS, D.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G. Protocol of the caesarean section as performed in
327 daily bovine practice in Belgium. **Reprod. Dom. Anim.**, v.42, p.583-589, 2007.
- 328 MAO, W. H.; ALBRECHT, E.; TEUSCHER, F.; YANG, Q.; ZHAO, R. Q.; WEGNER, J.
329 Growth and breed related changes of fetal development in cattle. **Asian Aust. J. Anim. Sci.**,
330 v.21, p.640-647, 2008.
- 331 MARTÍNEZ, A.; ALDAI, N.; CELAYA, R.; OSORO, K. Effect of breed body size and the
332 muscular hypertrophy gene in the production and carcass traits of concentrate-finished
333 yearling bulls. **Journal of Animal Science**, v.88, n.4, p.1229-1239, 2014.
- 334 MENEZES, G. R. O.; SILVA, L. O. C; NOBRE, P. R. C; TORRES Jr, R. A. A. In:
335 **SUMÁRIO DE TOUROS SENEPOL – GENEPLUS | EMBRAPA**. A raça Senepol.
336 Campo Grande, MS: RICA Soluções em agronegócio, p.8-10, 2013.
- 337 MICHAUX, C.; HANSET, R. Sexual Development of Double-muscled and Conventional
338 bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.98, n.1-4, p.29-37, 1981.
- 339 REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia Molecular aplicada à produção**
340 **animal**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.2015, 2001.
- 341 SHORT, R. E.; MACNEIL, M. D.; GROSZ, M. D.; GERRARD, D. E.; GRINGS, E. E.
342 Pleiotropic effects in Hereford, Limousin, and Piedmontese F2 crossbred calves of genes
343 controlling muscularity including the Piedmontese myostatin allele. **Journal of Animal**
344 **Science**, v.80, p.1-11, 2002.
- 345 STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). **User's guide**. SAS Institute, Cary, 2002.
- 346 TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. Frequência do gene miostatina (GDF-8) em
347 rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
348 **Zootecnia**, v.59, n.3, p.805-809, 2007.

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

352 WIENER, P.; WOOLLIAMS, J. A.; FRANK-LAWALE, A.; RYAN, M.; RICHARDSON,
353 R. I.; NUTE, G. R.; WOOD, J. D.; HOMER, D.; WILLIAMS, J. L. The Effects of a
354 Mutation in the Myostatin Gene on Meat and carcass quality. **Meat Science**, v.83, n.1,
355 p.127-134, 2009.

356 WIENER, P.; SMITH, J. A.; LEWIS, A. M.; WOOLLIAMS, J. A.; WILLIAMS, J. L.
357 Muscle-related traits in cattle: the role of the myostatin gene in the South Devon
358 breed. **Genetics Selection Evolution**, v.34, n.2, p.221, 2002.

359

360

361

362

363

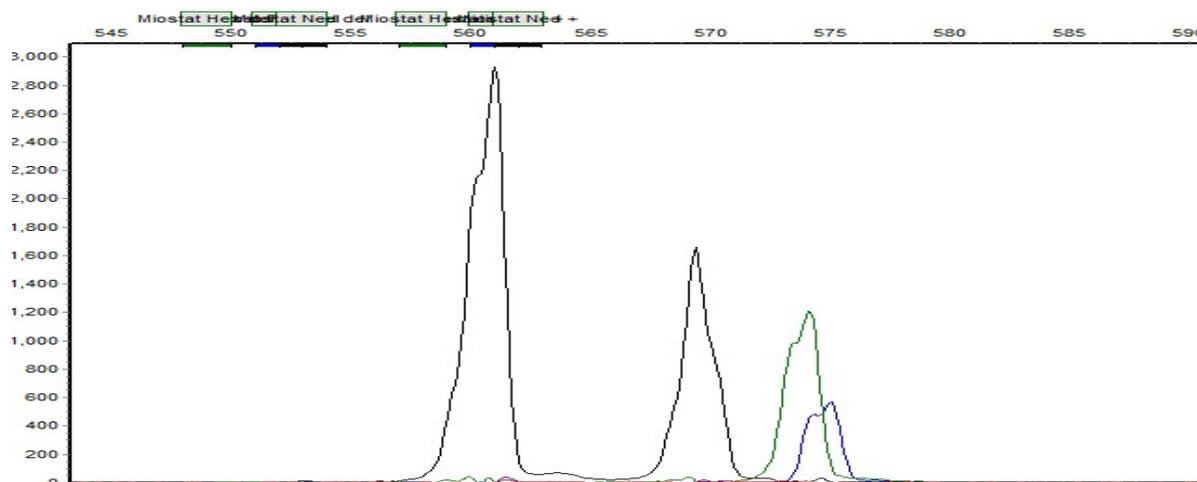
364

365

366

367

368



369
 370 Figura 1. Eletroferograma mostrando três animais genotipados por meio da metodologia de
 371 detecção de fragmentos em sequenciador automático de DNA. Em azul fluorescência FAM
 372 (animal homozigoto del/del), em verde fluorescência HEX (animal homozigoto +/+) e em
 373 amarelo fluorescência NED (animal heterozigoto +/-), que no programa *Gene Marker* é
 374 representado em preto.

375

376

377 Tabela 1. Valores médios e desvio padrão das características fenotípicas avaliadas com
 378 relação à mutação nt821 em animais Senepol.

Característica	Homozigoto	Heterozigoto	P-Value
AOL550 (cm ²)	50,17 ± 0,63	54,22 ± 1,25	0,0026*
MARM550 (escores)	1,50 ± 0,05	1,49 ± 0,09	0,9157
EGS550 (cm)	2,28 ± 0,07	2,01 ± 0,15	0,0791
EGP550 (cm)	2,17 ± 0,24	2,08 ± 0,27	0,5775
PESO330 (Kg)	276,10 ± 2,51	272,24 ± 5,01	0,4682
PESO550 (Kg)	430,22 ± 3,27	419,28 ± 6,52	0,1154
GMD (Kg)	0,729 ± 0,011	0,703 ± 0,022	0,2863
PE550 (cm)	34,37 ± 0,26	33,18 ± 0,52	0,0314*
NCF (escores)	3,21 ± 0,12	3,43 ± 0,23	0,3613

379 AOL550 = área de olho de lombo ajustada para 550 dias em cm²; MARM550 = marmoreio
 380 ajustado para 550 dias avaliado por escores; EGS550 = espessura da gordura subcutânea
 381 ajustada para 550 dias em cm; EGP550 = espessura da gordura na picanha ajustada para 550
 382 dias em cm; PESO330 = peso ajustado para 330 dias em kg; PESO550 = peso ajustado para
 383 550 dias em kg; GMD = ganho médio diário em kg; PE550 = perímetro escrotal ajustado
 384 para 550 dias em cm; NCF = nota de conformação frigorífica atribuída por escores.

385 **CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

386

387 Este estudo apresentou dados referentes à padronização e avaliação de
388 três diferentes metodologias de genotipagem para detecção da deleção de 11
389 pares de bases (nt821) localizada no exon III do gene *GDF-8* em bovinos. Cada
390 uma das três metodologias testadas apresenta vantagens e desvantagens. A
391 escolha de qual delas usar depende, basicamente, da quantidade de DNA
392 disponível para a genotipagem, dos conhecimentos técnicos do investigador, das
393 considerações monetárias e dos equipamentos disponíveis no laboratório.

394 O desenvolvimento de um sistema *poolplexing* para detecção desta
395 deleção foi realizado com o intuito de maximizar o seu uso pelos criadores, pois,
396 além da genotipagem da mutação nt821, este sistema pode ser associado aos
397 testes de paternidade que são rotineiramente realizados por meio de laboratórios
398 credenciados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
399 Estes testes são feitos utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites,
400 os quais também são marcados com fluoróforos e analisados por eletroforese
401 capilar em sequenciamento automático de DNA. Os *primers* marcados foram
402 desenhados com o intuito de gerar fragmentos de aproximadamente 550 pares de
403 bases (pb) e, dessa forma, como os fragmentos analisados no teste de paternidade
404 estão entre 100 e 300 pb não haverá sobreposição de picos nos eletroferogramas.
405 Esta metodologia poderá ser licenciada para laboratórios nacionais credenciados
406 pelo MAPA para a realização dos testes de paternidade, otimizando, assim, a
407 relação custo/benefício.

408 Com base na metodologia de detecção de fragmentos em sequenciador
409 automático, por meio do sistema *poolplexing*, foi genotipado o polimorfismo nt821 e

410 avaliado sua associação com características de interesse econômico em animais
411 da raça Senepol provenientes de Provas de Avaliação de Desempenho a pasto
412 (PADS). Os resultados obtidos podem contribuir para a identificação precoce de
413 animais da raça Senepol que apresentam o fenótipo da hipertrofia muscular,
414 tornando, assim, mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais
415 das próximas gerações, facilitando tanto a introdução quanto à eliminação dos
416 alelos de interesse na população.

417