

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**TESE**

**Utilização de Marcadores Moleculares na Análise da  
Característica de Qualidade da Carne em Caprino (*Capra hircus*)**

**Odair Scatolin Rossafa Garcia**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Utilização de marcadores moleculares na análise da característica de  
qualidade da carne em caprino (*Capra hircus*)**

**ODAIR SCATOLIN ROSSAFA GARCIA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Maria Amélia Menck Soares**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Zootecnia**, no Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, Área de  
Concentração Produção Animal

Seropédica-RJ  
Abril- 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G216u Garcia, Odair Scatolin Rossafa , 1988-  
Utilização de marcadores moleculares na análise da  
característica de qualidade da carne em caprino (Capra  
hircus) / Odair Scatolin Rossafa Garcia. - 2017.  
74 f.: il.

Orientadora: Maria Amélia Menck Soares.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

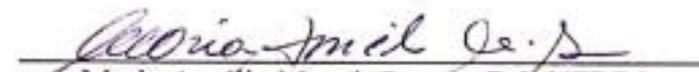
1. Caprino - Teses . 2. Carne caprina. 3. Caprino -  
músculo Teses . 4. PCR em Tempo Real. 5. Melhoramento  
Animal. I. Soares, Maria Amélia Menck , 1963-  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Pós-Graduação em Zootecnia III. Título.

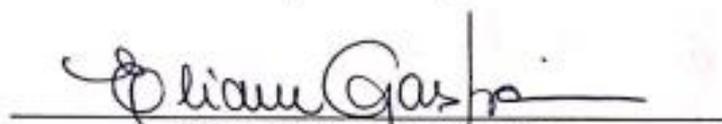
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ODAIR SCATOLIN ROSSAFA GARCIA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Concentração em Produção Animal.

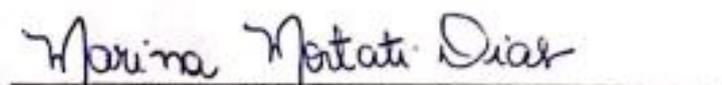
**TESE APROVADA EM 26/05/2017**

  
\_\_\_\_\_  
Maria Amélia Menck Soares. Dr. UFRRJ  
(Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Eliane Gaspariño. Dr. UEM

  
\_\_\_\_\_  
Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. EMBRAPA

  
\_\_\_\_\_  
Jorge Luiz Azevedo de Armada. Dr. UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
Marina Mortati Dias. Dr. UFRRJ

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

*(Theodore Roosevelt)*

*Dedico este estudo aos meus pais,  
Odair Visintin Rossafa Garcia e  
Vilma Scatolin Rossafa Garcia.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças em todos os momentos de minha caminhada em busca dos meus objetivos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) por me proporcionarem toda estrutura necessário para a concretização desse trabalho.

À orientadora, Professora Dra. Maria Amélia Menck Soares, por me transmitir todo o conhecimento necessário, e acima de tudo pelo companheirismo, pela cumplicidade para passar por essa difícil fase de nossas vidas “Serotexas”.

À Professora Dr. Eliane Gasparino pelo auxílio nas interpretações e análises dos resultados e ao pesquisador Dr. Jean Araujo pelos ensinamentos e trocas de experiências e parcerias realizadas, ajudando a construir e concretizar esse meu sonho.

Ao Professor Ph.D. Marcelo Teixeira Rodrigues, ao Doutorando Leonardo Ferreira e a Doutora Adriana Bagatoli pela ajuda e importante participação para a concretização desse projeto, bem como do incentivo e conhecimentos transmitidos.

Ao ex-coordenador Carlos Augusto Brandão de Carvalho e o atual coordenador da Pós Graduação Vinícius Pimentel Silva por se dedicarem em tempo integral e de forma memorável a essa instituição de ensino.

A toda equipe de trabalho, ao nosso grupo de pesquisa GEPGAD que proporcionou bons momentos de estudos e reflexões.

Aos meus pais, Odair e Vilma, que mesmo distantes sempre estiveram do meu lado e são os grandes responsáveis por esta conquista, e pela compreensão nos momentos de dificuldades durante este percurso. Aos meus irmãos, Bruno e Mariana, por aguentarem meus estresses e estarem sempre comigo partilhando cada um desses momentos difíceis.

A minha noiva Jane por estar comigo em todos os momentos de alegrias e de tristezas “te amo”.

Aos amigos que colaboraram para o desenvolvimento desta etapa tão importante na minha vida Gabriel Anastácio, Iure, Vitor, Ana, Geuzimar, Sergio Sho e Layzza entre outros. Em especial, ao Professor Marco Mello, ao nosso técnico e amigo Francisco pelo companheirismo e parcerias na realização deste sonho.

Aos meus amigos de hoje e sempre que fizeram parte da minha vida, meus amigos de Santa Fé do Sul e Cascavel (José Eduardo, Jean, Breno, Tauan, Guilherme, Netão, Sergio, Magrão, Wilson), que me motivaram a continuar em busca desta conquista, a todos os outros que fizeram parte da minha vida, direta ou indiretamente, por me fazerem continuar e não desistir mesmo com todas as dificuldades. Agradeço pelas risadas, por todos os momentos juntos e principalmente pela amizade verdadeira.

Agradeço a todos os professores e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal e pelo incentivo a buscar mais conhecimentos.

Aos meus colegas.

E a todos que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

## RESUMO

GARCIA, Odair Scatolin Rossafa Garcia. **Utilização de marcadores moleculares na análise da característica de qualidade da carne em caprino (*Capra hircus*)** 2017. 72p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Departamento de Genética, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A carne caprina apresenta teores de gordura abaixo dos encontrados em outros tipos de carne como a de bovino, suíno, ovino e veado. Entretanto, a falta de critério de seleção para o abate, estocagem e comercialização da carne, acaba por gerar um baixo nível de consumo, devido à falta de padronização do produto apresentando características sensoriais desagradáveis. Estudo de polimorfismo, variação na expressão gênica e associação destas variações com o fenótipo desejado permite ampliar a compreensão sobre os processos fisiológicos, além de auxiliar programas de melhoramento genético animal para a seleção de animais com fenótipos superiores para a característica de interesse. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos e expressão gênica com a característica peso ao abate e verificar se há relação entre a diferença de peso e a maciez da carne. Para este propósito foram identificados inicialmente os genótipos de cabritos das raças Saanen e Alpina para os seguintes genes: hormônio do crescimento (*GH*), diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGATI*), miostatina (*MSTN*), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1*), proteína transportadora de ácidos graxos (*FATP1*), fator nuclear 1 (*NF1*), receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (*PPAR $\gamma$* ). Após a análise de associação dos diferentes genótipos com o peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e maciez da carne expressa em força de cisalhamento (FC), foram selecionados alguns genes para a análises de expressão e associação com as mesmas variáveis. Os genes *GH*, *NF1* e *PPAR* não foram avaliados quanto a expressão, o primeiro por não ter apresentado um bom resultado para as análise de eficiência dos *primers* os outros dois devido à problemas no genoma referência para a confecção dos *primers*. Para o teste de maciez foi utilizado o músculo *longissimus lumborum*. Para a genotipagem foi utilizada a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e posteriormente, para alguns genes, digestão dos fragmentos amplificados por enzimas de restrição (PCR-RFLP). A expressão gênica foi conduzida utilizando a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) e o fenótipo de maciez da carne foi analisado em texturômetro. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o procedimento GLM do SAS. O procedimento UNIVARIATE foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com  $2^{-\Delta C_t}$ ) e dados de maciez. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e as correlações de Pearson testadas pelo teste de t. O polimorfismo já descrito no *GH* foi também detectado na população estudada no presente trabalho, o genótipo heterozigoto AB apresentou média 2,78kg a mais de peso ao abate do que os indivíduos AA, para a *MSTN* os indivíduos com genótipo heterozigoto M1M2 apresentaram maiores escores para peso ao abate, enquanto para o gene *IGF1* os animais heterozigotos AB apresentam carne menos macia. O grupo com menor peso ao abate apresentou maior expressão dos genes *DGATI* e *FATP*, o que pode refletir maior deposição de gordura de gordura na carcaça e maior maciez, em comparação com o grupo de maior peso.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cabra, Desenvolvimento muscular, Marcador molecular, PCR em tempo real.

## ABSTRACT

GARCIA, Odair Scatolin Rossafa Garcia. **Use of molecular markers in the analysis of the meat quality characteristic in goats (*Capra hircus*)** 2017. 65 p. Thesis (PhD in Animal Science). Institute of Animal Science, Department of Genetics, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Goat meat has lower levels of fat than those found in other types of meat such as beef, pork, sheep and deer, but the lack of selection criteria for slaughter, storage and commercialization of meat leads to a low level because of the lack of standardization of the product presenting unpleasant sensory characteristics. A study of polymorphism, variation in gene expression and the association of these variations with the desired phenotype allows to broaden the understanding of the physiological processes, which helps in the strategies aimed at improving the characteristic of interest, resulting in the expected final phenotype. The objective of the present study was to evaluate polymorphisms and gene expression among some of the most promising genotypes of pleiotropic genes, comparing the polymorphism and expression among groups of animals with greater and lesser weight at slaughter to verify if there is any relation with the weight difference Or softness of the flesh. For this purpose, genotypes of 40 goats from the Saanen and Alpina breeds for the growth hormone (GH) gene, diacylglycerol acyltransferase 1 gene (DGAT1), myostatin gene (MSTN), growth factor gene Similar to insulin 1 (IGF1), fatty acid carrier protein (FATP1) gene, nuclear factor 1 (NF1) gene, gamma peroxisome proliferator activated receptor (PPAR $\gamma$ ) gene. After analyzing the association of the different genotypes with the slaughter weight (AP), carcass weight (PC) and meat softness expressed in shear force (FC), some genes were selected for the analysis of expression and association with them Variables. The GH, NF1 and PPAR genes were not evaluated for expression, the first for not having presented a good result for the efficiency analysis of the other two primers due to the lack of substantial data for the preparation of the primers. For the softness test, previously performed in another study by the same team, the longissimus lumborum muscle was used. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used for the genotyping and later, for some genes, the digestion of the fragments amplified by restriction enzymes, a technique known as PCR-RFLP. Gene expression was conducted using the Real Time PCR technique (qPCR) and the meat tenderness phenotype was analyzed in a texturometer. The data were statistically related using the SAS GLM procedure. The UNIVARIATE procedure was used to verify the normality of residues of expression of the genes under study (expressed as  $2^{-\Delta Ct}$ ) and softness data. The averages were compared by the Tukey test and the Pearson correlations tested by the t test. The polymorphism already described in the GH was also detected in the population studied in the present study, the genotype heterozygous AB presented a mean 2.78kg at slaughter weight more than the AA individuals, for the MSTN the individuals with heterozygous M1M2 genotype presented higher scores for weight at slaughter, while for the IGF1 gene the heterozygous AB animals present less tender meat. The group with lower weight at slaughter showed higher expression of the DGAT1 and FATP genes, which may reflect a higher deposition of fat in the carcass and greater softness, in comparison with the group of higher weight.

**KEYWORDS:** Goat, Muscle development, Molecular marker, Real-time PCR.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIMBOLOS

cDNA - DNA complementar;

Ct - ciclo limiar;

CTAB - Brometo hexadeciltrimetilamônio (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*);

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*);

FATP - proteína transportadora de ácidos graxos;

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

GH - hormônio do crescimento;

GH – Hormônio do crescimento (*Growth Hormone*);

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*);

*IGF-1*- Gene que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina 1;

IGF-1R - Receptor do tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina;

kb – kilobase;

kDa – KiloDalton;

mRNA - RNA mensageiro;

NF1-C2 - Fator nuclear 1 C2 (*Nuclear factor 1 C2*);

PCR - reação em cadeia da DNA polimerase;

PCR-RFLP - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos: hormônio do crescimento ( <i>GH</i> ), diacilglicerol aciltransferase 1 ( <i>DGAT1</i> ), miostatina ( <i>MSTN</i> ), fator de crescimento semelhante à insulina 1 ( <i>IGF1</i> ), fator nuclear 1 C2 ( <i>NFI</i> ), receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos gama ( <i>PPAR<math>\gamma</math></i> ) e proteína transportadora de ácidos graxos ( <i>FATP</i> );.....	14
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos primers utilizados para amplificar fragmentos do gene diacilglicerol aciltransferase 1 ( <i>DGAT1</i> ), gene da miostatina ( <i>MSTN</i> ), gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1 ( <i>IGF1</i> ), gene da proteína transportadora de ácidos graxos ( <i>FATP</i> ); gene do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> ), gene do hidroximetilbilano sintase ( <i>HMBS</i> )......	17
<b>Tabela 3.</b> Frequências genótípicas e alélicas do <i>FATP</i> . .....	29
<b>Tabela 4.</b> Associação das características avaliadas de peso ao abate ( <i>PA</i> ), peso da carcaça ( <i>PC</i> ) e força de cisalhamento ( <i>FC</i> ) em função dos genótipos dos genes <i>GH</i> , <i>IGF-1</i> , <i>DGAT</i> , <i>MSTN</i> , <i>FATP</i> , <i>NFI</i> e <i>PPAR</i> ......	33
<b>Tabela 5.</b> Associação das características avaliadas de peso ao abate ( <i>PA</i> ), peso da carcaça ( <i>PC</i> ) e força de cisalhamento ( <i>FC</i> ) em função dos genótipos combinados dos genes <i>MSTN/PPAR<math>\gamma</math></i> , <i>GH/NFI</i> , <i>DGAT1/PPAR<math>\gamma</math></i> , <i>GH/DGAT1</i> , <i>GH/PPAR<math>\gamma</math></i> e <i>GH/MSTN</i> ......	34
<b>Tabela 6.</b> Correlação entre as características de peso ao abate ( <i>PA</i> ) x peso da carcaça ( <i>PC</i> ), peso ao abate ( <i>PA</i> ) x força de cisalhamento ( <i>FC</i> ) e peso da carcaça ( <i>PC</i> ) x força de cisalhamento ( <i>FC</i> ) em relação aos genótipos para os genes <i>PPAR</i> , <i>NFI</i> , <i>MSTN</i> , <i>GH</i> e <i>DGAT</i> . .....	36
<b>Tabela 7.</b> Valores obtidos através dos testes de eficiência para os genes <i>EEF1</i> , <i>HMBS</i> , <i>GAPDH</i> e <i>FATP1</i> . .....	40
<b>Tabela 8.</b> Resultado das análises obtidas por intermédio do software <i>Delta Ct</i> , <i>BestKeeper</i> , <i>NormFinder</i> , <i>GeNorm</i> e ao final Ranking gerado pelo programa <i>RefFinder</i> com base na correlação dos 4 algoritmos.....	43
<b>Tabela 9.</b> Médias, desvio padrão e P valor para as características de peso ao abate ( <i>PA</i> ), peso da carcaça ( <i>PC</i> ) e força de cisalhamento da carne ( <i>FC</i> ) dentro nos dois grupos com maior e menor peso.....	45
<b>Tabela 10.</b> Médias, desvio padrão e P valor para a expressão dos genes dentro de dois grupos com maior e menor peso.....	46
<b>Tabela 11.</b> Correlação de Pearson entre as características de peso ao abate ( <i>PA</i> ), peso da carcaça ( <i>PC</i> ) e força de cisalhamento ( <i>FC</i> ) com a expressão dos genes <i>FATP</i> , <i>MSTN</i> , <i>DGAT</i> e <i>IGF</i> . .....	47

<b>Tabela 12.</b> Médias, desvio padrão e P valor para a expressão do gene <i>MSTN</i> dentro grupos de genótipos M1M1, M1M2 e M2M2. ....	48
---	----

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 5% de produtos de digestão pela enzima *HaeIII* do gGH. Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Amresco®). Canaleta 2 = fragmento de 422 pb, produto de PCR sem digestão, canaletas 3, 4 e 7 = genótipos heterozigotos AB (fragmentos de 422, 366 e 56 pb), canaleta 5 e 6 = genótipo homozigoto AA (fragmentos de 366 e 56 pb). .....20
- Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, produtos de corrida longa por 16 horas a 160 volts referente aos amplicons do gene *DGATI* com 777pb. Canaleta 1 = marcador de 100 pb (New England Biolabs). Canaleta 2 = fragmentos baixo correspondente ao genótipo homozigoto 1/1, canaletas 3 e 5 = fragmento alto correspondente ao genótipo homozigoto 2/2, canaleta 4 = genótipo heterozigotos contendo os fragmentos alto e baixo 1/2. ....22
- Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, a 160 volts por 16 horas referente aos amplicons do gene *MSTN* com aproximadamente 380pb. Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Canaleta 2, 6, 8 e 10 = fragmento baixo, genótipo homozigoto M1M1, canaletas 4 e 11 = fragmento alto, genótipo homozigoto M2M2, canaletas 3, 5, 7, e 9 = genótipo heterozigotos, fragmentos alto e baixo (M1M2). .....23
- Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, produto de digestão pela enzima *HaeIII* dos fragmentos amplificados com o primer *IGF-1*. Canaleta 1 = Marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia), canaleta 2 = produto da PCR sem digestão apresentando (SD) 363pb; canaletas 3, 5, 6, 7, 8, 10 e 11 = animais homozigoto BB apresentando os fragmentos de 264 e 99 pb, frutos da digestão pela enzima *HaeIII*, canaletas 4 e 9 = animais heterozigotos apresentando o fragmento de 363 pb referente ao alelo A e os fragmentos de 264 e 99 pb referente ao alelo B; .....25
- Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, produtos de digestão pela enzima *BstNI* do fragmento amplificado com o primer *NFI-C2*. Canaleta 1 = marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotecnologia), canaleta 2: produto da PCR sem digestão (SD); Canaletas 3,7 e 8 = amostras de animais homozigotos AA apresentando banda de 233pb, canaleta 6 = amostra de animal homozigoto GG apresentando 2 fragmentos: 186 e 47pb; Canaletas 4, 5, 9 e 10 = amostras de animais heterozigotos (AG) apresentando os três fragmentos. ....27
- Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, a 160 volts por 16 horas, referente aos amplicons do gene *FATP* com aproximadamente 850pb que variaram em tamanho, com 4 variantes A, B, C e D. Canaleta 1 = marcador de 100 pb (New England Biolabs). Canaleta 2 e 4 = genótipo BB, canaletas 3, 6, 8 e 9 = genótipo AC, canaleta 5 = genótipo BC e canaleta 7 = genótipo AD.....28

<b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, 160 volts por 16 horas, referente aos amplicons do gene PPAR $\gamma$ . Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Canaletas 2, 4, 6 e 7 = genótipo homocigoto AA, canaletas 3 e 8 = genótipos heterocigotos AB, canaleta 5 = genótipo homocigoto BB. ....	30
<b>Figura 8.</b> Análise de RNA por eletroforese em gel de agarose 0,5%. Canaletas 1-8 amostras de músculo de diferentes animais. 28S, 18S e 5S = subunidades ribossomais. ....	37
<b>Figura 9.</b> Imagem da curva de eficiência do primer DGAT1(1). ....	38
<b>Figura 10.</b> Curva de eficiência do gene da miostatina amplificado com o primer MSTN(1). ....	39
<b>Figura 11.</b> Curva de eficiência do gene que codifica o IGF1 amplificado com o primer IGF1(1). ....	40
<b>Figura 12.</b> Curvas de dissociação (melting) obtida após a reação de qPCR, referente ao controle endógeno EEF1 e referente a dissociação do gene alvo MSTN. ....	41
<b>Figura 13.</b> A = curvas de dissociação observadas após a reação de RT-PCR. C1, C2 e C3 apresentam 3 curvas diferentes. B = eletroforese em gel de poliacrilamida 10% resultado da amplificação do fragmento com 102 pb do DGAT. ....	42
<b>Figura 14.</b> Rankings dos genes de referência analisados pelo algoritmo Delta Ct, BestKeeper, NormFinder e GeNorm para os genes EEF1, HMBS e GAPDH. ....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.1 Qualidade de Carne.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Idade ao Abate .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Gene Candidato .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Hormônio do Crescimento (GH).....</b>	<b>5</b>
<b>2.5 O Gene da Diacilglicerol aciltransferase-1 (DGATI) .....</b>	<b>6</b>
<b>2.6 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1 (IGFI).....</b>	<b>7</b>
<b>2.7 Proteína Transportadora de Ácidos Graxos (FATP1).....</b>	<b>8</b>
<b>2.8 Receptor Nuclear Ativado por Proliferadores de Peroxissomos Gama (PPAR<math>\gamma</math>) .....</b>	<b>9</b>
<b>2.9 O Fator de Transcrição Nuclear 1 (NF1) .....</b>	<b>10</b>
<b>2.10 Miostatina (MSTN).....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Composição da Amostra .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Avaliação de Polimorfismo de DNA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1. Amplificação dos Fragmentos de Interesse.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Estudo de expressão Gênica .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1 Extração de RNA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Síntese de cDNA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.3 Confeção dos <i>primers</i> para análise de expressão gênica.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.4 qPCR.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.5 Teste de eficiência .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.6 Estabilidade de expressão dos genes de referência.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Análise Estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Análise de polimorfismo.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.1 Gene do hormônio do crescimento (GH).....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.2 Gene diacilglicerol aciltransferase 1 (DGATI).....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.3 Gene da Miostatina (MSTN).....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.4 Gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) .....</b>	<b>24</b>

4.1.5 Gene do fator nuclear 1 C2 ( <i>NF1-C2</i> ).....	26
4.1.6 Proteína transportadora de ácidos graxos (FATP);.....	28
4.1.7 Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR $\gamma$ ). .....	29
4.2 Associação dos Genótipos com as Características de Peso ao Abate (PA), Peso da Carcaça (PC) e Força de Cisalhamento (FC).....	30
4.3 Expressão gênica.....	37
4.3.1 Qualidade do RNA .....	37
4.3.2 Teste de eficiência dos <i>primers</i> .....	37
4.3.3 Curva de Melting do <i>DGAT</i> .....	41
4.3.4 Genes de referência .....	43
4.3.5 Composição das análises de expressão .....	44
5 CONCLUSÕES.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento tradicionais priorizaram a seleção de animais com maior ganho de peso, eficiência alimentar e para algumas espécies outras características como: fêmeas com maior número de prole ou maior produção de leite. Entretanto, enquanto algumas características de produção ou de reprodução atingem o seu melhor patamar, outras podem estar sofrendo uma seleção inversa, um exemplo é com relação a produção e características de qualidade da carne em suínos. Segundo Sellier (1994), enquanto algumas características de produção estavam em foco, a carne de suíno tornou-se mais clara, menos macia, menos succulenta, com um menor teor de marmoreio e maior perda de água, resultando numa menor aceitação pelo mercado consumidor.

A genética molecular é atualmente utilizada como uma ferramenta do melhoramento genético animal tradicional, sendo empregada para auxiliar a seleção dos animais. Com isso, a aplicação da genética molecular para o melhoramento animal depende da capacidade de genotipar indivíduos para *loci* genéticos específicos. Para estes propósitos, três tipos de *loci* genéticos polimórficos observáveis podem ser distinguidos, por exemplo, os marcadores diretos (*loci* que codificam a mutação funcional), marcadores de LD (*loci* que estão em desequilíbrio de ligação populacional com a mutação funcional) e marcadores LE (*loci* que estão em equilíbrio de ligação populacional com a mutação funcional) (DEKKERS, 2004). Segundo o mesmo autor, os marcadores diretos são preferidos para a implementação efetiva da seleção assistida por marcadores (MAS) devido a facilidade de aplicação, seguido por marcadores em desequilíbrio de ligação e marcadores em equilíbrio de ligação.

Assim, neste trabalho foram avaliados marcadores diretos, mas que não são necessariamente utilizados como marcadores para ganho de peso ou maciez da carne. Alguns genes, tradicionalmente utilizados como marcadores no programa de melhoramento leiteiro, como o gene que codifica a diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGAT1*), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1*), proteína transportadora de ácidos graxos (*FATP*), fator nuclear 1 C2 (*NF1-C2*) e receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (*PPAR $\gamma$* ), podem ter alguma correlação genética negativa para outra característica ligada a produção de carne. De maneira inversa, é importante verificar se genes candidatos a serem utilizados como marcadores moleculares em programas de melhoramento de animais para corte, como o hormônio do crescimento (*GH*) e a miostatina (*MSTN*), podem ter alguma associação com a produção de leite, com a reprodução ou mesmo com a resistência a doenças. Uma avaliação mais ampla da associação dos genes com as características é necessária, devido a ação pleiotrópica dos genes, os quais estão envolvidos em várias vias metabólicas, como os genes avaliados neste trabalho.

Outra consideração importante, é que no Brasil, a maioria dos criatórios de caprino comercializam o leite e a carne do mesmo rebanho. Desta maneira, os marcadores moleculares precisam de avaliações mais amplas para poder extrair o melhor de cada rebanho sem prejudicar outras características interessantes. Em bovino, algumas raças também são consideradas de dupla aptidão.

Deste modo, nesta busca por marcadores moleculares, é interessante entender quais variações com base no DNA influenciam a expressão gênica. Para este entendimento é necessário, além dos estudos de polimorfismo, estudos de expressão gênica nesta busca, cujo interesse principal é disponibilizar marcadores com base no DNA, pois a detecção de polimorfismo baseado em DNA é uma técnica de uso mais comum e pode ser disponibilizado

aos produtores que praticam a seleção de maneira mais sistematizada a um custo menor, possibilitando a genotipagem de um grande número de animais.

#### Objetivos Gerais

Buscar marcadores moleculares que possam auxiliar a seleção de animais para maior ganho de peso, sem prejudicar a maciez da carne.

#### Objetivos Específicos

Identificar o genótipo de cabritos para os genes: hormônio do crescimento (*GH*), diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGATI*), miostatina (*MSTN*), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGFI*) e proteína transportadora de ácidos graxos (*FATP*), fator nuclear 1 C2 (*NFI-C2*) e receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (*PPAR $\gamma$* ).

Avaliar se animais com maior e menor peso ao abate apresentam genótipos “preferenciais” para os genes mencionados anteriormente e se apresentam alguma associação com a maciez da carne.

Quantificar a expressão gênica quando houver diferença significativa entre os genótipos e o peso ao abate ou com a maciez.

Investigar as correlações entre peso ao abate e as demais variáveis em análise.

Buscar por um gene de referência para estudos de expressão gênica em músculo de caprinos em fase crescimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Qualidade de Carne

A indústria da carne vem sofrendo vários avanços no processo de produção em busca de melhorias que atendam ao mercado consumidor. Dentre essas melhorias, as mais citadas são as características qualitativas da carne como sabor, maciez, suculência, cor e odor da carne. Existem testes para avaliar as características qualitativas da carne, esses podem ser subjetivos, através de painéis de provadores, e objetivos, através de instrumentos de precisão. O primeiro método é criticado por alguns autores devido à dificuldade de replicação dos dados e o segundo é considerado como mais preciso e de fácil replicação, porém não há até o momento instrumentos capazes de analisar os parâmetros como sabor e odor característico, sendo necessário a análise sensorial.

A maciez é considerada o fator mais importante no momento do consumo da carne sendo destacada como a característica de qualidade da carne mais importante seguida do sabor e suculência (SAVELL e SHANCKELFOD 1992). Segundo Koohmaraie et al. (2004) os preços dos cortes cárneos estão intimamente relacionados com a maciez que o mesmo apresenta. Wheeler et al. (1997), concluíram que a força de cisalhamento exercida pelo equipamento Warner-Bratzler para cortar amostras de carne é o método direto, para prever a maciez da carne, considerado mais preciso quando comparados com outros métodos indiretos como painel de provadores.

Em relação ao teor de gordura Killinger et al. (2004) relata que a maioria dos consumidores, tem preferência por comprar carnes com menor teor de gordura e optam por cortes com menor grau de marmorização, em especial as mulheres. Belew et al. (2003) afirmam que a variação da marmorização, gordura entremeada às fibras musculares, contribui para variação da maciez.

A análise de perda por cocção e capacidade de retenção de água podem ser avaliadas através de testes sensoriais em que é feita a análise de suculência, e instrumentais com a utilização de balança de precisão. Para avaliação instrumental, segundo Sañudo e Campos (2008), é feita a pesagem da carne crua e então a carne é cozida em grill a aproximadamente 200 °C até alcançar a temperatura interna de 70 °C, após o cozimento foi realizada novamente a pesagem da carne cozida e subtraído o valor do peso da carne crua e a diferença equivale a perda por cocção. Por isso, é de suma importância conhecer os fatores que estão envolvidos no processo de marmorização da carne em buscar de atender as diferentes demandas do mercado consumidor.

Em todas as metodologias anteriormente citadas para análise da característica de qualidade da carne, como maciez e suculência, há a necessidade de realizar o abate do animal, perdendo assim a oportunidade de preservar os animais com a característica desejada, os quais poderiam ser utilizados como reprodutores. A genética molecular é uma ferramenta que permite prever o potencial genético do animal para as características de interesse comercial, através da seleção assistida por marcadores ou genes candidatos. A implementação bem sucedida de um programa de seleção assistida por marcadores (MAS), requer uma abordagem integrada e abrangente que está estreitamente alinhada com os objetivos do mercado consumidor (Dekkers, 2004).

## 2.2 Idade ao Abate

A idade ao abate é um importante parâmetro a ser levado em consideração na hora da escolha dos animais a serem comercializados. Segundo Silveira et al. (2000) a escolha de animais jovens com adequada cobertura de gordura é um fator fundamental na determinação da qualidade final da carne. A natureza e a extensão das ligações entre as moléculas de colágeno aumentam com a idade prejudicando a maciez da carne (BAILEY, 1985). Dhanda et al. (2003) em trabalho realizado com caprino, relatam que com o aumento da idade e do peso corporal aumenta-se também o número de ligações químicas termorresistentes entre as moléculas do colágeno e conseqüentemente ocorre a diminuição na maciez da carne.

Silveira (2000), analisando bovinos, afirma que animais mais jovens tendem a ter uma carne mais macia, e a maciez tende a diminuir com aumento da idade e conseqüentemente o aumento e a manutenção de tecido conjuntivo. O mesmo autor afirma que a suculência e o sabor da carne tende a aumentar com o avanço da idade devido ao aumento da inserção de gordura intramuscular ou marmorização, que também está associada com o grau de terminação e principalmente com o genótipo do animal.

A maior parte da constituição da gordura em caprinos está depositada na cavidade abdominal, essa constitui o principal depósito de gordura, sendo que de 50 a 60% da gordura total desaparece da carcaça quando ocorre o processo de evisceração. Foi observado por Simela et al. (1999) que o aumento da maturidade dos animais resulta no aumento da proporção de gordura. Madruga et al. (2002) avaliaram oito características sensoriais de qualidade da carne em caprinos como aparência, aroma de "caprino", aroma de carne assada, sabor, suculência, maciez, textura e qualidade total, em animais com incremento de idade 45 entre cada lote abatido (de 175, 220, 265 e 310 dias), os atributos aparência, suculência, maciez e qualidade total do produto receberam maior pontuação nos animais jovens, com subseqüente diminuição em relação ao aumento da idade.

## 2.3 Gene Candidato

Nas últimas décadas muitos estudos foram conduzidos com a finalidade de encontrar genes individuais ou genes com substancial efeito sobre as características de importância econômica. A estratégia do uso de genes candidatos foi proposta para dirigir a busca por *loci* de característica quantitativa (QTL). Um gene candidato é um gene cujo efeito sabe-se que esteja relacionado ao sistema biológico ao qual pode afetar a característica biológica de interesse. Segundo Supakorn (2009), os genes candidatos podem ser separados em 6 categorias econômicas, como características de crescimento, reprodutivo, carne, leite, lã e resistência a doenças.

Genes candidatos podem ter funções estruturais ou regulatórias e podem ter um efeito diretamente sobre expressão de determinada característica de interesse. A eleição do gene candidato é feita baseada na hipótese de que o gene analisado seja responsável pela maior porção da variância do QTL, conhecido como gene de efeito maior (SOLLER, 1998). É importante frisar que a maioria das características de interesse zootécnico apresentam padrão de herança poligênicos, em que vários genes são responsáveis pelo somatório da característica, e sofrem forte influência do ambiente (COUTINHO e ROSÁRIO, 2010). Segundo Mackay, (2001) além dos efeitos do meio ambiente, os QTLs também podem sofrer influência do sexo, de pleiotropia (um gene exerce efeito em várias características fenotípicas) e epistasia (um alelo de um gene inibe a ação dos alelos de outro gene).

As vantagens da utilização da metodologia de genes candidatos segundo Rothschild e Soller (1999), se dá devido ao baixo custo, simplicidade operacional, ampla aplicabilidade, alto poder estatístico e conveniente aplicação à seleção assistida por marcadores (MAS). Os marcadores moleculares segundo Regitano e Coutinho (2001), são ferramentas genéticas que permite identificar o potencial genético de um animal antes do mesmo expressar o fenótipo.

Curi (2004) relata que os marcadores moleculares podem ser classificados como marcadores diretos e marcadores indiretos. No primeiro tipo polimorfismos no gene candidato influência diretamente a característica de interesse, seja pela função da própria proteína ou pela sua atuação como intermediário, no segundo tipo os polimorfismos analisados estão apenas relacionados com os QTLs, como por exemplo os marcadores de microssatélites.

O mecanismo global que estabelece a diferenciação da qualidade da carne entre diferentes raças e mesmo entre indivíduos da mesma raça, ainda não foi compreendida. Entretanto, com o rápido avanço da bioquímica e da biologia molecular, alguns mecanismos começam a ser desvendados. Neste sentido, com a presente proposta serão investigados alguns genes candidatos, cuja relação de cada um deles com a característica de interesse no que se refere aos caprinos, será brevemente discutida a seguir:

## **2.4 Hormônio do Crescimento (GH)**

O hormônio do crescimento (GH) é um peptídeo hormonal de 22 kDa, de cadeia simples com aproximadamente 190 aminoácidos produzido na pituitária anterior e estimula o crescimento de vertebrados, necessário para o crescimento pós-natal e metabolismo em vertebrados (STROBL e THOMAS, 1994). O gene do hormônio do crescimento (*GH*) de caprino consiste de cinco exons e quatro introns (KIOKA et al., 1989). A região promotora do gene apresenta homologia de 98% com a de bovino e 90% com a de suíno.

O GH pode ter funções anabólicas (controle no direcionamento dos nutrientes nos processos de crescimento e lactação) e catabólicas (lipolíticas e diabetogênicas), atuando também no metabolismo de minerais e aumentando a regeneração tecidual (GLUCKMAN; BREIER e DAVIS, 1987). A função catabólica e anabólica do GH têm efeitos sobre carboidratos, proteínas e lipídeos. Com respeito ao efeito anabólico das proteínas, o GH estimula diretamente a incorporação de aminoácidos ao músculo esquelético em crescimento.

Muitas publicações têm relatado que polimorfismo neste gene tem sido identificado em regiões regulatórias, regiões não traduzidas e regiões de éxon. Entretanto, poucos destes sítios polimórficos foram precisamente caracterizados quanto a mudanças de nucleotídeos ou mudanças no aminoácido (KIOKA et al., 1989; MISSOHOU et al., 2006). Sítios polimórficos do *GH* em caprinos foram relatados nos éxons e podem estar associados com peso ao nascimento e peso a desmama (MISSOHOU et al., 2006). Os autores verificaram que 5 substituições de nucleotídeos no *GH* influenciaram o peso ao nascer e peso a desmama.

Hua et al. (2009) avaliaram a região do éxon 2 e 3 do *GH* em caprinos com aptidão para produção de carne e constatou que animais heterozigotos AB apresentaram 2 quilos ao desmame e cerca 1,4 cm a mais de altura no perímetro torácico ao nascimento que os animais homozigotos AA ( $P < 0,05$ ), o genótipo homozigoto BB não foi encontrado no rebanho analisado. Com base no trabalho destes autores, testamos a hipótese de que este polimorfismo no *GH* está associado a diferenças de peso ao abate dentro da espécie caprina em animais sobre a mesma idade e o mesmo tipo de tratamento, o que poderia auxiliar na seleção de animais precoces que atenda às exigências de qualidade da carcaça, pois nenhuma literatura com estes propósitos foi encontrada.

## 2.5 O Gene da Diacilglicerol aciltransferase-1 (*DGATI*)

A acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase1 (*DGATI*), é uma das enzimas microsômicas que desempenha um papel central na biossíntese de triacilgliceróis celulares, utilizando diacilglicerol (DAG) e gordura acil-CoAs como seus substratos. Em humanos, o gene *DGATI* compreende 17 éxons e está localizada no cromossomo 8. Esta enzima é formada por 489 aminoácidos e se expressa em muitos tecidos, com os mais altos níveis de expressão no intestino, testículo, tecido adiposo, glândulas mamárias e tecido epitelial (CASES et al., 1998). Nos adipócitos, foi verificado que esta enzima regula a taxa de triglicerídeos produzidos (COLEMAN e BELL, 1976) e está associada a homeostase energética (HAVEL, 2001).

Em bovinos, estudos de associação indicam o *DGATI* como candidato a marcador para características ligadas a deposição de gordura no leite (KUHN et al., 2004) e na carne (THALLER et al., 2003). Winter et al. (2002), apresentaram evidências de que o aumento do teor de gordura do leite em diferentes raças está fortemente associado a uma lisina na posição 232 da proteína codificada pelo *DGATI* em bovinos e conclui que uma alanina nesta posição está associada com um teor reduzido de gordura de leite. Bennewitz et al. (2004) avaliaram a o mesmo polimorfismo e relacionaram este com a produção quantitativa de leite em bovinos em que a variante lisina foi associada ao aumento do rendimento de gordura, percentagem de gordura e proteína no leite, e a variante alanina foi relacionada ao aumento no rendimento de proteína e produção de leite bovino. Thaller et al. (2003) avaliaram os efeitos de um polimorfismo no *DGATI* sobre o teor de gordura no músculo *semitendinosus* e no músculo *longissimus dorsi* em bovinos e concluíram que o efeitos de aumento da gordura intramuscular parece estar associado com o genótipo recessivo para os polimorfismo analisados.

Winter et al. (2002), encontraram dois polimorfismos na região promotora 5' deste gene, sendo um deles representado por polimorfismo no número de repetições em tandem (VNTR) na posição 1465 do gene em bovino. O polimorfismo de VNTR apresenta efeitos sobre a produção de leite, conteúdo protéico, conteúdo energético e contagem de células somáticas. Por ser uma região rica em CCCGCC, se torna um local de alto potencial de ligação do fator de transcrição Sp1, que pode estar envolvido na regulação da expressão do gene. Kuhn et al. (2004) afirma que variação do número de repetições em tandem da sequência de 18 nucleotídeos na região promotora pode ser causal para a variabilidade no nível de transcrição do gene *DGATI*. Furbass et al. (2006), encontraram cinco alelos, variando de três a sete repetições nucleotídicas, o mesmo afirmou que os alelos VNTR podem estimular a expressão de genes, contudo, a análise *in vitro* não revelou diferença significativa entre os alelos na estimulação da expressão gênica. Segundo Kuhn et al. (2007) o alelo VNTR 5, com sete repetições, mostrou um efeito significativamente superior no teor de gordura do leite e no teor de proteína do leite, enquanto que a produção de leite diminuiu em comparação com todos os outros alelos VNTR do promotor.

Embora o *DGATI* seja avaliado quase que exclusivamente em gado leiteiro, alguns estudos também foram conduzidos para investigar a relação dos polimorfismos neste gene sobre a gordura intramuscular em ovinos (XU et al., 2009). Casas et al., (2005) afirmam que a mutação *DGATI* K232A não influencia somente características envolvidas na produção de leite, alguns estudos apresentaram efeitos positivos da variante Lisina na qualidade da carne (característica ligada ao conteúdo de gordura muscular) em raças de corte.

Em estudos anteriores Melo (2012), observou um polimorfismo do tipo VNTR na região promotora do gene *DGATI* em caprinos das raças Saanen e Alpina, sugerindo que este gene também pode ser utilizado como marcador molecular em caprinos, tanto para produção de leite quanto de carne. Com base no apresentado acima, podemos supor que polimorfismo encontrado no *DGATI* pode estar relacionado com a taxa de gordura intramuscular e resultando em diferentes fenótipos de peso e maciez.

## 2.6 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1 (IGF1)

O IGF1 é um fator de crescimento essencial que participa de processos como embriogênese, diferenciação celular, desenvolvimento fetal, crescimento, regulação do metabolismo e reprodução, além de estimular processos anabólicos, tal como a proliferação de células, o crescimento do osso e a síntese de proteínas (BAXTER, 1985; FROESCH et al., 1985). O eixo somatotrófico, também conhecido como eixo GH-IGF, governa o processo de crescimento pós-natal e metabolismo em mamíferos, são diretamente responsáveis pelo crescimento, sobretudo ósseo e muscular (SELLIER, 2000).

O IGF está intimamente relacionado com o ciclo celular, pois juntamente com EGF (fator de crescimento epidérmico) são exigidos para a célula passar da fase G1 (pré-síntese) para a fase S (síntese de DNA) (STEWART e ROTWEIN, 1996). Esse polipeptídeo possui peso molecular de 7,5 kDa e é constituído por 70 aminoácidos (DAUGHADAY e ROTWEIN, 1989). O gene que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF*) é altamente conservado em vertebrados, embora o comprimento e estrutura gênica entre as espécies seja variável, apresentando em seres humanos, porcos, cabras, ratos e galinhas, a sequência de nucleotídeos variando de 70-90 kb (KAJIMOTO e ROTWEIN, 1991; REYNA et al., 2010). Em mamíferos, o *IGF* é codificado por 6 éxons sendo que apenas parte do éxon 3 e 4 são responsáveis por codificar o peptídeo maduro (LUND, 1994).

Zhou et al. (2005) identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região promotora do *IGF1*, através da técnica PCR-RFLP (do inglês, PCR - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste em submeter os fragmento previamente amplificados por PCR à digestão com uma (ou mais) endonuclease de restrição, capaz de reconhecer regiões específicas na fita de DNA clivando-a. Os autores avaliaram sua correlação com as características de crescimento, composição corporal, integridade óssea e fatores hormonais e metabólicos em frangos. O *IGF1*-SNP1 apresentou associações significativas com a maioria das características avaliadas, exceto traços metabólicos. Vários efeitos benéficos como aumento do crescimento, aumento do peso muscular do peito, diminuição da gordura abdominal e aumento da integridade óssea foram associado ao alelo 1 em frangos.

Faria et al. (2009) investigaram a associação entre o marcador de microssatélites *IGF1* em uma população (N = 459) gerada pelo acasalamento de javalis nativos com porcas comerciais brasileiras com desempenho, corte de carcaça e características de qualidade da carne. Com o resultado, os autores afirmam que o polimorfismo avaliado apresentou associação significativa com características quantitativas podendo ser utilizados como um gene candidato em programas de melhoramento em suínos.

Zhang et al. (2014) avaliaram um polimorfismo na região promotora do *IGF* em bovinos, o polimorfismo do tipo transversão de uma adenina por uma citosina foi detectado pelos autores através da técnica PCR-RFLP. Os autores concluíram que os indivíduos com

alelo C apresentaram um desempenho significativamente mais elevado nas características de produção avaliadas.

Zhang et al. (2008) identificaram um SNP localizado no íntron 4 (C por G) do gene *IGF1* em 592 animais e investigaram sua associação com características de crescimento em caprinos da raça Nanjiang Huang. Foram avaliadas as características de peso ao nascer, peso corporal aos 6 e 12 meses, perímetro torácico aos 2 e 12 meses, comprimento do corpo aos 6 meses, altura aos 6 e 12 meses. Para estas características, os autores observaram uma associação significativa com o genótipo ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram que o genótipo CC pode ser mais vantajoso para características de crescimento em caprinos Nanjiang Huang indicando que esse polimorfismo pode ser um potencial marcador molecular para as características de crescimento na raça avaliada.

Liu et al. (2010) avaliaram um polimorfismo do tipo SNP através da técnica de PCR-RFLP a procura de efeitos do polimorfismo no *IGF1* nas características de produção de caxemira em uma população de cabras Xinjiang, e Caxemira Nanjiang. No entanto, as características relacionadas à produção de cashmere não foram significativas ( $p > 0,05$ ). O *IGF1* é considerado um gene candidato devido à sua importância no crescimento e na composição corporal de animais, o que nos incentivou a avaliar se o polimorfismo neste gene pode afetar as características de crescimento em cabrito oriundo de raças leiteiras.

## 2.7 Proteína Transportadora de Ácidos Graxos (FATP1)

A gordura intramuscular ou marmoreio, no tecido do músculo *longissimus dorsi* em bovino é um importante indicador da qualidade da carne que influencia a maciez, suculência e o sabor da carne (HOVENIER et al., 1993). Para serem absorvidos pelos tecidos muscular e adiposo, os triacilgliceróis são hidrolisados pela enzima lipoproteína-lipase (LPL) em ácidos graxos livres. Embora sejam moléculas lipofílicas, os ácidos graxos requerem transportadores para otimizar sua passagem pela membrana citoplasmática em tecidos com alta atividade metabólica ou de armazenamento (ANDRADE; RIBEIRO; CARMO, 2006). A proteína de transporte de ácidos graxos 1 (FATP1), é uma proteína integral de membrana que facilita o fluxo de ácidos graxos de cadeia longa, são expressas em todos os tecidos e tipos celulares que utilizam ácidos graxos, exceto nos tecidos que apresentam concentrações muito baixa da entrada de gordura na célula (ZHAO et al., 2015). O gene que codifica esta proteína, o *FATP1*, já foi mapeado em humanos e está localizado no braço curto do cromossomo 19, em ratos no braço curto do cromossomo 16, em bovinos e ovinos no braço longo do cromossomo 7, e em caprinos no braço longo do cromossomo 15 (ORDOVÁS et al., 2006).

Um motivo funcional de FATP1 é essencial para a função de transporte e as mutações neste motivo resultam na diminuição do transporte de ácidos graxos de cadeia longa (STUHLSTZ-KROUPER et al., 1998). Foi encontrado polimorfismo na região de íntron, em humanos, e, nesse caso, foi associado ao aumento de triglicérides plasmáticos (MEIRHAEGHE et al., 2000).

Zhao et al. (2015) avaliaram regiões gênicas do *FATP1*, incluindo os éxons 3, 4 e parte do éxon 5 e os íntrons 3 e 4 em gado da raça Qinchuan e identificaram quatro SNPs nomeados de acordo com a sua posição na sequência do gene *FATP1*. O polimorfismo g.28381 G> A estava no íntron 3, e os polimorfismos g.28265 G> C, g.28470 T> C e g. 28672 G> A eram mutações silenciosas encontradas nos éxon 3, 4 e 5, respectivamente. Apesar de serem mutações silenciosas os autores sugerem que o alelo C no *locus* g.28470 T> C e o alelo A no

*locus* G> A de g.28672 podem estar associados a melhorias nas características de qualidade da carne ( $P < 0,05$ ).

Wang et al. (2011) avaliaram o gene *FATI* em frango e detectaram 5 SNPs (g.49360G> A, g.48195G> A, g.46847A> G, g.46818A> G, e g.46555A> G). Os autores relatam que houveram associações significativas com as características da carcaça como peso vivo, peso da carcaça e peso da carcaça semi-eviscerada ( $P < 0,05$ ) e concluíram que os SNPs neste gene podem ser utilizados como marcadores potenciais para a seleção assistida por marcadores (MAS) em frangos de corte.

Não foi encontrado na literatura analisada trabalhos que relacione polimorfismo ou expressão do gene *FATPI* em caprinos com características de qualidade da carne. Devido as importantes funções sobre a captação de ácidos graxos e o metabolismo de triglicerídeos em adipócitos e músculo esquelético, torna-se interessante a avaliação desta região gênica em caprino.

## 2.8 Receptor Nuclear Ativado por Proliferadores de Peroxissomos Gama (*PPAR $\gamma$* )

PPARs são membros da superfamília de receptores nucleares, os quais são fatores de transcrição que se ligam ao DNA nas regiões regulatórias dos genes alvos. Os três isotipos de receptores dos proliferadores peroxissomais, *PPAR $\alpha$* , *PPAR $\beta/\delta$*  e *PPAR $\gamma$* , atuam como sensores capazes de adaptar a expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética para integrar os sinais lipídicos com genes envolvidos na regulação do metabolismo energético, adipogênese, sensibilidade à insulina e resposta imune, atuando especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (FEIGE et al., 2006).

Os três subtipos de receptores estão presentes na maioria dos tecidos, embora apresentem padrões de expressão tecidual específica, sendo assim, expressos de forma desigual entre os diferentes órgãos e tecidos (CUZZOCREA, 2006). O *PPAR $\gamma$*  foi originalmente descrito como tendo uma função primária na diferenciação de adipócitos, sendo ainda hoje considerado como um elemento essencial nesse processo. Posteriormente, com o avanço nos estudos a respeito de suas funções biológicas, foram atribuídas outras ações importantes, tais como em processos inflamatórios, na sensibilização à insulina, no metabolismo lipídico, aterosclerose, controle de ciclo celular, apoptose e proliferação celular (COHEN, 2006).

Em humanos, o *PPAR $\gamma$*  está localizado no cromossomo 3, na posição 3p25, a análises filogenéticas revelam que sua estrutura é bastante preservada entre humanos e camundongos, apresentando 99% de similaridade e 95% de identidade (FAJAS et al., 1997)

O *PPAR $\gamma$*  atua na produção de adipocinas, aumentando a produção de adiponectina, que promove maior captação de ácidos graxos, maior captação e utilização da glicose no tecido adiposo e muscular e a menor produção hepática de glicose, promovendo, assim, melhor controle dos níveis séricos de glicose, de ácidos graxos livres e de triacilgliceróis (FEIGE et al., 2006).

Cole et al. (2000) testaram a hipótese de que a variante Pro12Ala do *PPAR $\gamma$ 2* estava associada à obesidade em humanos e a características relacionadas ao diabetes tipo 2 em 921 indivíduos. Os mesmos confirmaram que os indivíduos que apresentaram pelo menos um alelo Ala tiveram um índice de massa corporal significativamente mais elevado, assim como, a circunferência da cintura, e níveis elevados de leptina sérica ( $P < 0,05$ ). Hiroshi et al. (2004), utilizando camundongos com 50% de redução na expressão do *PPAR $\gamma$*  (*PPAR $\gamma$  +/-*,

haplodeficientes) observaram que os animais com genótipo  $PPAR\gamma$  +/- apresentaram maiores densidades óssea do que os animais selvagens independentes da idade, isso se deve ao fato de que o envelhecimento está associado a uma diminuição recíproca da osteogênese e a um aumento da adipogênese e que os osteoblastos e adipócitos compartilham um precursor comum.

Com base nos dados divulgados na literatura sobre a ação do *PPAR* e devido à falta de informação sobre a relação de polimorfismos neste gene com características de crescimento ou qualidade da carcaça em animais de produção, nos levou a realizar essa investigação pioneira na produção de caprinos.

## 2.9 O Fator de Transcrição Nuclear 1 (NF1)

A nomenclatura do fator NF1 surgiu do fato de ser semelhante ao fator de transcrição de ligação CCAAT, uma proteína envolvida na expressão de diversos genes. Dessa semelhança surgiu o sinônimo de fator de transcrição/CCAAT, entretanto por se ligarem a apenas um pequeno grupo dessas sequências e devido aos primeiros cDNA terem sido clonados de genes NF1-C, a família pode ser chamada de NF1/CTF e os fatores de transcrição e proteínas NF1-C (DORN et al., 1987). Essa família de proteínas representa um grupo específico de sequências de ligação ao DNA que reconhecem sequências de consenso 5'-TTGGC(N<sub>5</sub>)GCCAA-3'. Diversas classes de cDNA que codificam o NF1 foram isoladas de humanos, rato, hamster e porco, demonstradas serem necessárias para a correta expressão de vários genes (GOYAL et al., 1990).

Esses sítios de ligação para proteínas NF1 estão presentes em genes expressos em múltiplos tecidos e em genes expressos exclusivamente em cérebro, músculo, fígado, glândula mamária e outros tipos de células diferenciadas (CHAUDHRY et al., 1998). Quando embalados como cromatina, muitos promotores são reprimidos por transcrição, reduzindo assim o acesso dos fatores de transcrição aos seus locais de ligação. No entanto, os receptores nucleares é um grupo de fatores de transcrição que têm a capacidade de acessar aos seus locais de ligação nesta estrutura de cromatina repressiva. Os receptores nucleares são capazes de se ligar aos seus locais e recrutar proteínas de remodelação da cromatina, tais como complexos de remodelação da cromatina dependentes de ATP e enzimas modificadoras de histonas, resultando em ativação transicional (HEBBAR e ARCHER, 2003)

Wang et al., (2007) definem NFI como um regulador chave do desenvolvimento pós-mitótico de células cerebrais, em particular da formação de axônios, dendritogênese e comportamento migratório. Além disso, eles revelam como uma única família de fatores de transcrição pode controlar e integrar vários aspectos da diferenciação neuronal através da regulação de moléculas de adesão celular.

Grunder et al., (2002) avaliaram uma mutação em rato cujo a expressão do *NFI* era nula (*NFI<sup>n</sup>*), animais que apresentam essa mutação em homozigose morrem precocemente e exibem hipoplasia pulmonar grave. Quando em heterozigose o animal sobrevive porém exibem diferenciação pulmonar retardada. A expressão do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) não é regulada para baixo no epitélio pulmonar mutante nos estádios tardios da morfogênese, o que pode resultar em maturação pulmonar incompleta. Os mesmos autores concluíram que NF1 é essencial para o desenvolvimento pulmonar normal e sugerem que ele poderia estar envolvido na patogênese das síndromes de dificuldade respiratória em humanos.

Pérez-Casellas et al. (2009) verificaram que a transcrição da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 5 (IGFBP-5) é modulada diferencialmente em

células osteoblásticas humanas por membros da família de fatores de transcrição NF1 através da ligação ao elemento consenso na região promotora, o que sugere que estas proteínas têm um potencial papel na regulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos.

PIT-1 \ GHF-1 é um fator de transcrição específico da pituitária que se liga e transativa o promotor dos genes para o GH, prolactina e hormônio estimulador da tireoide. Rajas et al., 1998 analisaram a atividade transcricional do promotor PIT1 / GHF1 em humano, e identificaram três locais de ligação de PIT-1 / GHF-1 e dois locais de ligação ao fator nuclear 1 (NF-1). A análise de deleção indicou que o NF-1 participam na regulação negativa da expressão do gene PIT1 / GHF1 em humano. A ativação diferencial de um promotor dependente de NFI, juntamente com os padrões de expressão observados para os quatro genes, indicam que as proteínas NFI podem desempenhar um papel importante na regulação da expressão de genes específicos de tecido durante a embriogênese de mamíferos (CHAUDHRY et al. 1997).

Murtagh et al. (2003) sugerem que a família do gene NFI tem múltiplas funções importantes durante o desenvolvimento da glândula mamária. Wang et al. (2011) identificaram um polimorfismo de PCR-RFLP *EcoRII* no gene *NFI-C2* em cabras de três raças chinesas, e avaliaram a associação deste polimorfismo com a produção de leite em diferentes estágios da lactação para uma delas, a raça Xinong Saanen. Apesar de não ser constatada associação significativa com a produção de leite ( $P > 0,05$ ), foi observado que na terceira lactação o genótipo GG tendeu a uma associação com maior produção de leite, em comparação ao genótipo AA ( $P = 0,07$ ).

A partir destas informações e com o aumento do número de pesquisas correlacionando o NF1 com característica de interesse zootécnico, principalmente com relação a produção de leite, decidimos avaliar se a mutação descrita em Wang et al. (2011) está associada com alguma das características de qualidade avaliadas no presente estudo peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC).

## 2.10 Miostatina (MSTN)

O gene da miostatina em vertebrados consiste de 3 éxons e 2 íntrons, que codificam uma proteína composta por 376 aminoácidos, relacionada com a produção de tecido do músculo esquelético em adultos (MCPHERRON et al., 1997, BELLINGE et al., 2005). Sua função biológica está relacionada com a inibição do desenvolvimento muscular que se traduz numa regulação negativa, sendo expressa de forma mais acentuada nos estados embrionários e fetais e de forma reduzida no tecido muscular adulto (Thomas et al., 2000).

A miostatina foi incluída na superfamília de fatores de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), por contribuir para a manutenção da homeostasia dos tecidos nos animais vertebrados adultos, denominada inicialmente de fator de crescimento diferencial – 8 (GDF-8) (MCPHERRON e LEE, 1997). No animal adulto é expressa em diversos músculos do corpo, mais recentemente foi identificada também no tecido adiposo (LEE, 2004).

Grobet et al. (1997) descreveram uma mutação em animais da raça Belgian Blue, que resulta na musculatura dupla e uma hipertrofia muscular. A mutação denominada nt821 (del11), origem é uma deleção de 11 pb no éxon 3 e ocorre em uma região altamente conservada nos membros da família TGF- $\beta$ , denominada zona bioativa do carboxil terminal (C-terminal). Essa mutação resulta em uma proteína truncada com o aparecimento de um códon de terminação prematuro.

Uma mutação do tipo SNP no éxons 3, foi descrita nas raças Piemontês e Gasconne por Grobet et al., (1998), resulta na substituição de uma guanina por uma adenina causando a troca do aminoácido cistina por uma tirosina na região conservada do gene. Essa mutação denominada C313Y provocando uma alteração na estrutura e no funcionamento da proteína resultando em um fenótipo de musculatura hipertrófica, similares aos bovinos com musculatura dupla em aparência.

Em ovinos foi descrito uma mutação que resulta na hipertrofia muscular denominado fenótipo *callipyge* (*clpg*), porém os autores caracterizaram por padrão de herança não mendeliana, referida como sobredominância polar, que parece ser beneficiado por *imprinting* maternal. Ou seja, somente os indivíduos heterozigotos, que tenham herdado o alelo *clpg* do pai expressam o fenótipo (COCKETT *et al.* 1994). Segundo Jackson e Green, (1993) quando comparados aos cordeiros com fenótipos normais, os indivíduos *callipyge* têm melhor eficiência alimentar e composição de carcaça 30% superior.

Com base nos trabalhos supracitados e no resultado fenotípico causado por mutações no gene que codifica a miostatina, optamos por realizar uma análise inicial no intron 1 da miostatina e verificar se existe alguma mutação em caprinos e se há correlação com as características de peso ao abate, peso da carcaça e força de cisalhamento, avaliadas neste estudo.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Composição da Amostra

Foram utilizados 40 caprinos (*Capra hircus*), machos jovens, mestiços, resultantes de cruzamentos entre animais das raças Saanen e Alpina, com idade aproximada de 150 dias, alojados no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa-MG. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento total (*free stalls*) e alimentados inicialmente com leite em pó reconstituído e posteriormente com silagem de milho e mistura concentrada para atender as necessidades nutricionais e ainda, com fornecimento de água a vontade.

Todos os procedimentos envolvendo o uso destes animais foram aprovados pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/COMEP, documento nº 279/2012, referente ao caso nº 23083.008044/2012-52. Neste aspecto, foram seguidos os princípios estabelecidos nas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (DBCA), que foram criadas segundo o que estabelece a Lei nº 11.794 de oito de outubro de 2008, onde se prevê a redução no número de animais para a execução de um projeto para produzir um resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, a vida dos animais. Dentro deste princípio, a equipe optou por utilizar as mesmas amostras de tecido muscular dos animais já abatidos em outro estudo e as metodologias de pesagem, abate e coleta de tecido para o estudo de força de cisalhamento podem ser encontradas em Garcia (2012).

### 3.2 Avaliação de Polimorfismo de DNA

#### 3.2.1. Amplificação dos Fragmentos de Interesse

Para análise genética através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) e PCR-RFLP (do inglês PCR- *Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram coletados aproximadamente 25 mL de sangue em tubos de *vacuntainer* estéreis contendo EDTA 8% (ácido etilenodiamino tetra-acético), posteriormente procedeu-se a extração do DNA a partir das células brancas utilizando o reagente brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) conforme descrito em Soares et al. (2009). Para a amplificação das regiões gênicas em caprinos, correspondentes aos genes *GH*, *IGF1*, *MSTN*, *DGAT*, *FATP*, *PPAR $\gamma$*  e *NF1* foi utilizado um par de *primer* para cada fragmento gênico (Tabela 1).

Para a amplificação dos fragmentos foram feitas reações de PCR com o kit *Gotaq DNA Polymerase* (PROMEGA) de acordo com as recomendações do fabricante. Cada tubo de reação continha os seguintes reagentes: 0,5 pmoles de cada *primers*, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> contido no tampão 5x *Green or Colorless Go Taq*, 500 nM de cada desoxirribonucleotídeo, uma unidade de *Go Taq* DNA polimerase, aproximadamente 100 ng de amostras de DNA em volume final de 20  $\mu$ L

As reações foram conduzidas em termociclador da marca (*Life Technologies Thermo Fisher Scientific* – modelo 4484073 PROFLEX) e consistiu de um passo inicial correspondendo a etapa de desnaturação das pontes de hidrogênio resultando na abertura das fitas moldes que ocorre a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos com 3 etapas, uma etapa de desnaturação e abertura da fita molde que ocorre a aproximadamente 94°C, seguido da segunda etapa, conhecida como etapa de anelamento onde os primers nas sequencias alvos,

com temperaturas que variaram para cada par de primer (tabela 1) e, a terceira etapa, denominada etapa de extensão que ocorre a 72 °C, temperatura ótima de atividade da *Taq* DNA polimerase. Por fim, um passo de extensão que ocorre a 72 °C por aproximadamente 5 minutos para as finalizações dos fragmentos incompletos pela *Taq* DNA polimerase.

Após a amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese a 160V (volts) por uma hora em gel de poliacrilamida 5% e corado com nitrato de prata possibilitando a visualização dos fragmentos de DNA. Os fragmentos devidamente amplificados, referente as regiões específicas de cada gene de interesse podem ser encontradas na tabela 1. Alguns fragmentos foram submetidos a técnica de PCR-RFLP.

Os amplicons dos genes *DGATI*, *MSTN*, *PPAR $\gamma$*  e *FATP1* foram submetidos a corridas longas de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% a 160V (volts) por 16 horas. Os amplicons referente os genes *GH*, *IGF1* e *NFI* foram submetidos a restrições com as enzimas *HaeIII* (Promega), *BstNI* (BioLabs) e *HaeIII* (Promega), respectivamente, conforme as recomendações dos fabricantes. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 12% e corado com nitrato de prata, para interpretar os diferentes genótipos dos animais.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos: hormônio do crescimento (*GH*), diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGATI*), miostatina (*MSTN*), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1*), fator nuclear 1 C2 (*NFI*), receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos gama (*PPAR $\gamma$* ) e proteína transportadora de ácidos graxos (*FATP*);

Genes	PrimeR (5' - 3')	Região Gênica	Tamanho do fragmento	T M	Autor	Tipo de polimorfismo
<i>GH</i>	PF:CTCTGCCTGCCCTGGACT PR:GGAGAAGCAGAAGGCAACC	Exons 2 e 3	422pb	60	Hua et al. 2009	SNP
<i>DGAT</i>	PF:GCCTAGCCTTGTCTCCACAG PR:AGTAGCCACTGACGAGTGAAG	Região Promotora	777pb	64	Melo et al. 2012	VNTR
<i>MSTN</i>	PF:GTTCTGCTAGTGCAGAGCAAC PR:GATGGCTGCTACTATCTCCC	Intron 1	380pb	62	Equipe Proponente	Tamanho de fragmento
<i>IGF1</i>	PF:CACAGCGTATTATCCCAC PR:GACACTATGAGCCAGAAG	Exon 4 e intron 4	363pb	55	Liu et al. 2010	SNP
<i>NFI</i>	PF:CCCTACCTTAACCCTAACCA PR:GTCCCGGACTGTGATTTGC	Intron 4	233pb	53	Wang et al. 2011	SNP
<i>PPAR</i>	PF:ACGGTTTGCGTCCTTATTC PR:CTCTGTGTCAACCATGGTAAT	Região Promotora	570pb		Equipe Proponente	Tamanho de fragmento
<i>FATP</i>	PF:GTGAGGCAGTGCTTAGTTATTTTC PR:CGGTCGGGGAGTTCATTCAT	Região Promotora	850pb	61	Bagatoli 2015	Tamanho de fragmento

TM = temperatura de anelamento. SNP = polimorfismo de nucleotídeo único, VNTR = número variável de repetições em tandem, pb = pares de bases.

### 3.3 Estudo de expressão Gênica

Todas as análises de expressão gênica foram realizadas baseando-se nas diferenças de peso dos animais. Assim, foram separados dois grupos, um com cinco animais com maior peso ao abate (PA) e outros cinco animais com menor peso. A expressão de todos os genes foi avaliada entre estes dois grupos de animais. Para análise de expressão foram escolhidos os 10 animais para cada característica analisadas, 5 com maior e menor peso ao abate, 5 com maior e menor peso da carcaça e 5 com maior e menor valores de força de cisalhamento, indicando a maciez da carne.

#### 3.3.1 Extração de RNA

Para o isolamento de amostras de RNA, logo após o abate, foi coletada uma pequena quantidade, entorno de 0,1 grama, do tecido muscular *longissimus lumborum*, localizado acima da décima segunda costela, transferido para tubos de polipropileno de 2,0 mL, estéreis e livres de RNase, contendo o reagente RNA-Holder (*BioAgency*), seguindo os valores de quantidades indicados pelo fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer -20° C.

O RNA total foi extraído das amostras de tecido muscular (<100 mg) de cada cabrito, com uso do *PureLink® RNA Mini Kit* (*Catalog number: 12183018A*), seguindo as recomendações do fabricante (*Invitrogen, Carlsbad CA, USA*).

Os fragmentos dos músculos foram cortados com o auxílio de uma lamina de corte devidamente esterilizada e pesado em uma balança de precisão da marca BEL Engineering – modelo M214A. Posteriormente foi realizada a maceração do tecido por meio de pipetagem, até sua completa dissociação em um tampão de lise preparado com  $\beta$ -mercaptoetanol. Logo após o material foi centrifugado por 2 minutos a 12.000g, em temperatura ambiente, coletada a fase líquida e transferindo-a para tubo limpo onde foi adicionado o mesmo volume de etanol 70%. O material foi homogeneizado e transferido para a coluna em microtubo de 2.0 mL e posteriormente centrifugado em temperatura ambiente por 1 minuto a 12.000 g. O material que passou pela coluna foi descartado e a coluna reinserida no tubo de coleta, repetindo este passo até que todo o lisado fosse transferido. Nesta fase foi incluído o tratamento das amostras com a *RQ1 RNase-Free DNase* (*Catalog number: M6101*) para eliminar contaminantes de DNA, conforme as recomendações do fabricante (*Promega Corporation, USA*). As amostras foram lavadas com 350  $\mu$ L do tampão de lavagem I (*Wash Buffer I*) e então centrifugadas por 1 minuto a 12.000g, o efluxo foi descartado e então adicionado o *Mix* com DNase em cada amostra. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente até que fosse adicionado o tampão de parada da DNase (*stop buffer*). Novamente foram adicionados 350  $\mu$ L do tampão de lavagem I e centrifugado por 1 minuto a 12.000 g. Neste momento, a coluna foi reinserida em um novo tubo de coleta, lavando-a em 500  $\mu$ L do tampão de lavagem II (*Wash buffer II*) por duas vezes, com centrifugação a 12.000 g por 1 minuto. Por último, uma etapa de centrifugação adicional foi realizada para que a membrana com o RNA secasse e então fossem adicionados 30  $\mu$ L de água livre de RNases. O material foi incubado por 1 minuto a 37°C e centrifugado por 1 minuto a 12.000g. As amostras foram armazenadas imediatamente em freezer -20°C para posteriormente serem sintetizadas e transformadas em cDNA. A integridade das amostras de RNA foi avaliada em gel de agarose 0,5%, corado com brometo de etídeo, a concentração de RNA foi mensurada com o auxílio do equipamento *NanoDrop ND-2000C*.

### 3.3.2 Síntese de cDNA

Para síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o *kit SuperScript™ III First-Strand Syntesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil)* de acordo com as recomendações do fabricante. Em tubos estéreis livres de RNA foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)<sub>20</sub>) e 1 µL de tampão de anelamento (*Annealing buffer*). As reações foram incubadas por 5 minutos a 65°C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa (*SuperScript III - Invitrogen*) e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para a síntese do cDNA. A reação foi então incubada por 5 minutos a 85°C e imediatamente colocada sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### 3.3.3 Confeção dos *primers* para análise de expressão gênica

Para análise de expressão e com a utilização do programa *PrimerQuest Tool* (acesso: <https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>) foram desenhados 2 pares de primers para cada gene: *IGF1*, *DGAT1* e *MSTN*. A obtenção das sequências dos primers foram baseados nas sequências dos mRNAs JX570672 (*IGF1*), XM018058728 (*DGAT1*) e HM462261 (*MSTN*). Para verificar a especificidade dos *primers*, as sequências foram analisadas com o auxílio do software *Primer BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A sequência do primer para amplificação do fragmento *FATP* foi obtida do trabalho de Bagatoli (2015) e os controles endógenos *EEF1*, *GAPDH* e *HMBS* foram obtidos do trabalho de Zhang et al. 2013, todos os *primers* foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia LTDA.

**Tabela 2.** Sequência dos primers utilizados para amplificar fragmentos do gene diacilglicerol aciltransferase 1 (DGAT1), gene da miostatina (MSTN), gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), gene da proteína transportadora de ácidos graxos (*FATP*); gene do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), gene do hidroximetilbilano sintase (*HMBS*).

Genes	Primers (5'-3')	Tamanho do fragmento	Tm	Referência
<i>DGAT</i> (1)*	F:CCCTTCAAGGACATGGACTAC R: GTGGAAGAGCCAGTAGAAGAAG	102pb	60	Este Trabalho
<i>DGAT</i> (2)	F:GCTGCTTTGGCAGGTAAGA R:GGGCGAAGAGGAAGTAGTAGA	103pb	60	Este Trabalho
<i>MSTN</i> (1)*	F:GATGCTGTCGTTACCCTCTAAC R:CCGGAGCAGTAATTGGACTTAT	94pb	60	Este Trabalho
<i>MSTN</i> (2)	F:CCTGGAAACAGCTCCTAACAT R:TCATCTCTCTGGACATCGTACT	105pb	62	Este Trabalho
<i>IGF-1</i> (1)*	F:AGCAGTCTTCCAACCCAATTA R:ACAGGGCCAGATAGAAGAGA	103pb	60	Este Trabalho
<i>IGF-1</i> (2)	F:CCTCCTCGCATCTCTTCTATCT R:CTGTCTCCACACACGAACTG	124pb	60	Este Trabalho
<i>FATP</i> *	F:GGATTGGAGACACTTTCAGGTGG R:CAACCACACCATAGACATTTGCTTC	113pb	60	Bagatoli (2015)
<i>GAPDH</i> *	F:GCAAGTTCCACGGCACAGTC R:CCCACCTTGATGTTGGCAGGA	-	60	Zhang et al. (2013)
<i>HMBS</i> *	F:AGCATGCCTTGGAGAGGAATG R:CGCTTGCAGACAGCTCCAAT	-	60	Zhang et al. (2013)
<i>EEF1</i> *	F:CGACTGGCCACCTCATCTACA R:CCAGGCATACTTGAAGGAGCC	-	60	Zhang et al. (2013)

(1) = Primeira opção; (2) = segunda opção; \* = primer selecionado; TM = temperatura de anelamento; pb = pares de bases.

### 3.3.4 qPCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no laboratório de expressão gênica localizado no Instituto de Ciências Biológica e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), conduzidas no equipamento *LineGene 9640 - BIOER*. Em cada reação foi utilizado o composto fluorescente *SYBR GREEN (Fast SYBR®Green Master Mix, Applied Biosystems)*, fluoróforo capaz de ser detectado pelo sistema óptico do termociclador com o passar dos ciclos e o aumento da formação dos amplicons o mesmo tem seu acúmulo em regiões específicas na dupla hélice.

### 3.3.5 Teste de eficiência

Foi realizado o teste de eficiência para cada primer seguindo os seguintes passos: primeiramente foi preparado um mix contendo 10 µl amostra de cDNA de cada animal analisado, formando um pool de cDNA, posteriormente este pool foi diluído em três concentrações 45 ng, 15 ng e 5 ng (proporção 9:3:1) e três concentrações de primer 500 nM, 250 nM e 125 nM (proporção 4:2:1). De acordo com o teste de eficiência e com as curvas de amplificação optou-se por utilizar as concentrações de 45 ng de cDNA e 500 nM de primer para todas as reações realizadas no experimento, as mesmas foram realizadas em triplicatas.

As condições experimentais da PCR foram as seguintes: um passo inicial de 95°C por 10 minutos que consiste na fase de abertura das fitas, seguido por 40 ciclos que consistiram em 95°C por 15 segundos para a abertura das fitas e 60°C por 30 segundos para o anelamento dos primers e extensão das fitas. Um passo adicional com aumento gradual de temperatura foi acrescentado, com temperatura de 60°C até 95°C, para a obtenção da curva de dissociação e confirmação da especificidade dos fragmentos amplificados. Após esta etapa, os valores dos Cts das triplicatas foram avaliados e os que apresentaram grande disparidade foram refeitos. Após, todos os valores foram exportados para Excel para demais análises.

### 3.3.6 Estabilidade de expressão dos genes de referência

Com os dados exportados para o Excel foi possível avaliar a estabilidade da expressão dos genes de referência (*EEF1*, *HMBS* e *GAPDH*) através do programa *RefFinder* (disponível no site <http://fulxie.0fees.us/?type=reference>). O mesmo realiza as análises dos dados através dos métodos  $\Delta C_t$  (SILVER et al., 2006), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004), *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004). Esta ferramenta analisa separadamente cada algoritmo utilizado e fornece também uma classificação geral do melhor gene de referência para a condição experimental testada, obtida através da combinação dos resultados dos quatro algoritmos

## 3.4 Análise Estatística

Análise da influência do efeito dos genótipos sobre as variáveis produtivas (PA, PC E FC).

$$\text{Modelo: } Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Onde:

$Y_{ij}$  = variáveis dependentes (FC, PA, PC)

$\mu$  = média geral das observações  $Y_{ij}$

$G_i$  = efeito das classes de cada gene (AA e AB para GH; 11, 12 e 22 para DGAT1; M1M1, M1M2 e M2M2 para MSTN; AA, AB e BB para IGF; AB, AC, AD, BB, BC e BD para FATP; GG, AG e AA para NF1 e AA, AB e BB para PPAR)

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação

Análise da influência do efeito dos genótipos combinados sobre as variáveis produtivas (PA, PC e FC).

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = \mu + GG_{ij} + e_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$  = variáveis dependentes (FC, PA, PC)

$\mu$  = média geral das observações  $Y_{ij}$

**GG<sub>ij</sub>** = efeito das classes dos genótipos combinado (AAAA, AAAB, ABAA, ABAB para *MSTN/PPAR*, AAAA, AAAB, AABB, ABAA, ABAB, ABAB, para *GH/NF*, AAAA, AAAB, ABAA, ABAB, BBAA, BBAB para, *GH/DGAT*, AAAA, AAAB, AABB, ABAA, ABAB para *DGAT/PPAR*, AAAA, AAAB, AABB, ABAA, ABAB para *GH/MSTN*.)

**e<sub>ijk</sub>** = erro aleatório associado a cada observação

#### Análise de expressão.

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento GLM do SAS. O procedimento UNIVARIATE foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com  $2^{-\Delta C_t}$ ) e dados de produção. Foi utilizado ANOVA para cada classe de genótipos em um delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e as correlações de Pearson testadas pelo teste de t ( $P < 0,05$ ).

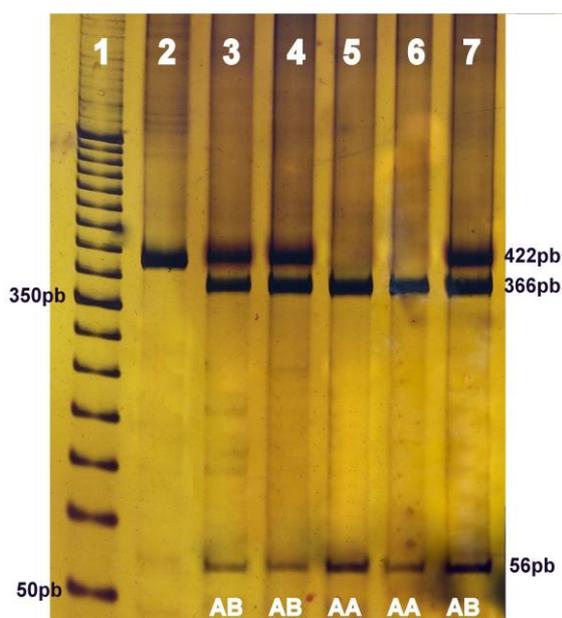
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de polimorfismo

#### 4.1.1 Gene do hormônio do crescimento (GH)

Com a utilização dos primers publicado por Hua et al., (2009), foi possível obter fragmentos específicos com o tamanho de 422 pb, correspondentes a região do exon 2 do *GH* pela técnica de PCR e avaliados por eletroforese. Foi necessário ainda a utilização da técnica de PCR-RFLP para identificar o genótipo dos 40 animais avaliados no experimento.

O polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) identificado no exon 2 refere-se a substituição de uma base adenina (A) por uma base guanina (G) no DNA (A781G), causando a substituição de um aminoácido por outro na proteína (serina por glicina), essa mutação cria um sitio que é reconhecido pela enzima *Hae*III (GG/CC), sendo possível assim reconhecer os diferentes alelos como pode ser observado na figura 1. Destacamos que o alelo B recebeu a mesma denominação de Hua et al. (2009), mas refere-se à presença do nucleotídeo Guanina, representando na verdade o alelo G.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 5% de produtos de digestão pela enzima *Hae*III do gGH. Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Amresco®). Canaleta 2 = fragmento de 422 pb, produto de PCR sem digestão, canaletas 3, 4 e 7 = genótipos heterozigotos AB (fragmentos de 422, 366 e 56 pb), canaleta 5 e 6 = genótipo homozigoto AA (fragmentos de 366 e 56 pb).

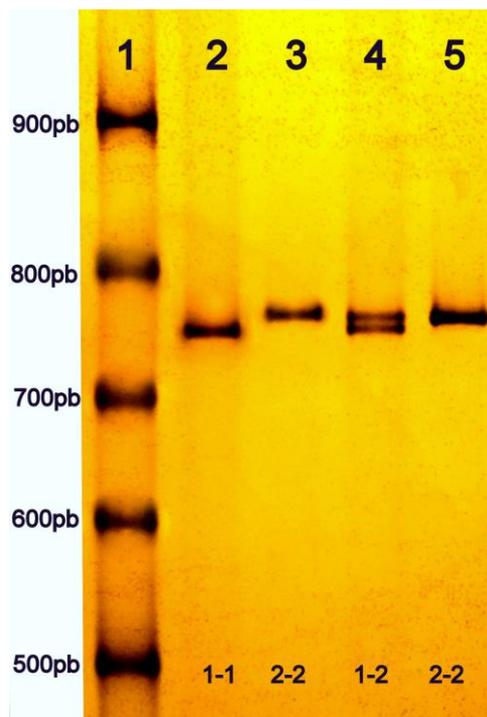
Do total de 40 animais avaliados, 23 foram identificados como homozigotos AA (frequência de 0,575) e 17 foram identificados como heterozigotos AB (frequência 0,425), no presente trabalho não foram encontrados animais homozigotos para o alelo B. As frequências

alélicas foram de 0,79 e 0,21 para os alelos A e B respectivamente. A não ocorrência de animais com genótipo BB entre os 40 cabritos pode ser explicada pela baixa frequência esperada de animais com este genótipo e a ausência destes na amostra pode ter ocorrido pela casualidade ou pelo efeito do macho. Segundo o princípio de Hardy-Weinberg (H-W) demonstrado, por Hardy e Weinberg, em 1908, espera-se que este genótipo seja encontrado na população com a frequência de 0,04 (4 cabritos em 100). Entretanto, ao se calcular o equilíbrio de H-W, e através do teste de Qui-quadrado com o grau de liberdade igual a um e coeficiente igual a 5%, verifica-se que a população está em equilíbrio. Melo (2012) analisou o mesmo polimorfismo em uma população de 184 cabras de raças leiteira, oriunda da mesma população avaliada no presente trabalho, e obteve as frequências genóticas de 0,352 cabras homozigotas AA, 0,583 heterozigotas AB e 0,065 homozigotas BB. Analisando os resultados das frequências através do teste de Qui-quadrado é possível observar que essa população de cabras leiteiras está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a região gênica analisada, o que corrobora com os dados obtidos no presente trabalho. O autor acima citado não encontrou associação do polimorfismo com as características de produção de leite, isto pode refletir a falta de seleção neste rebanho sobre os diferentes genótipos.

Mesmo o genótipo AB apresentando valores superiores em se tratando de característica de carcaça, a frequência alélica para o alelo B (0.4188) encontrado por Hua et al. (2009) foi mais baixa que a frequência do alelo A (0.5812) em uma população de 154 animais analisados. É importante relatar também que não foi encontrado pelo autor citado acima nenhum animal com o genótipo BB assim como neste estudo, mas isto reflete os sistemas de cruzamentos dos criatórios dentro de uma geração, pois com esta alta frequência do alelo B espera-se a ocorrência de genótipos BB, caso os cruzamentos fossem aleatórios. Se essa população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weimberg o genótipo BB seria encontrado em uma frequência de 0,17 (17 animais em 100).

#### **4.1.2 Gene diacilglicerol aciltransferase 1 (*DGATI*)**

O polimorfismo do Tipo VNTR (variações no número de repetições em tandem), localizado na região promotora do gene *DGATI* foi encontrado primeiramente em bovino e posteriormente descrito em caprino por Melo (2012). A amplificação por intermédio da técnica de PCR possibilitou amplificar os fragmentos com aproximadamente 750pb e com o auxílio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, possibilitou a identificação dos alelos 1 (Baixo) e 2 (Alto) como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, produtos de corrida longa por 16 horas a 160 volts referente aos amplicons do gene *DGATI* com 777pb. Canaleta 1 = marcador de 100 pb (New England Biolabs). Canaleta 2 = fragmentos baixo correspondente ao genótipo homozigoto 1/1, canaletas 3 e 5 = fragmento alto correspondente ao genótipo homozigoto 2/2, canaleta 4 = genótipo heterozigotos contendo os fragmentos alto e baixo 1/2.

Do total de 40 animais avaliados no experimento, 7 foram identificados como homozigotos 1/1 (0,175), 13 foram identificados como heterozigotos 1/2 (0,325) e 20 foram identificados como homozigotos 2/2 (0,5), com as frequências do alelo 1 igual a 0,34 e do alelo 2 igual a 0,66. Segundo os princípios de H-W, verifica-se que as frequências estão em equilíbrio.

Dados que corroboram com essa identificação foram as frequências obtidas por Melo (2012) com fêmeas leiteiras do mesmo rebanho. Os animais com genótipo homozigoto 1/1 estava presente na população em uma frequência de 0,30, os animais heterozigotos 1/2 frequência de 0,22 e os animais homozigotos 2/2 frequência de 0,48. As frequências alélicas foram de 0,4 para o alelo 1 e 0,6 para o alelo 2. Os autores ainda concluem que o polimorfismo do tipo VNTR identificado gene *DGATI* de caprinos têm influência na duração da lactação, sendo que o alelo 2 apresenta uma associação positiva com esta característica. Isso pode explicar o fato do alelo 2 apresentar maior frequência em populações com aptidão para a produção de leite, não foi encontrado correlação dos genótipos com as outras características como produção de leite.

Em bovinos, foi encontrada uma sequência de 18 nucleotídeos (AGGCCCGCCCTCCCCGG), correspondendo a um VNTR localizado na região promotora do gene, ocasionando alteração de grande influência na concentração de gordura no leite (Thaller et al. 2003, Kuhn et al., 2004 e Winter et al., 2002).

Kuhn et al. (2004) encontraram cinco alelos em seu trabalho, mas não forneceu o número de repetições dos fragmentos encontrados. Furbass et al. (2006), encontraram cinco

alelos, variando de três a sete repetições nucleotídicas. Gautier et al. (2007) identificaram sete alelos com repetições de duas a oito sequências nucleotídicas no gado holandês.

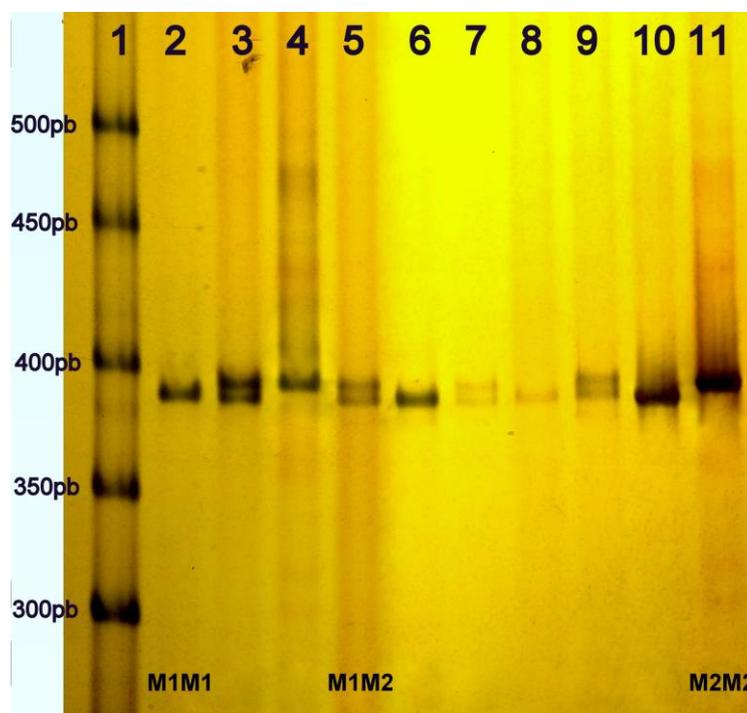
O VNTR contendo 18 nucleotídeos compreende um motivo CCCGCC, o qual é um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição SP1. Assim, a variabilidade no número de sítios de ligação, que é gerado pelo polimorfismo VNTR na região promotora do *DGATI*, pode ser responsável pela variação na expressão e na atividade deste gene (KUHN et al., 2004).

Mioranza (2006) sequenciou uma região de exon do *DGATI* em caprinos, de raças leiteiras. Ao comparar os resultados com a sequência gênica de bovinos, disponível em banco de dados, observou-se seis transições e seis transversões, sendo que cinco situavam-se na região codificadora do gene, porém eram mutações silenciosas, não houve alteração no aminoácido traduzido.

#### 4.1.3 Gene da Miostatina (*MSTN*)

Por intermédio da técnica de PCR foi possível amplificar um fragmento com tamanho aproximado de 380pb referente a parte do intron 1 do gene da miostatina em caprino. Com o auxílio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em uma concentração de 15% foi possível a identificação de dois fragmentos de tamanhos distintos denominados neste trabalho de alelos M1 (Baixo) e M2 (Alto) como pode ser observado na figura 3.

Em caprino ainda são poucas as informações sobre a região gênica que codifica a miostatina e possíveis alterações no gene que podem levar a alterações no fenótipo do indivíduo.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, a 160 volts por 16 horas referente aos amplicons do gene *MSTN* com aproximadamente 380pb. Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Canaleta 2, 6, 8 e 10 = fragmento baixo, genótipo

homozigoto M1M1, canaletas 4 e 11 = fragmento alto, genótipo homozigoto M2M2, canaletas 3, 5, 7, e 9 = genótipo heterozigotos, fragmentos alto e baixo (M1M2).

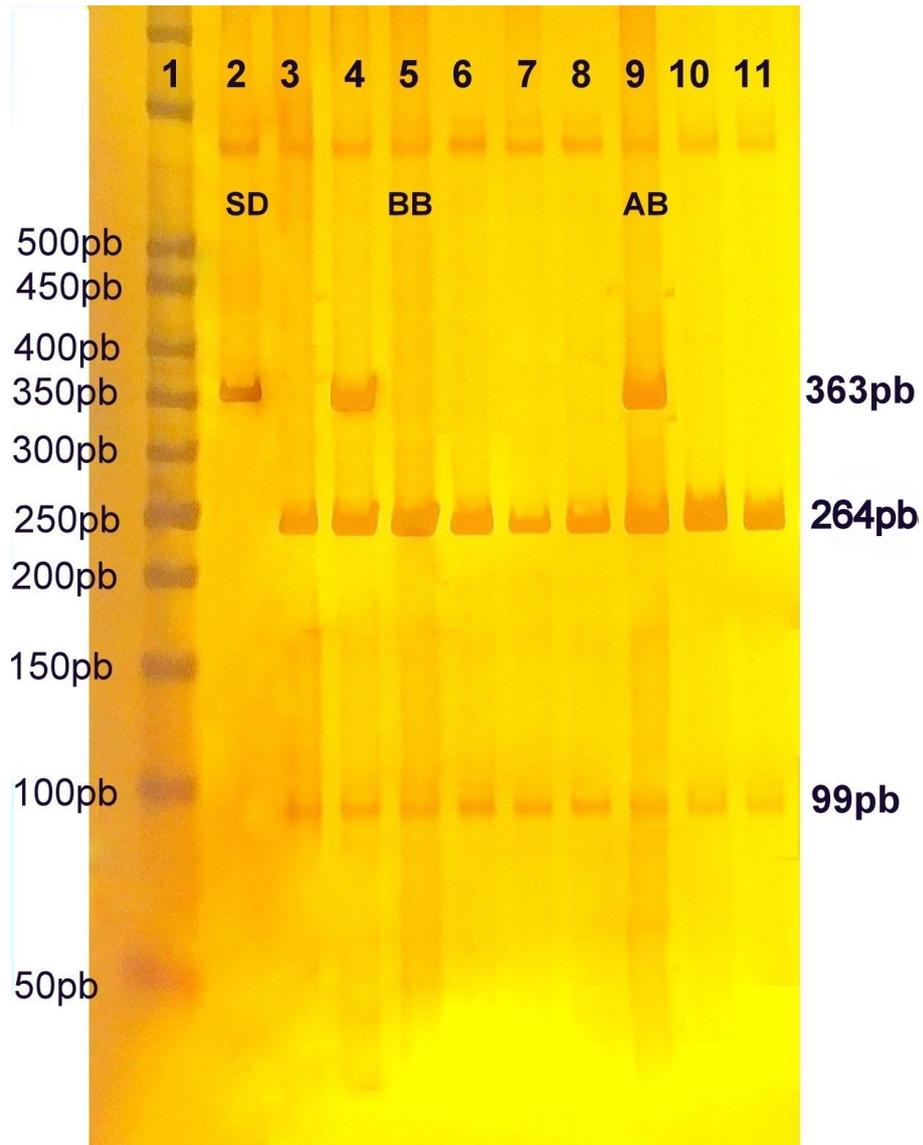
Foi possível genotipar 39 dos 40 animais analisados para o gene da miostatina dos quais 18 animais apresentaram o genótipo homozigoto M1M1, com frequência de 0,46, 4 animais apresentaram o genótipo homozigoto M2M2, com frequência de 0,10 e 17 animais apresentaram genótipo heterozigotos M1M2, com frequência de 0,44. As frequências alélicas, obtidas por contagem direta, resultou na frequência de 0,68 para o alelo M1 e 0,32 para o alelo M2. Através do teste de qui-quadrado foi possível constatar que essa população encontra-se em equilíbrio para o polimorfismo analisado. O tipo de polimorfismo encontrado pela equipe pode ser uma deleção ou inserção de poucos nucleotídeos, sendo necessário realizar o sequenciamento dos fragmentos para caracterizar o polimorfismo.

Em bovinos, a perda de atividade funcional da miostatina está associada com a musculatura dupla (GROBET et al., 1997). No gado Belgian Blue, uma deleção de 11 bp do gene da miostatina resulta numa proteína truncada, pois a transcrição termina 14 códons a jusante do local de mutação, resultando em um fenótipo de musculatura dupla e carcaças de maior interesse para a indústria da carne (MCPHERRON e LEE, 1997). Foi identificado um polimorfismo de microssatélite no primeiro intron do gene da miostatina bovina, este polimorfismo é caracterizado por uma repetição de número variável de uma base, cujas variantes apresentam de 12 a 21 repetições dentro e entre algumas raças bovinas (XOCHITL et al., 2006). Farhadian et al. (2011) avaliaram polimorfismo no gene da miostatina em ovelha Makoei através da técnica de SSCP no intron 1, e encontrou 5 alelos distintos, porém, o mesmo autor não sequenciou a região e não fez associação dos mesmo com características produtivas. No presente trabalho também foi encontrado a mutação no intron 1 sendo necessário o sequenciamento para identificar se o polimorfismo corresponde a um dos polimorfismos identificados por algum dos autores citados acima.

A população avaliada encontra-se em equilíbrio Hardy-Weimberg, provavelmente pela ausência de pressão de seleção para genes relacionados com musculatura, visto que o rebanho é considerado com aptidão para leite.

#### **4.1.4 Gene do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*)**

Os fragmentos obtidos por PCR apresentaram 363pb como esperado, de acordo com os dados divulgados por Liu et al. (2010) os quais analisaram a região do éxon 4 e região parcial do íntron 4 em cabras de raças chinesas. Os autores encontraram um SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) referente a transição G>C na posição 5752, localizado no íntron 4. Esse SNP resulta na formação de um sítio de corte GG/CC pela enzima *Hae* III. Como resultado da técnica de PCR-RFLP os fragmentos amplificados com 363pb foram digeridos e os fragmentos que ficaram intactos com 363pb foram denominados de alelo A, já os fragmentos que apresentaram um sítio de corte foram denominados de alelo B, por gerar dois fragmentos, um com 264pb e outro com 99pb devido a ação da enzima de restrição. Os indivíduos com genótipo heterozigoto AB apresentaram as 3 bandas: a de 363 pb, a de 264 e a de 99pb, conforme pode ser visualizado na Figura 4.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, produto de digestão pela enzima *HaeIII* dos fragmentos amplificados com o primer *IGF-1*. Canaleta 1 = Marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia), canaleta 2 = produto da PCR sem digestão apresentando (SD) 363pb; canaletas 3, 5, 6, 7, 8, 10 e 11 = animais homocigoto BB apresentando os fragmentos de 264 e 99 pb, frutos da digestão pela enzima *HaeIII*, canaletas 4 e 9 = animais heterocigotos apresentando o fragmento de 363 pb referente ao alelo A e os fragmentos de 264 e 99 pb referente ao alelo B;

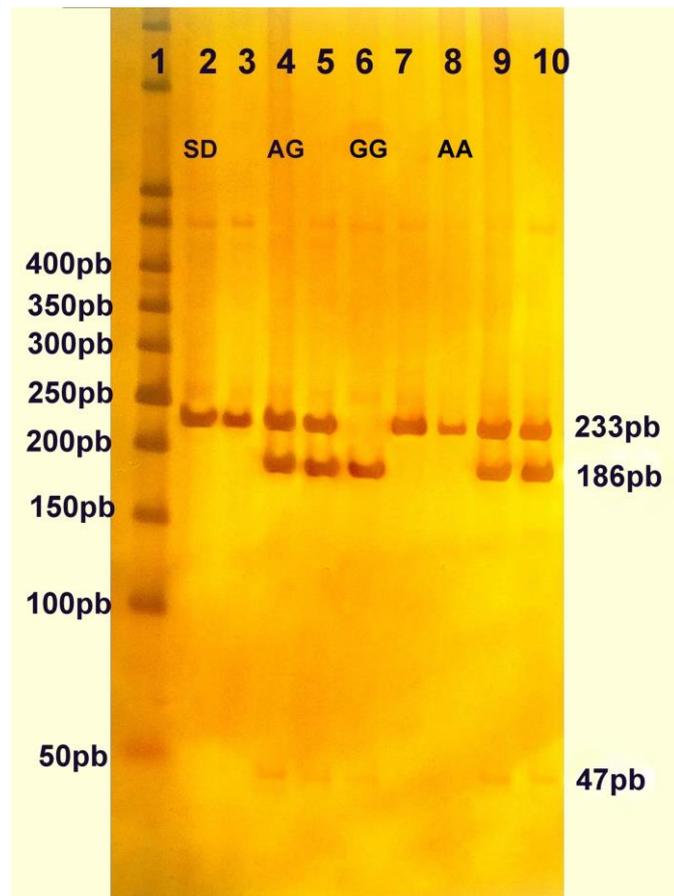
Com a utilização da técnica descrita por Liu et al., (2010) foi possível detectar o polimorfismo nesta população experimental porém, a frequência do alelo A foi baixa (0,05), estando presente em apenas 2 animais em heterocigose (ausência de animais homocigotos AA). Neste estudo dos 40 animais genotipados, 38 eram homocigotos para o alelo B (frequência alélica de 0,95). Estas frequências foram bem diferentes do que foi encontrado por Liu et al, (2010) na raças chinesas, nas quais as frequências para o alelo A e alelo B foram de 0,395 e 0,605 para a raça Xinjiang e de 0,606 e 0,394 para a raça Nanjiang Cashmere, respectivamente. Foi proposto pelos autores a associação com outras características, relacionadas à produção de cashmere, mas que não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

Rangel (2015) avaliou o mesmo polimorfismo em fêmeas da mesma população analisada neste trabalho e encontrou uma frequência alélica de 0,11 para o alelo A e 0,89 para o alelo B. Quanto ao genótipo a autora encontrou a frequência de 0,04 para os animais homocigotos AA, 0,14 para o genótipo heterocigoto AB e 0,82 para o genótipo homocigoto para o alelo BB, esta população não se encontra em equilíbrio. Os resultados obtidos pelo autor citado acima mostram uma pressão de seleção em relação ao alelo B o que não foi explicado pelas correlações avaliadas no estudo, pois não apresentou associação significativa com as características estudadas de produção total de leite, extrato seco, gordura, lactose, proteína, duração da lactação e contagem de células somáticas.

Deng et al., (2010) avaliaram polimorfismos no *IGF1* em 708 cabras chinesas de raças leiteiras (Guanzhong e Xinong Saanen). Entre os polimorfismos descritos o autor avaliou o polimorfismo g.5752 G>C D26119.2, mesmo polimorfismo avaliado no presente trabalho. O autor identificou os alelos de acordo com o nucleotídeo presente na mutação, em que o alelo G apresenta o nucleotídeo guanina na posição 5752 e o alelo C apresenta o nucleotídeo citosina na posição 5752, denominado por Liu et al, (2010) como alelo A e B respectivamente e por convenção mantivemos a mesma denominação deste último autor. Ainda os mesmos autores, as cabras leiteiras Xinong Saanen com o genótipo CG apresentaram corpos mais longos e a circunferência torácica foi maior em comparação com cabras Guanzhong com o genótipo GG ( $p < 0,05$ ). Nas cabras leiteiras de Xinong Saanen com o genótipo CC, as produções de leite foram significativamente maiores durante a primeira e segunda lactação ( $p < 0,05$ ).

#### **4.1.5 Gene do fator nuclear 1 C2 (*NFI-C2*)**

Como resultado da amplificação pela técnica de PCR utilizando os *primers* divulgados por Wang et al. (2011) foi possível amplificar um fragmento contendo 233pb, referente ao intron 4. O *NFI-C2* em caprinos está localiza-se no cromossomo 7, o mesmo é composto por 10 éxons. Os fragmentos devidamente amplificados foram submetidos a técnica de RFLP utilizando a enzima *Bst*NI que reconhece e corta a sequência CC/GG presente no alelo G resultando em dois fragmentos um com 186pb e outro com 47pb, já para o alelo A a transição G>A faz com que altere o sítio de reconhecimento pela enzima mantendo intacto o fragmento contendo 233pb, como pode ser visualizado na Figura 5.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, produtos de digestão pela enzima *Bst*NI do fragmento amplificado com o primer *NFI-C2*. Canaleta 1 = marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotecnologia), canaleta 2: produto da PCR sem digestão (SD); Canaletas 3,7 e 8 = amostras de animais homozigotos AA apresentando banda de 233pb, canaleta 6 = amostra de animal homozigoto GG apresentando 2 fragmentos: 186 e 47pb; Canaletas 4, 5, 9 e 10 = amostras de animais heterozigotos (AG) apresentando os três fragmentos.

Na população avaliada foi possível detectar o genótipo de 39 dos 40 animais através da técnica de PCR-RFLP, obtendo uma frequência genotípica de 0,18 animais com genótipo homozigoto AA, 0,51 animais com genótipo heterozigotos AG e 0,31 animais com o genótipo homozigotos GG, o que resultou em uma frequência alélica de 0,436 para o alelo A e 0,564 pro alelo G. Através do teste de Qui-quadrado com o grau de liberdade igual a 2 e o número significância (Alfa) igual a 5% foi possível constatar que a população avaliada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weimberg, o que nos leva a crer que nessa população não há uma seleção direcionada para as características de interesse econômico na produção de leite

Apesar de poucos trabalhos avaliarem a influência de polimorfismo nos fatores de transcrição da família de proteínas do fator nuclear 1 (*NFI*) em características de carne e carcaça, sabe-se da importância desse gene na regulação da transcrição gênica.

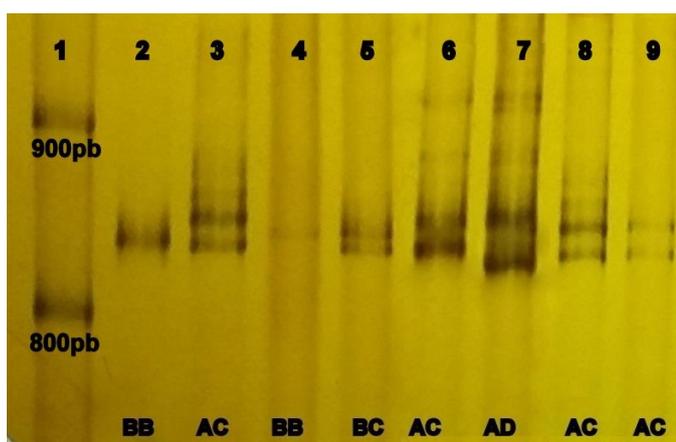
O *NFI-C2* foi avaliado por Wang et al. (2011) em três raças chinesas Xinong Saanen, Guanzhong e Xinjiang cashmere e correlacionado com características de produção de leite. As frequências alélicas encontradas no presente trabalho foram semelhantes a frequência obtida por pelos autores citados acima com a raça Xinong Saanen que apresentou a frequência de

0,450 para o alelo A e 0,550 para o alelo G e ainda com a raça chinesa Guanzhong que apresentou a frequência de 0,505 para o alelo A e 0,495 pro alelo G, porém bem distinto da frequência encontrada na raça Xinjiang cashmere que apresentou a frequência de 0,176 para o alelo A e 0,824 para o alelo G.

O fato da proximidade dos valores das frequências alélicas da população analisada com as populações chinesa pode estar ligado com a aptidão leiteira dos animais e a diferença com a raça Xinjiang cashmere pode ser explicada por serem animais com aptidão distinta onde o alelo G que apresenta maior frequência na população pode estar relacionado com alguma característica de interesse econômico para produção lã e pode ter sofrido algum tipo de seleção. Com base nesta observação torna-se interessante avaliar esse polimorfismo em indivíduos de raças com aptidão para corte.

#### 4.1.6 Proteína transportadora de ácidos graxos (FATP);

Utilizando o primer descrito por Bagatoli (2015) foi possível amplificar um fragmento com aproximadamente 850pb correspondente a região promotora do gene *FATP* por intermédio da técnica de PCR. Assim como descritos pelos autores, foram observados 4 tamanhos diferentes de fragmentos, denominados de alelo A, B, C e D, como pode ser observado na Figura 6.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, a 160 volts por 16 horas, referente aos amplicons do gene *FATP* com aproximadamente 850pb que variaram em tamanho, com 4 variantes A, B, C e D. Canaleta 1 = marcador de 100 pb (New England Biolabs). Canaleta 2 e 4 = genótipo BB, canaletas 3, 6, 8 e 9 = genótipo AC, canaleta 5 = genótipo BC e canaleta 7 = genótipo AD.

Foi possível identificar o genótipo de 38 animais dos 40 animais avaliados no trabalho (Tabela 3). O genótipo mais frequente foi o BB seguido do BC e os menos frequentes foram os genótipos CC e CD. Através do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com o grau de liberdade igual a 7 e em valores críticos de 5%, foi observado que esta população não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Bagatoli (2012) analisou fêmeas da mesma população encontrou a frequência alélica de 0,25 para o alelo A, 0,26 para o alelo B, 0,24 para o alelo C e 0,25 para o alelo D, não estando essa população em equilíbrio para a região gênica avaliada, tendo encontrado como

genótipo mais abundante o genótipo BC e os menos abundantes os genótipos AB e CC. Segundo o mesmo autor possivelmente alguma força de seleção esteja atuando sobre esta característica, considerando que estes animais são de alta produção e possivelmente tenham sido selecionados para as características de produção leiteira. Os homozigotos BB e AA apresentaram efeito positivo maior em relação ao homozigoto CC e o heterozigoto AC, que parecem ter efeitos negativos sobre as porcentagens de lactose. Nas porcentagens de proteína do leite, o genótipo CC teve a maior porcentagem, enquanto o genótipo CD, para esta característica, apresentou menor valor médio ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Frequências genotípicas e alélicas do FATP.

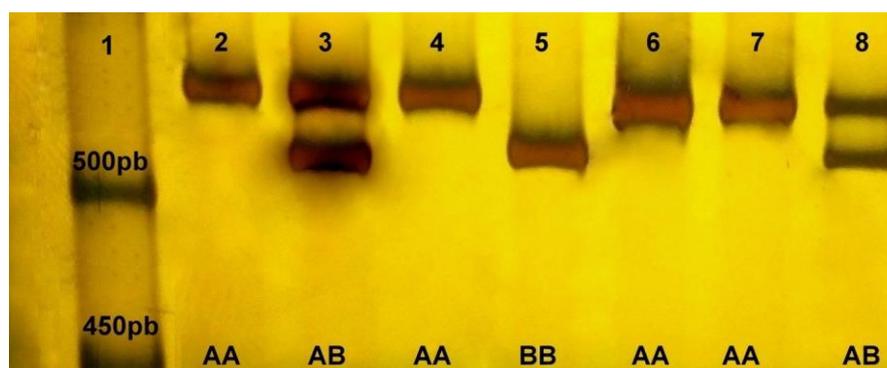
Genótipo	N	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica
AB	7	0,184	A	0,185
AC	4	0,105	B	0,510
AD	3	0,079	C	0,200
BB	10	0,263	D	0,105
BC	8	0,211		
BD	4	0,105		
CC	1	0,026		
CD	1	0,026		
TOTAL	38	1		1

#### 4.1.7 Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR $\gamma$ ).

Como resultado da técnica de PCR foi possível amplificar um fragmento com aproximadamente 550 pb referente ao amplicon da região promotora do gene PPAR $\gamma$ . Constatou-se um polimorfismo de tamanho de fragmento com uma diferença de aproximadamente 20 pb. O fragmento de maior tamanho foi denominado no presente trabalho de alelo A e o fragmento de menor tamanho de alelo B (Figura 7). Há a necessidade de realizar o sequenciamento para identificar a real diferença entre esses alelos.

Dos 40 animais avaliados foi possível identificar o genótipo de 38 animais, sendo que o genótipo heterozigoto AB foi o mais frequente na população avaliada apresentando uma frequência de 0,526, seguido do genótipo homozigoto AA apresentou a frequência de 0,421 enquanto o genótipo homozigoto BB foi o menos frequente apresentou uma frequência de 0,053. A frequência alélica foi obtida por contagem direta apresentando o alelo A uma frequência de 0,684 e o alelo B uma frequência de 0,316.

Com base nas frequências alélicas foram calculadas as frequências esperada para cada genótipo nesta população e através do teste de Qui-quadrado e foi possível constatar que essa população se encontra em equilíbrio H-W, o que indica que esta população não está sofrendo seleção sobre essa região gênica.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 15%, 160 volts por 16 horas, referente aos amplicons do gene *PPAR $\gamma$* . Canaleta 1 = marcador de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Canaletas 2, 4, 6 e 7 = genótipo homocigoto AA, canaletas 3 e 8 = genótipos heterocigotos AB, canaleta 5 = genótipo homocigoto BB.

Wu et al. (2006) investigaram um polimorfismo do tipo SNP no gene *PPAR $\gamma$* , resultando na troca de uma G para A na posição 646 do exon 5 em galinha, causando uma substituição de aminoácidos Asp por Asn na posição 216. No estudo foram utilizados 856 animais sendo 2 linhagens de poedeiras, 1 linhagem de corte e 3 linhagens chinesas sem dados de aptidão. As frequências de alelos e genóticas foram significativamente diferentes entre 6 raças de frango ( $P < 0,01$ ). O peso da gordura abdominal às 12 semanas de idade para aves com genótipo GG foi 34,26 e 28,71% maior do que aqueles com genótipos AA e AG, respectivamente ( $P < 0,01$ ), indicando que o polimorfismo poderia ser usado como marcador molecular potencial para a seleção da característica gordura abdominal sem interferir na taxa de crescimento de galinhas. Não encontramos na literatura nenhum trabalho correlacionando polimorfismo nesse gene com qualidade da carne e característica de peso em caprino.

#### **4.2 Associação dos Genótipos com as Características de Peso ao Abate (PA), Peso da Carcaça (PC) e Força de Cisalhamento (FC)**

Todos os polimorfismos encontrados foram testados para verificar se os diferentes genótipos apresentam associações com as características sob análise. Assim, os valores de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e Maciez (expresso em força de cisalhamento FC) foram avaliados em cada genótipo dos genes *GH*, *DGAT1*, *MSTN*, *IGF1*, *PPAR $\gamma$* , *FATP* e *NFI-C2*. Os resultados das análises estão descritos na Tabela 4.

Com relação especificamente ao polimorfismo do *GH*, a característica de peso ao abate apresentou diferença significativa entre os grupos com genótipo AA e AB, constatado pelas análises de variâncias, testes de Tukey e pelos contrastes estimados ( $P > 0,05$ ), de forma que o grupo com genótipo AB apresentou maior média de peso ao abate (30,64 Kg) quando comparado com os animais do grupo AA (27,86 Kg), ainda foi possível observar que o genótipo AB também apresenta uma diferença considerada sugestiva para peso da carcaça em relação ao genótipo AA ( $P=0,0636$ ) o que corrobora com os dados obtido em Garcia (2012) em que os dados de correlação mostraram um valor alto e positivo entre o peso ao abate (PA) e peso da carcaça (PC), o que seria esperado, visto que quanto maior o peso do animal ao abate, maior também será o peso da carcaça ( $P < 0,05$ ).

Hua et al., (2009) constataram que cabras da raça Boer (com aptidão para carne) com genótipo heterozigoto AB pesaram cerca de 2 kg a mais em relação aqueles com genótipo AA ao desmame, e mediram cerca de 1,4 cm a mais no perímetro torácico ao nascimento do que aquelas com genótipo AA ( $P < 0,05$ ). É possível observar uma pressão de seleção para o genótipo AB na população com aptidão para carne avaliada por Hua et al., (2009) o que pode estar intimamente ligada ao fato desses animais apresentarem escores superiores para características de crescimento e qualidade de carcaça, o mesmo não acontece com as populações de raças leiteira avaliadas por Melo (2012) e pela nossa equipe, cujas população encontram-se em equilíbrio. A autora constatou que o polimorfismo analisado não estava relacionado a nenhuma das características de produção e qualidade do leite avaliadas no estudo, como a produção de leite até os 270 dias de lactação, duração da lactação, escore de células somáticas, porcentagens de gordura, proteína, lactose e extrato seco total no leite.

O genótipo heterozigoto AB apresentou os melhores escores para peso ao abate ( $P < 0,05$ ) e apesar de não ter sido significativo o mesmo apresentou maior média de peso da carcaça e menor valor força de cisalhamento que ficaram próximo o limite, resultando em uma carne mais macia, podendo o polimorfismo ser utilizado em rebanhos leiteiro, melhorando assim as características de crescimento, qualidade da carne e da carcaça sem afetar as características de qualidade e produção de leite.

Ainda com relação ao peso ao abate, o polimorfismo no intron 1 do gene da miostatina também apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos homozigotos M2M2 e heterozigoto M1M2 para esta característica, em que indivíduos com genótipo M2M2 (32.87 Kg) apresentou maior média de peso ao abate do que os indivíduos com genótipo M1M2 (27.82Kg), enquanto os indivíduos com genótipo M1M1 (29.27 Kg), não diferiu significativamente dos demais (Tabela 4). A mesma diferença foi observada entre os genótipos para peso da carcaça. Apesar não ser significativa, isso se deve a correlação alta e significativa entre PA e PC. Outros autores descrevem polimorfismo no gene da miostatina influenciando nas características de carcaça de animais como em roedores (MCPHERRON et al., 1997) e bovino (GROBET et al., 1997).

McPherron et al. (1997), inativaram o gene que codifica essa proteína em ratos, levando à perda da função do gene. Como resultado, obtiveram animais transgênicos que produziam miostatina não funcional. Os descendentes destes animais eram homozigotos para o gene alterado, homozigotos para o gene normal ou heterozigotos. A principal diferença nos fenótipos destes indivíduos era a massa muscular. O animal mutante homozigoto foi duas a três vezes maiores que seus irmãos heterozigotos ou normais, machos e fêmeas são afetados igual e proporcionalmente.

A sequência da miostatina da raça bovina Belgian Blue apresenta deleção de 11 pb no exon 3, inativando toda a molécula da miostatina, e causando a hipertrofia muscular em animais da raça Belgian Blue (GROBET et al., 1997). O fato de este polimorfismo apresentar uma diferença significativa em relação ao peso ao abate em caprinos de origem leiteira torna-o interessante para ser analisados em caprinos com aptidão para a carne, visto que não foram encontrados trabalhos de identificação de polimorfismo no gene da miostatina em caprino.

Com relação a maciez da carne, mensurada por intermédio da força de cisalhamento, houve diferença significativa entre os dois grupos de genótipos obtidos para o gene do *IGF-1*, em que o genótipo heterozigoto AB apresentou maior força de cisalhamento, o que resulta em uma carne menos macia, quando comparado aos animais com genótipo BB, ainda os animais com genótipo BB apresentaram diferença quanto a média de peso da carcaça, que foi de 13,80 Kg em relação aos animais com genótipo AB que foi de 11,24 Kg bem próximo do limite de significância ( $P = 0,0769$ ). No trabalho de Liu et al. (2010) o mesmo polimorfismo descrito em

duas raças de cabras chinesas, Xinjiang e Nanjiang cashmere, no entanto, foi proposta associação com outras características, relacionadas à produção de cashmere, mas que não foram significativas ( $p>0,05$ ).

Zhang et al. (2008) identificaram um SNP no gene *IGF-1* e avaliaram sua associação com características de crescimento em caprinos da raça Nanjiang Huang. O polimorfismo, uma transversão de G para C no íntron 4 foi verificado em 592 animais. As maiores medidas corporais e de peso dos animais estavam associadas significativamente com o genótipo homocigoto CC. Assim, segundo os mesmos autores, a seleção do genótipo CC pode ser mais vantajosa para características de crescimento em caprinos Nanjiang Huang indicando que esse polimorfismo no gene *IGF-1* pode ser um potencial marcador molecular para as características de crescimento nesta raça. Este polimorfismo não é o mesmo relatado no presente trabalho, mas também se refere a um polimorfismo de no intron 4.

Não foi encontrado na literatura analisada nenhum trabalho em caprino em que foi associado polimorfismo no *IGF-1* com a característica de maciez da carne, pelo fato do gene estar relacionado com mobilidade de gordura, torna interessante essa análise mais detalhada em caprinos de corte visto que os valores foram significativos no presente trabalho.

Nenhum efeito dos genótipos dos genes *DGAT1*, *NF1*, *FATP1* e *PPAR $\gamma$*  sobre características de peso ao abate, peso da carcaça e maciez foi observado pelas análises de variâncias, testes de Tukey e pelos contrastes estimados ( $P>0,05$ ), de forma que os polimorfismos avaliados neste estudo não são indicados como marcador para seleção dos animais com melhor desempenho para as características avaliadas. Entretanto, estes mesmos genes podem apresentar polimorfismos em outras regiões que podem estar associados com as características de interesse zootécnico. Para tanto, outros estudos devem ser conduzidos para verificar esta possibilidade.

**Tabela 4.** Associação das características avaliadas de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC) em função dos genótipos dos genes *GH*, *IGF-1*, *DGAT*, *MSTN*, *FATP*, *NFI* e *PPAR*.

Gene	Genótipo	N	PA		PC		FC	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>GH</i>	AA	23	27.86 <sup>b</sup>	3.81	13.17	1.95	3.02	0.52
	AB	17	30.64 <sup>a</sup>	3.92	14.35	1.90	2.814	0.39
<i>IGF-1</i>	AB	2	26.10	0.20	11.24	1.24	3.69 <sup>a</sup>	0.57
	BB	38	29.20	4.10	13.80	1.96	2.89 <sup>b</sup>	0.45
<i>DGAT</i>	AA	7	27.90	2.70	13.18	1.25	2.80	0.46
	AB	13	29.21	4.06	14.00	1.99	2.81	0.23
	BB	20	29.33	4.52	13.63	2.24	3.06	0.58
<i>MSTN</i>	M1M1	18	29.28 <sup>ab</sup>	3.80	13.77	2.09	2.91	0.46
	M1M2	17	27.82 <sup>b</sup>	3.86	13.14	2.00	3.00	0.49
	M2M2	04	32.87 <sup>a</sup>	3.97	15.84	1.31	3.23	0.66
<i>FATP</i>	AB	7	27.44	4.59	12.52	2.21	2.95	0.67
	AC	4	30.88	4.73	14.82	1.77	2.68	0.42
	AD	3	28.83	6.71	14.56	3.69	3.59	0.65
	BB	10	28.14	3.89	13.30	1.76	2.90	0.43
	BC	8	29.50	4.47	13.47	2.01	2.76	0.30
	BD	4	29.63	2.06	14.00	0.83	3.00	0.12
<i>NFI</i>	GG	12	28.87	4.33	13.47	1.95	2.93	0.37
	AG	20	29.70	4.26	14.05	2.04	3.02	0.56
	AA	7	27.80	3.26	13.08	2.16	2.63	0.31
<i>PPAR</i>	AA	16	29.06	4.74	13.61	1.89	2.79	0.42
	AB	20	28.48	3.37	13.52	2.03	3.01	0.52
	BB	2	34.50	2.12	16.38	0.53	2.97	0.21

<sup>a, b</sup> Valores de medias dentro da coluna com letras sobrescritas foram significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), N=número de indivíduos, DP=desvio padrão.

Visto que nas análises iniciais observou-se que tanto o polimorfismo do *GH* quanto do *MSTN* tiveram diferenças para o PA, foram realizadas análises de as associações de alguns genótipos combinados, como *MSTN/PPAR $\gamma$* , *GH/NFI*, *DGAT1/PPAR $\gamma$* , *GH/DGAT1*, *GH/PPAR $\gamma$*  e *GH/MSTN* com as características de peso ao abate, peso da carcaça e força de cisalhamento como apresentado na Tabela 5.

A combinação dos genótipos dos genes avaliados não apresentou diferença estatística entre os genótipos para nenhuma das características de analisadas. Para essas análises foram deixados de fora os genes *FATP1* e *IGF1*, o primeiro por ser altamente polimórfico e o segundo devido ao baixo número de indivíduos encontrados em uma das classes genotípicas, o que impossibilitou encontrar número suficiente de animais em cada tipo de combinação.

**Tabela 5.** Associação das características avaliadas de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC) em função dos genótipos combinados dos genes *MSTN/PPAR $\gamma$* , *GH/NF1*, *DGAT1/PPAR $\gamma$* , *GH/DGAT1*, *GH/PPAR $\gamma$*  e *GH/MSTN*.

Combinação gênica	Genótipos Combinados	N	PA		PC		FC	
			Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>MSTN/PPAR<math>\gamma</math></i>	M1M1AA	4	30.50	4.65	14.20	1.61	2.79	0.23
	M1M1AB	12	28.83	3.66	13.67	2.19	2.96	0.55
	M1M2AA	10	26.85	2.98	12.78	1.47	2.72	0.38
	M1M2AB	5	27.30	3.49	12.94	2.28	2.93	0.61
<i>GH/NF1</i>	AAAA	6	26.11	2.44	12.46	1.12	2.84	0.38
	AAAB	13	29.07	4.37	13.77	2.27	3.16	0.60
	AABB	3	26.50	2.78	12.09	1.45	2.71	0.18
	ABAA	6	31.61	4.13	14.47	2.15	3.02	0.37
	ABAB	7	30.85	4.09	14.55	1.54	2.77	0.35
	ABBB	4	28.77	3.62	13.81	2.49	2.57	0.39
<i>DGAT1/PPAR<math>\gamma</math></i>	AAAA	4	26.70	2.22	12.62	1.23	2.66	0.46
	AAAB	3	29.50	2.78	13.92	0.98	2.97	0.48
	ABAA	4	29.92	5.20	13.74	2.06	2.77	0.19
	ABAB	8	28.00	2.84	13.78	1.95	2.79	0.23
	BBAA	8	29.81	5.49	14.03	2.08	2.86	0.49
	BBAB	9	28.55	4.15	13.16	2.43	3.21	0.66
<i>GH/DGAT1</i>	AAAA	2	28.60	0.56	13.58	0.11	2.77	0.05
	AAAB	6	27.25	3.18	13.49	1.67	2.79	0.28
	AABB	14	28.10	4.49	12.99	2.29	3.13	0.61
	ABAA	4	27.90	3.67	13.08	1.71	2.70	0.59
	ABAB	7	30.88	4.16	14.43	2.26	2.83	0.18
<i>GH/PPAR<math>\gamma</math></i>	AAAA	9	28.18	4.39	13.25	1.65	2.89	0.42
	AAAB	14	28.07	3.69	13.36	2.12	3.07	0.60
	ABAA	7	30.18	5.27	14.06	2.19	2.65	0.39
	ABAB	6	29.41	2.45	13.90	1.91	2.86	0.23
<i>GH/MSTN</i>	AAM1M1	10	28.55	3.78	13.52	2.23	3.03	0.57
	AAM1M2	10	26.17	2.87	12.43	1.56	2.87	0.48
	AAM2M2	3	31.16	5.03	14.43	1.66	3.47	0.28
	ABM1M1	8	30.18	3.87	14.08	2.00	2.75	0.20
	ABM1M2	7	30.18	3.72	14.26	1.91	2.85	0.54

<sup>a, b</sup> Valores de medias dentro da coluna com letras sobrescritas diferentes foram significativamente diferentes (P<0.05).

Foram realizadas correlações das características de peso ao abate (PA) x peso da carcaça (PC), peso ao abate (PA) x força de cisalhamento (FC) e peso da carcaça (PC) x força de cisalhamento (FC) em relação aos genótipos para os genes *PPAR $\gamma$* , *NF1*, *MSTN*, *GH* e *DGAT1* os resultados estão presentes na tabela 6.

Quando analisados os dados em conjunto é possível observar que a correlação entre peso ao abate e peso da carcaça é alta, o mesmo foi encontrado em Garcia (2012) com um total de 40 machos, em que dados de correlação para essas características mostram um valor alto e positivo entre o peso ao abate (PA) e peso da carcaça (PC) que foi de 0,85 (P<0,01). Quando avaliado a correlação dessas características dentro dos diferentes genótipos ocorrem pouca diferença entre as correlações. Para os genes *NF1* e *DGAT1* é possível observar que a

correlação entre as duas características é mais alta dentro dos grupos homozigotos do que no grupo heterozigoto, já para gene do GH o grupo dos indivíduos com genótipo heterozigoto foram os que apresentaram maior correlação entre as duas características quando comparado com o genótipo homozigoto AA inversamente ao que acontece com o gene *PPAR $\gamma$*  em que o grupo que apresenta a maior correlação é o do genótipo homozigoto.

As outras correlações analisadas em conjunto como peso ao abate e força de cisalhamento e peso da carcaça e força de cisalhamento os resultados não foram estatisticamente significativos dentro dos grupos de genótipos.

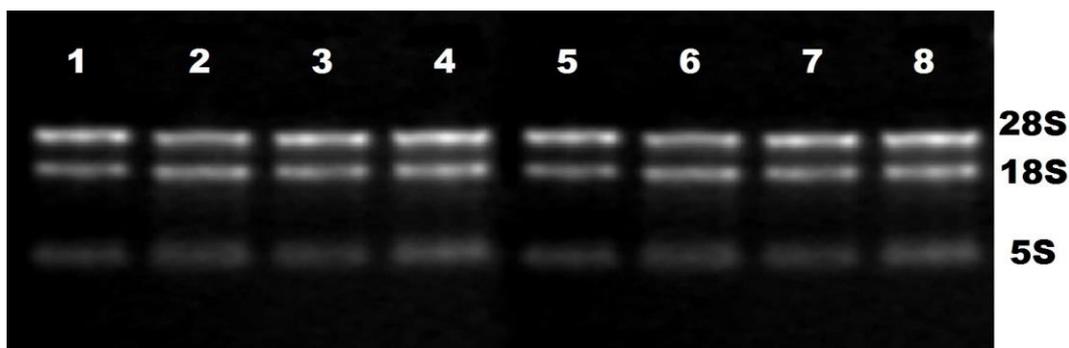
**Tabela 6.** Correlação entre as características de peso ao abate (PA) x peso da carcaça (PC), peso ao abate (PA) x força de cisalhamento (FC) e peso da carcaça (PC) x força de cisalhamento (FC) em relação aos genótipos para os genes *PPAR*, *NFI*, *MSTN*, *GH* e *DGAT*.

CORRELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS									
	PA – PC			PA – FC			PC – FC		
	AA/M1M1	AB/AG/M1M2	BB/GG/M2M2	AA/M1M1	AB/AG/M1M2	BB/GG/M2M2	AA/M1M1	AB/AG/M1M2	BB/GG/M2M2
<i>PPAR</i>	0,9739 (P<0,0001)	0,7709 (P<0,0001)	- -	0,1920 (P=0,4762)	-0,0070 (P=0,9766)	- -	0,2202 (P=0,4125)	0,1538 (P=0,5173)	- -
<i>NFI</i>	0,9697 (P<0,0001)	0,7934 (P<0,0001)	0,9637 (P=0,0005)	0,1926 (P=0,5457)	-0,0164 (P=0,9455)	0,3932 (P=0,3828)	0,2447 (P=0,4434)	-0,2013 (P=0,3948)	0,44475 (P=0,3140)
<i>MSTN</i>	0,7552 (P=0,0003)	0,9658 (P<0,0001)	0,9947 (P=0,0530)	0,0690 (P=0,7855)	0,0734 (P=0,7797)	-0,2476 (P=0,752)	-0,0084 (P=0,9737)	-0,0173 (P=0,9475)	-0,3116 (P=0,6884)
<i>GH</i>	0,7957 (P<0,0001)	0,9397 (P<0,0001)	- -	0,2149 (P=0,3247)	0,1768 (P=0,4971)	- -	0,02393 (P=0,9137)	0,2472 (P=0,3387)	- -
<i>DGAT</i>	0,9383 (P=0,0018)	0,7149 (P=0,0060)	0,9445 (P<0,0001)	0,0795 (P=0,8654)	-0,0676 (P=0,8262)	0,1363 (P=0,5665)	0,3999 (P=0,3740)	0,3643 (P=0,9060)	-0,0143 (P=0,9523)

## 4.3 Expressão gênica

### 4.3.1 Qualidade do RNA

O RNA foi avaliado quanto à sua integridade através de eletroforese em gel de agarose 0,5% corado com brometo de etídeo, como apresentado na figura 8.



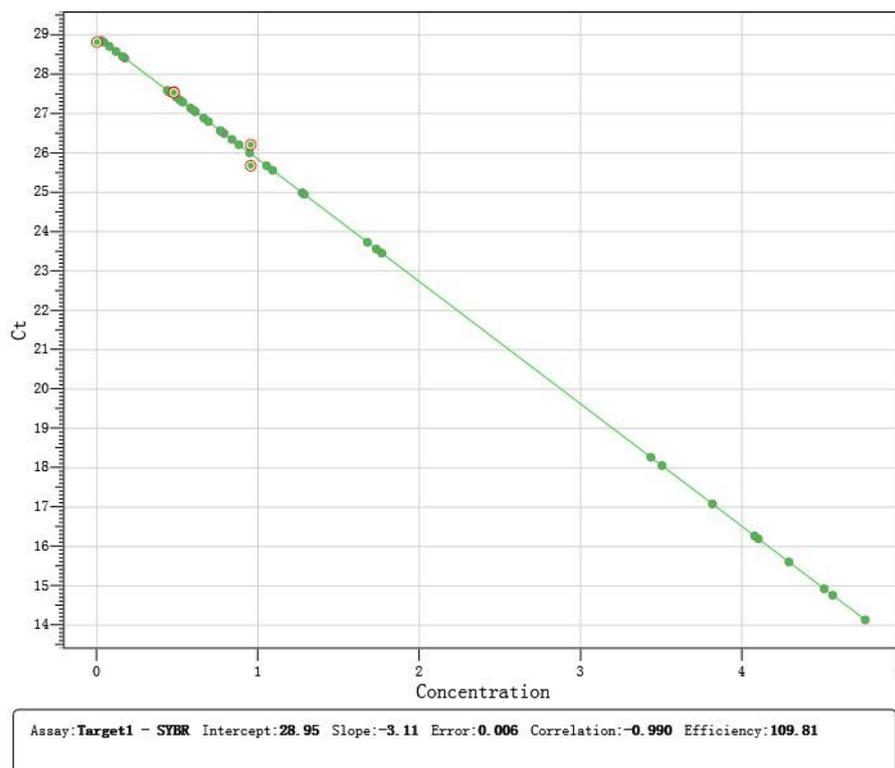
**Figura 8.** Análise de RNA por eletroforese em gel de agarose 0,5%. Canaletas 1-8 amostras de músculo de diferentes animais. 28S, 18S e 5S = subunidades ribossomais.

Como resultado da extração do RNA foi possível obter as bandas 28S, 18S e 5S referente aos RNAs Ribossomais permitindo aferir a qualidade inicial do material extraído. Após a quantificação do RNA com o auxílio do equipamento *NanoDrop* ND-2000C foi feita uma amplificação teste com primer específico para DNA, o que não resultou na amplificação de nenhum fragmento como já era esperado, indicando que não havia contaminação das amostras analisadas.

### 4.3.2 Teste de eficiência dos *primers*

Para as análises de expressão gênica, foram desenhadas duas opções de pares *primers* para alguns genes que foram selecionados conforme os testes de eficiência destes. Para esta avaliação, foi utilizado o software do próprio termociclador que permite verificar a eficiência de acordo com a inclinação da reta da equação de regressão e quanto ao coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Para alcançar o máximo de eficiência de amplificação o ideal é que o valor da inclinação seja o mais próximo de -3,32 e o coeficiente seja de 1, ou 100%.

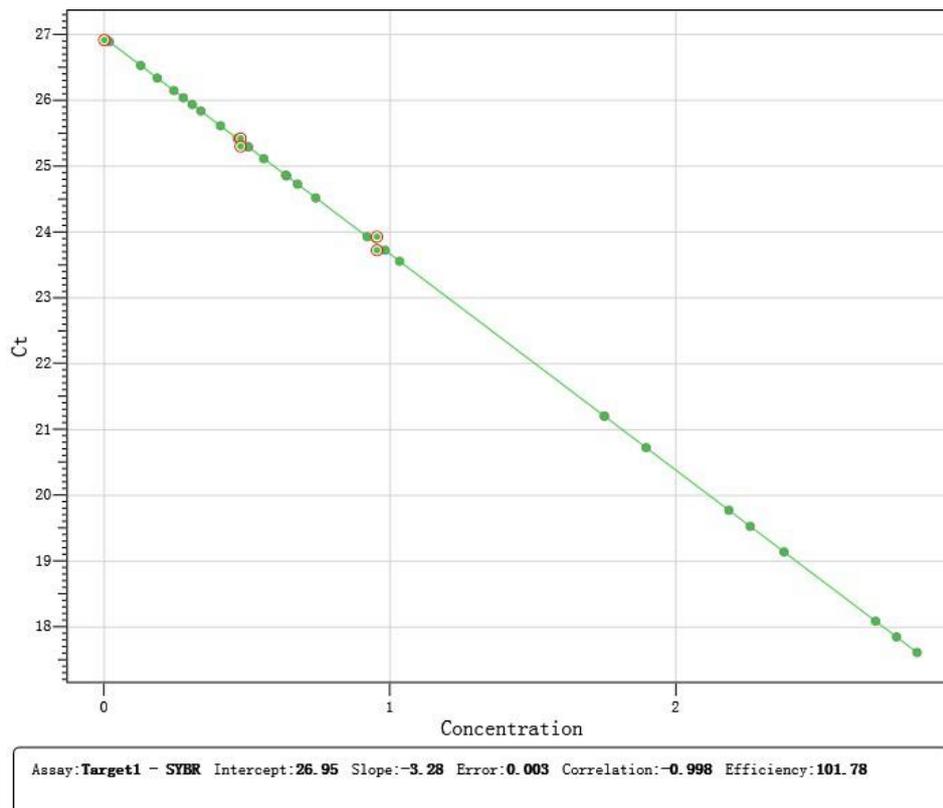
Dos dois *primers* desenhados para o *DGAT1*, o que apresentou melhores resultados para os testes de eficiência foi o primer DGAT1(1), como é possível visualizar na Figura 9.



**Figura 9.** Imagem da curva de eficiência do primer DGAT1(1).

É possível observar que o resultado da análise de eficiência para o *DGAT1*, está dentro dos padrões considerados bons para uma curva de eficiência. O valor da inclinação foi -3,11, o coeficiente de regressão foi igual a -0,99 e a eficiência da curva ficou em 109,81% próximo ao limite considerado ótimo que pode variar de 90 a 110%, segundo Kavanagh et al. (2011).

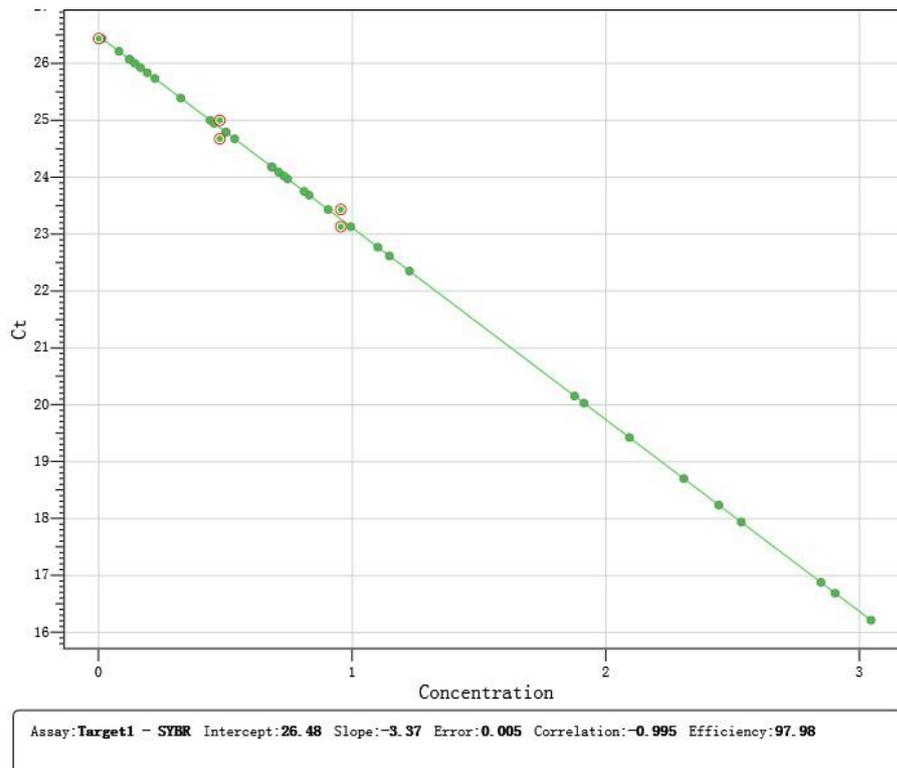
Os dois *primers* desenhados para as análises de expressão do gene da miostatina apresentaram bons resultados de eficiência então, optou-se pelo primer 1 que apresentou melhores escores como pode ser observado na Figura 10.



**Figura 10.** Curva de eficiência do gene da miostatina amplificado com o primer MSTN(1).

Os dados obtidos do teste de eficiência para o *primer MSTN(1)* ficaram muito próximos ao que é considerado excelente para as análises de expressão gênica, a curva apresentou um *slope* de -3,28, o coeficiente de regressão 0,99 e a eficiência ficou situada muito próximo de 100%.

O gene *IGF1* também apresentou uma boa eficiência para os dois pares de *primers* analisados e optou-se por utilizar o *primer IGF1(1)*, uma vez que o mesmo apresentou os melhores resultados. A curva de eficiência para o gene *IGF1* apresentou uma eficiência de 97,98%, um *slope* de -3,37 e valor de coeficiente de regressão de 0,995, como pode ser observado na Figura 11.



**Figura 11.** Curva de eficiência do gene que codifica o IGF1 amplificado com o primer IGF1(1).

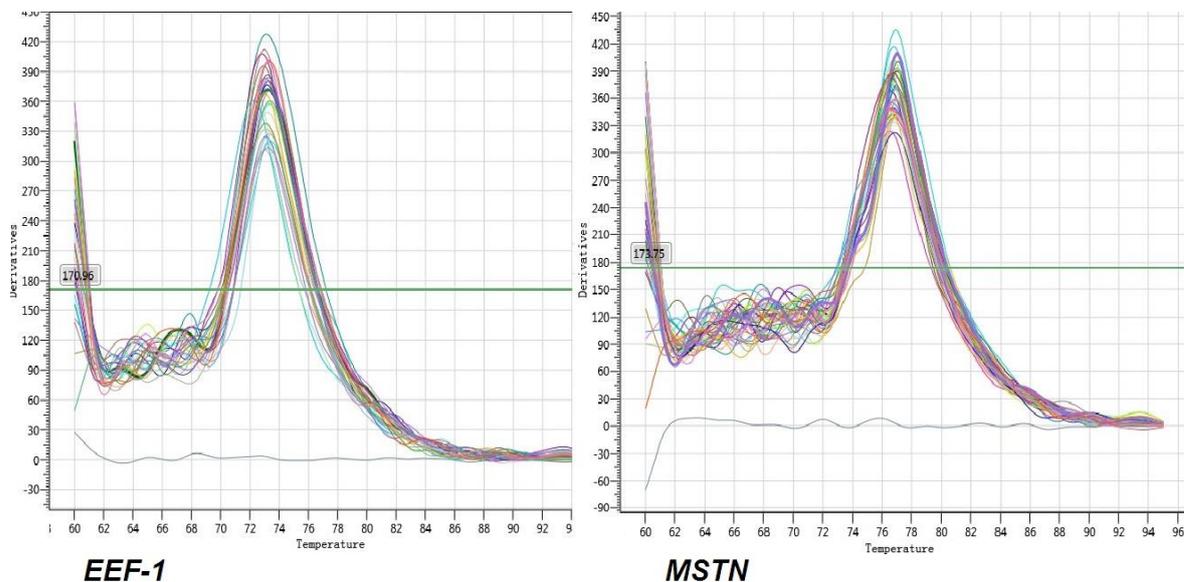
Os valores de eficiência, *slope* e coeficiente de regressão obtidos no presente trabalho para os controles endógenos *EEF1*, *HMBS* e *GAPDH* encontram-se muito próximo ao obtido por Zhang et al., (2013), que obtiveram para o gene *EEF1* a eficiência de 101,78%, *slope* de -3,29 e coeficiente de regressão igual a 0,997. Para o gene *HMBS* os mesmos autores obtiveram a eficiência de 97,63%, *slope* de -3,39 e coeficiente de regressão igual a 0,998, e por último para o gene *GAPDH* foi obtido a eficiência de 96,84%, *slope* -3,40 coeficiente de regressão igual a 0,998. Bagatoli (2015) avaliou a expressão do gene *FATP1* e obteve índices de eficiência semelhante ao obtido com o mesmo *primer* com o *slope* na faixa de -3,29 e o coeficiente de regressão de 0,997 (Tabela 7). Esses resultados mostram a facilidade de replicação dos experimentos e dos resultados de expressão obtidos pelos outros autores.

**Tabela 7.** Valores obtidos através dos testes de eficiência para os genes *EEF1*, *HMBS*, *GAPDH* e *FATP1*.

Gene	Trabalho atual			Outros autores		
	Eficiência (%)	Slope	(R2)	Eficiência (%)	Slope	(R2)
<i>EEF1</i> *	99,28	-3,34	0,990	101,78	-3,29	0,997
<i>HMBS</i> *	97,24	-3,39	0,996	97,63	-3,39	0,998
<i>GAPDH</i> *	96,96	-3,40	0,996	96,84	-3,40	0,998
<i>FATP1</i>	102,51	-3,26	0,996	±100,00	-3,29	0,997

\*= Controles endógenos, R<sup>2</sup>= Coeficiente de regressão

Além de se obter a melhor eficiência nas reações de PCR, foi preciso determinar a especificidade dos produtos da amplificação, através de uma curva de dissociação ou *melting*, realizada após a reação de RT-PCR, avaliando a dissociação do *primer* de sua sequência-alvo, conforme ocorre o aumento da temperatura. As reações não devem apresentar curvas de dissociação com picos de temperatura menores que o produto de PCR específico (formação de dímeros de *primer*) ou com mais de um pico (formação de produtos não específicos) como pode ser visualizado na Figura 12.

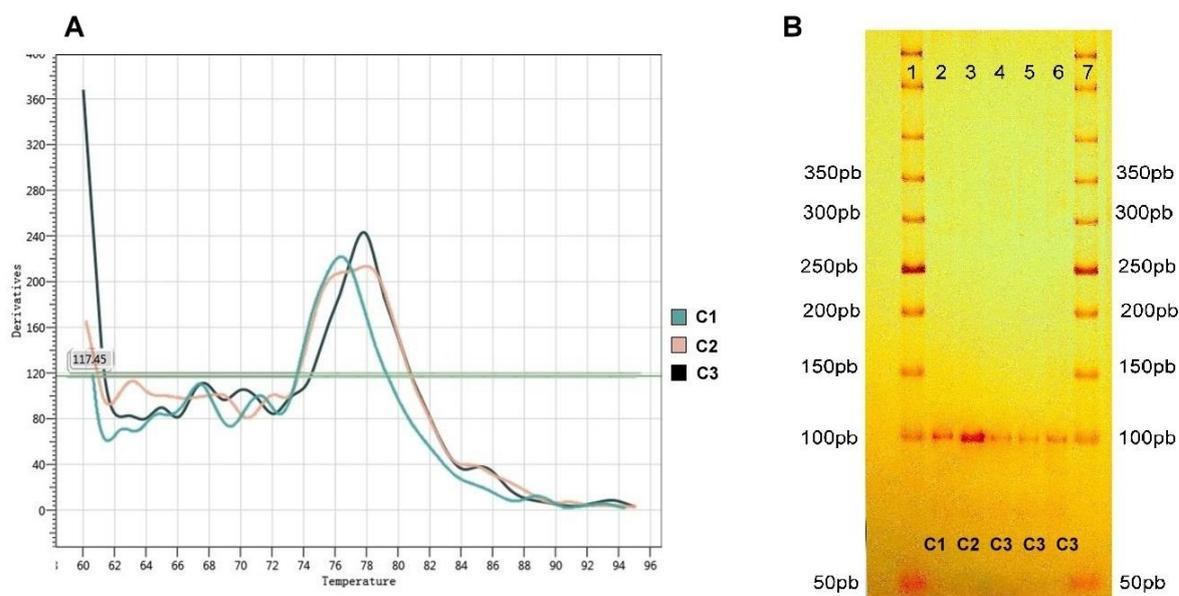


**Figura 12.** Curvas de dissociação (*melting*) obtida após a reação de qPCR, referente ao controle endógeno *EEF1* e referente a dissociação do gene alvo *MSTN*.

É possível observar através da curva de dissociação que os genes avaliados apresentaram amplificações específicas e que o gene utilizado como controle endógeno apresentou picos mais constantes o que é esperado de um bom gene endógeno.

#### 4.3.3 Curva de Melting do *DGAT*

Quando avaliado as curvas de *melting* do *DGAT*, foi possível observar 3 padrões distintos de picos, três animais apresentaram o padrão de pico denominado de C1, dois animais apresentaram o padrão de pico denominado de C2 e cinco animais apresentaram o padrão de pico denominado de C3 (figura 13 A). Após essa observação foi realizado novamente a reação de PCR em tempo real e as curvas continuaram mantendo os mesmos padrões. Para confirmar que não houve amplificação inespecífica foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (figura 13 B).



**Figura 13.** A = curvas de dissociação observadas após a reação de RT-PCR. C1, C2 e C3 apresentam 3 curvas diferentes. B = eletroforese em gel de poliacrilamida 10% resultado da amplificação do fragmento com 102 pb do DGAT.

Na canleta 2 do gel (figura 12 B), é possível observar a banda referente ao produto de amplificação do fragmento que corresponde a curva de dissociação C1 em verde no gráfico (figura 12 A), nas canletas 4, 5 e 6 bandas referentes aos produtos de amplificação dos fragmentos correspondentes às curvas de dissociação C3, em preto no gráfico. Por último, na canleta 3 observamos o padrão de banda referente ao produto de amplificação do fragmento correspondente à curva de dissociação C2, em cor rosa no gráfico. Como resultado da eletroforese foi possível identificar bandas únicas com 102 pb como era esperado, porém é possível observar uma intensidade maior do fragmento presente na canleta 3 referente a curva do tipo C2. Esta intensidade maior pode ter ocorrido por maior quantidade de fragmento nesta canleta ou ainda pela ligeira separação de dois fragmentos que variam em um par de base, dando um aspecto de banda mais grossa, quando na verdade seriam duas bandas próximas. Entretanto, o sequenciamento de bases será necessário para verificar esta possibilidade. Em caso afirmativo, teremos detectado um novo polimorfismo no *DGAT1*. Embora não tenha sido esta uma das estratégias planejadas no presente estudo, vislumbra-se a possibilidade de se utilizar o PCR em tempo real para as análises de polimorfismo.

Análise de dissociação do DNA em alta resolução (*High-resolution melting analysis*, HRM) já é utilizada para a detecção de polimorfismos e tem por objetivo discriminar produtos específicos do PCR através da temperatura de dissociação da fita dupla. O HRM usa o PCR em tempo real e faz análise da curva de dissociação. Sequências distintas apresentam domínios genéticos distintos e requerem temperaturas diferenciadas para a sua dissociação (VOSSEN et al., 2009). Quando ocorre a desnaturação do DNA a fluorescência desaparece originando a curva de *melting*. As diferenças da composição de bases do DNA podem ser detectadas e comparadas através da curva e temperatura de *melting* o que possibilita diferenciar produtos da PCR específicos dos inespecíficos e com a possibilidade de caracterizar polimorfismos de inserção, deleção e SNPs (Wittwer et al., 2003). Segundo o mesmo autor o corante mais indicado para a técnica de HRM é o LCGreen® Plus exibe uma

elevada sensibilidade para produtos da PCR, porém, é possível detectar mutações utilizando o corante SYBR Green.

#### 4.3.4 Genes de referência

A ferramenta *RefFinder* (disponível no site <http://fulxie.0fees.us/?type=reference>) forneceu uma classificação com base em quatro métodos (*Delta Ct*, *BestKeeper*, *NormFinder* e *GeNorm*), comumente utilizados para esse fim; e para cada método e gene, uma classificação foi indicada. A ferramenta online, disponível gratuitamente, também fornece uma classificação média para os genes de acordo com a estabilidade de todos os programas testados como pode ser visualizado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultado das análises obtidas por intermédio do software *Delta Ct*, *BestKeeper*, *NormFinder*, *GeNorm* e ao final Ranking gerado pelo programa *RefFinder* com base na correlação dos 4 algoritmos.

Method	Ranking Order (Better--Good--Average)		
	1	2	3
Delta CT	EEF	HMBS	GAPDH
BestKeeper	GAPDH	HMBS	EEF
Normfinder	EEF	HMBS	GAPDH
Genorm	EEF   HMBS		GAPDH
<b>Recommended comprehensive ranking</b>	<b>EEF</b>	<b>HMBS</b>	<b>GAPDH</b>

1, 2 e 3 = ranking

O algoritmo de *Delta Ct* ( $\Delta Ct$ ) permite avaliar os genes de referência mais estáveis por meio da comparação da expressão relativa de pares de genes dentro de cada amostra. De modo que quando o valor de  $\Delta Ct$  entre os pares de genes permanece constante para todas as amostras testadas, significa que esses genes de referência são expressos de forma estável entre as amostras (SILVER et al., 2006)

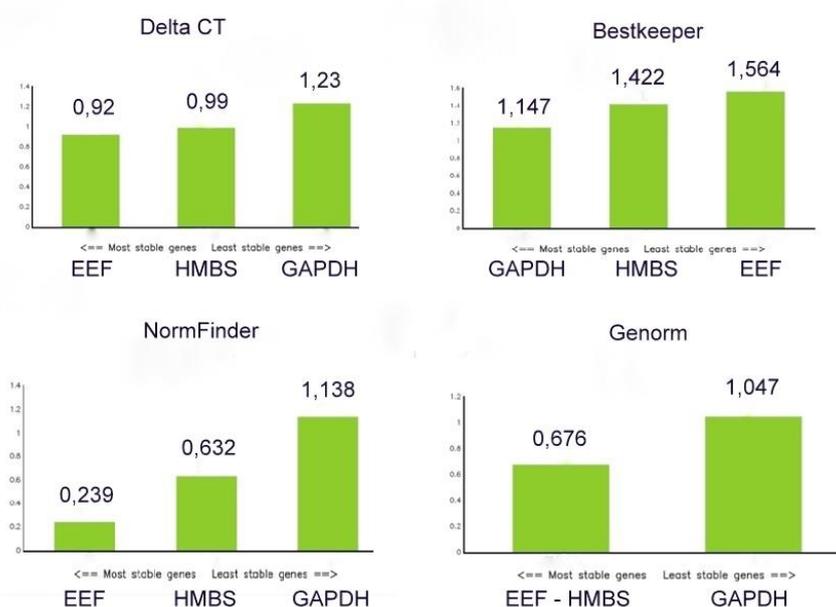
Pfaffl et al. (2004) desenvolveram um software chamado *Bestkeeper*, que possibilita analisar a estabilidade da expressão por meio da determinação os padrões mais adequados dos genes candidatos a serem utilizados como gene de referência e da combinação destes que, por sua vez, pode ser comparado com os genes alvo, a fim de decidir se os genes de referência testados são expressos diferencialmente sob um tratamento aplicado. O cálculo da variação dos genes de referência é baseado na média geométrica do valor dos Cts.

*NormFinder* é um algoritmo baseado em um modelo estatístico desenvolvido por Andersen et al. (2004), cujos autores propuseram avaliar a estabilidade dentro de grupos e entre grupos de genes. A determinação final da estabilidade do gene combina os dois valores de estabilidade, adicionando as duas fontes de variações ocorrentes, o que representa uma medida prática de erro sistemático que será introduzida quando se utiliza o gene investigado.

*GeNorm* é um software desenvolvido por Vandesompele et al. (2002), capaz de identificar, dentro de um conjunto de amostras, o gene de referência mais expresso de forma mais estável. Para a análise da estabilidade, o algoritmo *GeNorm* avalia a variação de pares (de um gene endógeno em particular com todos os genes controles testados), onde se obtém um desvio padrão para cada par de genes controles. O gene testado na combinação que apresentar menor média é considerado como o mais estável sendo que esse valor deve situar-se abaixo de 1,5 para que o gene seja considerado estável.

Com base na estabilidade da expressão para os genes endógenos foi escolhido como gene controle para as análises de expressão o *EEF1* que foi classificado por três algoritmos *NormFinder*, *GeNorm* e método  $\Delta Ct$  como o melhor gene endógeno entre os três analisados. Somente o *BestKeeper* avaliou o *GAPDH* como o melhor gene endógeno entre os genes avaliados e por último o que influenciou a escolha pelo *EEF1* foi o ranking gerado pelo programa com base nos quatro algoritmos. O programa ainda possibilita exportar os dados separadamente em forma de tabelas (Tabela 8) ou de gráficos, como mostrado na Figura 14.

Após a escolha do *EEF1* como gene referência, foi verificado ainda se a expressão deste gene varia em relação aos dois grupos de animais a serem avaliados para a expressão dos diferentes genes. O primeiro grupo consta de cinco animais com maior peso ao abate e o outro grupo é formado por cinco animais com menor peso. Não houve diferença na expressão gênica entre os grupos.



**Figura 14.** Rankings dos genes de referência analisados pelo algoritmo Delta Ct, BestKeeper, NormFinder e GeNorm para os genes *EEF1*, *HMBS* e *GAPDH*.

Zhang et al., (2013) utilizaram o algoritmo *GeNorm* para classificar os genes endógenos para vários tecidos. Segundo a classificação dos autores, o melhor gene para ser utilizado como endógeno em tecido muscular de caprino é o *GAPDH* seguido do *EEF1* em segundo lugar e o *HMBS* em terceiro lugar.

Para ser utilizado como controle endógeno, o gene não pode apresentar diferenças de expressão entre os tratamentos do experimento. Neste sentido, o gene *EEF1* pode ser utilizado como controle endógeno para a expressão gênica em músculo de animais em fase de crescimento.

#### 4.3.5 Composição das análises de expressão

A expressão dos genes *MSTN*, *DGATI*, *IGF1* e *FATP* foram avaliados nos dois grupos de animais, separados com base em suas diferenças de peso ao abate, como mencionado anteriormente. Houve diferença significativa entre os grupos de maior e menor peso ao abate,

para as características de PA e PC ( $p < 0,05$ ), o que era esperado, pois a correlação entre as duas medidas é alta e significativa como já discutido anteriormente, já a característica de força de cisalhamento não diferiu significativamente entre os dois grupos analisados.

**Tabela 9.** Médias, desvio padrão e P valor para as características de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento da carne (FC) dentro nos dois grupos com maior e menor peso.

	Maior n=5	Menor n=5	P valor
PA	31,10±3,68 <sup>a</sup>	23,82±1,96 <sup>b</sup>	0,004
PC	14,19±2,23 <sup>a</sup>	11,00±1,02 <sup>b</sup>	0,019
FC	3,26±0,83	2,65±0,69	0,246

\*Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresenta diferença significativa estatisticamente (a,b).

As medidas de carcaça servem para caracterizar o produto e apresentam alta correlação com seu peso, podendo ser utilizadas como indicador de características de carcaça (BUENO et al., 1998). Segundo Stanford et al. (1995) o rendimento da carcaça é um parâmetro importante na comercialização da carne, é um indicador da disponibilidade de carne ao consumidor. Para calcular o rendimento da carcaça utiliza-se a fórmula  $R = PC/PA \times 100$ , em que R é o rendimento, PC é o peso da carcaça e PA é o peso ao abate. Foi encontrado um rendimento de carcaça de 46% e 45% para o grupo de menor e maior peso, respectivamente. Silva Sobrinho (2006) observou o efeito do peso ao abate nas diferentes características de carcaça de caprinos abatidos nas faixas de 20, 25 e 30kg. O autor concluiu que o rendimento e a conformação da carcaça de caprinos aumentam à medida que aumenta o peso de abate dos animais até os 25kg. O mesmo resultado foi obtido por Oliveira et al. (2008) com animais mestiços Anglo-Nubiano, Boer e SRD.

Bueno et al. (1997) analisaram cabritos mestiços Moxotó e Canindé e observaram que o aumento do peso vivo de 18,82kg para 25,17kg resultou no aumento do rendimento da carcaça de 46,0 para 48,1%. Pereira Filho et al. (2005), trabalhando com cabritos mestiços Boer x Saanen com peso ao abate de 25 kg, encontraram a variação de 45,7 a 46,1% para rendimento de carcaça.

Com base nessas informações é possível observar que o resultado encontrado no nosso trabalho está bem próximo dos resultados encontrados por outros autores, mostrando que os animais tiveram desenvolvimento dentro do esperado nos dois grupos de maior e menor peso ao abate.

O perfil de expressão dos genes da *MSTN*, *DGATI*, *IGF1* e *FATP1* e o desvio padrão dentro dos grupos de maior e menor peso está apresentada na Tabela 10. Tanto a expressão do *DGATI* quanto a expressão do *FATP1* foram significativamente maiores no grupo de animais que apresentaram o menor peso ao abate ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 10.** Médias, desvio padrão e P valor para a expressão dos genes dentro de dois grupos com maior e menor peso.

	Maior Peso n=5	Menor Peso n=5	P valor
<i>MSTN</i>	0,0265±0,0147	0,0210±0,0155	0,58
<i>DGAT1</i>	0,0028±0,0003 <sup>b</sup>	0,0052±0,0023 <sup>a</sup>	0,05
<i>IGF</i>	0,0138±0,0038	0,0140±0,0036	0,91
<i>FATP1</i>	0,0003±0,0002 <sup>b</sup>	0,0017±0,0007 <sup>a</sup>	0,01

\*Letras minúsculas diferentes na mesma linha apresenta diferença significativa estatisticamente (a,b).

Estes valores podem ser entendidos se considerarmos alguns resultados encontrados em outros trabalhos em que, o porte do animal influencia suas características produtivas, uma vez que aqueles de maior porte apresentam maiores pesos de terminação (DI MARCO, 1998), maiores carcaças e menor quantidade de gordura intramuscular (CAMFIELD et al., 1997; MAY et al., 1992). Animais de maior porte têm maior potencial de ganho de peso e maturidade mais tardia, além de menor deposição de gordura na carcaça, maior consumo por unidade de peso e capacidade de retenção de proteína em relação à gordura (DI MARCO, 1998). Nesta linha de pensamento, e extraíndo alguns dados encontrados na revisão realizada por Yen et al. (2008), onde os autores se baseiam em grande parte em estudos com ratos, os autores mostram que o aumento da expressão do *DGAT1* no músculo pode levar ao acúmulo intracelular de triacilgliceróis e ainda, na diferenciação dos fibroblastos em adipócitos os níveis de mRNA do *DGAT1* está aumentado.

Associado ao fato de que o FATP é uma proteína integral da membrana que tem como função fazer o transporte de ácidos graxos para o interior da célula e são expressas em todos os tecidos e tipos celulares que utilizam ácidos graxos (STAHL et al., 2001), a atuação das duas enzimas pode favorecer esta deposição de gordura. A enzima DGAT1 catalisa a reação final da síntese de triacilglicerídeos nos adipócitos, os quais são os principais componentes do depósito de gordura (KUHN et al., 2004). Assim, pode ser imaginado que o aumento no transporte dos ácidos graxos para o interior da célula fornece substrato para a atuação da enzima DGAT1, favorecendo a deposição de gordura.

Com o avançar da idade e, conseqüentemente, aumento do peso, a quantidade de gordura eleva-se nas diferentes partes da carcaça, os quais constaram aumento do número de células adiposas, tomando-se por base a fase de crescimento compreendida entre 28 e 45 kg de peso vivo (KOLB, 1976; HOOD e THORNTON, 1979). O primeiro tecido a ser depositado e que cessa o seu crescimento antes é o tecido nervoso, na sequência vêm o tecido ósseo, o muscular e por último o tecido adiposo. Portanto, o teor de gordura na carcaça aumenta com o avançar da idade do animal e se torna mais ativo devido o processo de lipogênese (ALMEIDA et al 2001).

Foram realizadas as correlações de Pearson entre as características de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC) com a expressão dos genes *FATP1*, *MSTN*, *DGAT1* e *IGF1* (tabela 11).

**Tabela 11.** Correlação de Pearson entre as características de peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC) com a expressão dos genes *FATP*, *MSTN*, *DGAT* e *IGF*.

Características	Correlações	P valor
PA-PC*	0.950	<0.0001
PA-FC	0.066	0.85
PC-FC	-0,112	0.76
FATP-PA	-0,578	0,08
FATP-PC	-0,515	0,12
FATP-FC*	-0.631	0.05
MSTN-PA	0.058	0.37
MSTN-PC	0.016	0.09
MSTN-FC	0.591	0.07
DGAT-PA*	-0.700	0.02
DGAT-PC*	-0.721	0.02
DGAT-FC	0.266	0.45
IGF-PA	0.233	0.51
IGF-PC	0.190	0.60
IGF-FC	0.062	0.86

\*= correlações com P valor significativos  $\alpha=0,05$

A expressão do *FATP1* e a força de cisalhamento apresentaram uma correlação negativa e significativa ( $p<0,05$ ), portanto quando a expressão do *FATP* está alta espera-se que diminua a força de cisalhamento resultando em uma carne mais macia, o que parece coerente, pois observa-se que aumento do teor de gordura na carne está associado com o aumento da maciez. A menor maciez da carne dos zebuínos, entre outros fatores, é justificada pela menor deposição de gordura na carcaça e pouca gordura intramuscular (marmorização), o que favorece o resfriamento mais rápido das massas musculares, provocava o encurtamento dos sarcômeros (unidades contráteis dos músculos) e, conseqüentemente, o endurecimento da carne. Wheeler et al. (1990), atribuíram 15% da variabilidade na maciez da carne bovina às diferenças em marmoreio e colágeno, o mesmo valor foi encontrado no trabalho de Koohmaraie (1992).

De acordo com Smith (2001), as carcaças de animais bem acabados, com cobertura de gordura adequada e com bom grau de marmorização, tendem a apresentar carne mais macia quando avaliadas por técnicas laboratoriais ou painéis degustativos. Jones e Tatum (1994) relataram que o marmoreio explicaria 9% da variação da força de cisalhamento medida pelo texturomêtro e 5,1% da variação da maciez miofibrilar, analisada por painel sensorial para caracterização de carcaças macias.

Visto que a maciez da carne é uma característica multifatorial, determinada por muitos genes e influenciada por vários fatores como idade, estresse pré-abate, atuação de diferentes complexos enzimáticos e manipulação pós-abate, todos estes fatores influenciam na qualidade final. Embora haja uma variedade de fatores influenciando a maciez, alguns trabalhos avaliados (WHIPPLE et al.,1990; KOOHMARAIE, 1992) os autores relatam que a gordura intramuscular é responsável por cerca de 15% do valor final da maciez. Assim, é importante analisar polimorfismo e expressão de outros genes envolvidos na deposição de gordura e desenvolvimento muscular.

A expressão do *DGAT* apresentou uma correlação alta e negativa com o peso da carcaça ( $P=0,02$ ), portanto é esperado que com o aumento do peso corporal dos animais diminua a expressão do *DGAT* no músculo e aumente a expressão nos tecidos adiposo.

Com base nos resultados de polimorfismo no gene que codifica a miostatina, onde verificamos que houve diferença significativa para peso ao abate entre dois dos três genótipos, optamos por avaliar a expressão do gene para cada classe genotípica homocigoto M1M1, heterocigoto M1M2 e homocigoto M2M2. Foram avaliados quatro animais por classe genotípica porém, nenhuma diferença de expressão foi detectada (Tabela 12). Assim, é possível que este polimorfismo esteja em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo relacionado ao maior peso ao abate.

**Tabela 12.** Médias, desvio padrão e P valor para a expressão do gene *MSTN* dentro grupos de genótipos M1M1, M1M2 e M2M2.

Genótipo	N	Média	D.P
M1M1	4	0.01955950	0.00456935
M1M2	4	0.02254617	0.00672904
M2M2	4	0.02233231	0.00636041

## 5 CONCLUSÕES

De todos os polimorfismos gênicos avaliados, apenas três estão associados com as características avaliadas no presente trabalho, sendo o polimorfismo nos *loci GH* e *MSTN* estão associados significativamente com o peso ao abate e *locus IGF1* associado com a maciez da carne. Entretanto, estes polimorfismos não estão associados com variação na expressão destes genes, o que significa que os polimorfismos podem estar marcando um haplótipo, cujos polimorfismos em outros genes possam refletir a variação no peso.

A maior expressão dos genes *DGATI* e *FATP* nos animais com menor peso pode refletir maior deposição de gordura no músculo destes animais, assim como a maior expressão do *FATP*, por causa desta maior deposição de gordura, pode refletir também maior maciez na carne.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho ressalta-se a importância da realização de estudo de expressão em diferentes tecidos (adiposo, muscular e fígado) de animais em fase de crescimento até atingirem a puberdade, com o intuito de explicar a influência das alterações hormonais sobre o controle da expressão gênica em caprinos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245–5250, 2004.

ANDRADE, P.M.M; RIBEIRO, B.G; CARMO, M.G.T. Papel dos lipídios no metabolismo durante o esforço. **Metabólica**. v.8, n. 6, p.80-88, 2006.

BAGATOLI, A. **Expressão gênica da calpastatina e miostina associada com o desempenho e qualidade da carne em ovinos**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2012.

BAGATOLI, A. **Polimorfismo e Expressão de Genes Envolvidos com a Mobilização de Gordura no Período do Pós-parto em Cabras Leiteiras**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica-RJ, 2015.

BAILEY, A.J. The Role of Collagen in the Development of Muscle and Relationship to Eating Quality. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1580-87, 1985.

BAXTER, R. C. The somatomedins: Insulin-like growth factors. **Advances in Clinical Chemistry**, v.25, p.49–115, 1985.

BELEW, J. B.; BROOKS, J. C.; MCKENNA, D. R.; SAVELL, J. W. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science**, v.64, p.507-512, 2003.

BELLINGE, R.H.S; LIBERLES, D.A; IASCHI, S.P; O'BRIEN, P.A; TAY, G.K. Myostatin nd Its Implications On Animal Breeding: A Review. **Animal Genetics**, v.36, p1–6. 2005.

BENNEWITZ, J.; REINSCH, N.; PAUL, S.; LOOFT, C.; KAUPÉ, B.; WEIMANN, C.; ERHARDT, G.; THALLER, G.; KÜHN, C. H.; SCHWERIN, M.; THOMSEN, H.; REINHARDT, F.; REENTS, R.; KALM, E. The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.431–442, 2004.

BUENO, M. S.; SANTOS, L. E.; CUNHA, E. A. Avaliação de carcaças de cabritos abatidos com diferentes pesos vivos. **Revista Nacional da Carne**, n.273, p.72-79, 1998.

BUENO, M. S.; SANTOS, L. E.; CUNHA, E. A. Avaliação de carcaças de cabritos com diferentes pesos vivos. **Boletim de Industria animal**, v.2, n.54, p.61-67, 1997.

CAMFIELD, P. K.; BROWN, J. R., A.H.; LEWIS, P. K. Effects of frame size and time-on feed on carcass characteristics, sensory attributes, and fatty acid profiles of steers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1837-1844, 1997.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE JR, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal and Animal Science**, v.83, p.13-19. 2005.

CASES, S.; SMITH, S. J.; ZHENG, Y. W. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.95, p.13018-13023, 1998.

CHAUDHRY, A. Z.; VITULLO, A. D.; GRONOSTAJSKI, R. M. Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.29, p.18538–18546, 1998.

COCKETT, N.E., S.P JACKSON, T.L. SHAY, D. NIELSEN, S.S. MOORE, M.R.STEELE, W. BARENDSE, R.D. GREEN, M. GEORGE. Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.3019. 1994.

COHEN, R. N. Nuclear receptor corepressor and PPAR $\gamma$ . **Nuclear Receptor Signaling**, v.4, p.1-4, 2006.

COLE, S. A.; MITCHELL, B. D.; HSUEH, W-C.; PINEDA, P.; BEAMER, B. A.; SHULDINER, A. R.; COMUZZIE, A. G.; BLANGERO, J.; HIXSON, J. E. The Pro12Ala variant of peroxisome proliferator-activated receptor-g2 (PPAR-g2) is associated with measures of obesity. **International Journal of Obesity**, v.24, p.522-524, 2000.

COLEMAN, R., AND BELL, R. M. J. **Biological Chemistry**. v.251, p.4537–4543, 1976.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. **Biotechnologia animal**. Estudos Avançados, v.24, n.70, p.123-147, 2010.

CURI, R. A. **Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e característica de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce.** Tese de Doutorado. Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista-Botucatu, 2004

CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, n.6, p.263-270, 2006.

DAUGHADAY, W.H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. **Endocrinology Reviews**, v.10, n.1, p.68–91, 1989.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. **Journal Animal Science**, v.82, p.313-328, 2004.

DENG, C. M. A. R.; YU, E. X.; LAN, X.; CHEN, H.; LE, I. C. Association of IGF-I gene polymorphisms with milk yield and body size in Chinese dairy goats. **Genetics and Molecular Biology**, v.33: p.266–270. 2010.

DHANDA, J.S.; TAYLOR, D.G.; MURRAY, P.J. Growth, carcass and meat quality parameters of male goats: effects of genotype and liveweight at slaughter. **Small Ruminant Research**, v.50, p.57-66, 2003.

DI MARCO, O.N. **Crecimiento de vacunos para carne.** Mar Del Plata, p.246, 1998.

DORN, A; BOLLEKENS, J.; STAUB, A; BENOIST, C.; MATHIS, D. A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. **Cell**, v.50, n.6, p.863–872, 1987.

FAJAS, L.; AUBOEUF, D.; RASPE, E.; SCHOONJANS, K.; LEFEBVRE, A. M.; SALADIN, R. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. **The Journal of biological chemistry**. v.272(30), p.18779-89, 1997.

FARHADIAN, M.; HASHEMI, A.; MARDANI, K.; DARVISHZADEH, R.; RANJBARI, M., Allelic polymorphism of Makoei sheep myostatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism; **African Journal of Biotechnology**. v.10(50), p.10083- 10086, 2011.

FARIA, D. A.; PEIXOTO, J. O.; LOPES, P. Association between insulin-like growth factor I microsatellite polymorphisms and important economic traits in pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.265-270, 2009.

FEIGE, J. N.; GELMAN, L.; MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in Lipid Research**, v.45, n.2, p.120-159, 2006.

FROESCH, E. R.; SCHMID, C.; SCHWANDER, J.; ZAPF, J. Actions of insulin-like growth factors. **Annual Reviews Physiology**, v.47, p.443-467, 1985.

FURBASS, R.; WINTER, A.; FRIES, R.; KUHN, C. Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. **Physiological Genomics**, v.25, p.116-120, 2006.

GARCIA, O. R. S. **Polimorfismo e expressão do gene da calpastatina (cast) associados a maciez da carne em caprino (capra hircus)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2012.

GAUTIER, M; FARAUT, T; MOAZAMI-GOUDARZI, K; NAVRATIL, V; FOGGIO, M; GROHS, C; BOLAND, A; GARNIER, J; BOICHARD, D. G; LATHROP, M; GUT, I.G; EGGENK, A. Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds. **Genetics**, v.177, p.1059–70, 2007.

GLUCKMAN, P. D.; BREIER, B. H.; DAVIS, S. R. Growth hormone and biotechnology. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.2, p. 442-466, 1987.

GOYAL, N.; KNOX, J.; GRONOSTAJSKI, R. M. Analysis of multiple forms of nuclear factor I in human and murine cell lines. **Molecular and cellular biology**, v.10, n.3, p.1041–1048, 1990.

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

GROBET L; PONCELET, D; ROYO MARTIN, L.J; BROUWERS, B; PIROTTIN, D; MICHAUX, C; MÉNISSIER, F; ZANOTTI, M. DUNNER S AND 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.

GRUNDER, A., EBEL, T. T.; MALLO, M.; SCHWARZKOPF, G.; SHIMIZU, T.; SIPPEL, A.; SCHREWE, H. Nuclear factor IB ( Nfib ) deficient mice have severe lung hypoplasia. **Mechanisms of Development**, v.112 , p.69-77, 2002.

HAVEL, P. J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, p.963–977, 2001.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. Chromatin remodeling by nuclear receptors. **Chromosoma**, v.111, p.495–504, 2003.

HOOD, R.L.; THORNTON, R.F. The cellularity of ovine adipose tissue. **Journal of Agricultural Research**, v.30, p.153-161, 1979.

HOVENIER R; KANIS E AND VERHOEVEN JAM. Repeatability of taste panel tenderness scores and their relationships to objective pig meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.71, p.2018–2025, 1993.

HUA, G. H.; CHEN, S. L.; YU, J. N. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. **Meat Science**, v.81, p.391–395, 2009

JACKSON, S. P.; GREEN, R. D. Muscle trait inheritance, growth performance and the feed efficiency on sheep exhibiting a muscle hypertrophy phenotype. **Journal of Animal Science**, v. 71, p.241. 1993.

JONES, B.K.; TATUM, J.D. Predictors of beef tenderness among carcass produced under commercial conditions. **Journal of Animal Science**, v.72, n.6, p.1492-1501, 1994.

KAJIMOTO, Y.; ROTWEIN, P. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements. **The Journal of biological chemistry**, v.266, n.15, p.9724–9731, 1991

KILLINGER, K. M.; CALKINS, C. R.; UMBERGER, W. J.; FEUZ, D. M.; ESKRIDGE, K. M. Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3288-3293, 2004.

KIOKA, N.; TSUBOTA, J.; KAKEHI, Y.; KOMANO, T.; GOTTESMAN, M. M. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.162: p.224–31, 1989.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, p. 1115, 1976.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M. P.; SHAKELFORD, S. D. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship. **Meat Science**, v.62, p.354-352, 2002.

KUHN, C.; EDEL, C.; WEIKARD, R. THALLER, G. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (DGAT1) gene on milk production traits in German Holstein cows. **BioMed Central Genetics**, v.8, p.62, 2007.

KUHN, C.; THALLER, G.; WINTER, A.; BININDA-EMONDS, OR.; KAUPE, B.; ERHARDT, G.; BENNEWITZ, J.; SCHWERIN, M.; FRIES, R. Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v.167, p.1873–1881, 2004.

LEE, S. Regulation of muscle mass by myostatin. Annual. Review of Cell.and Developmental. **Biology**, v.20, p.61. 2004.

LIU, W. J.; GUANG-XIN, F.; YI, F.; KE-CHUAN, T.; XI-XIA, H.; XIN-KUI, Y.; MOU, W.; HUI, Y.; YONG-ZHENG, H.; JING-JING, X.; YA-PING, X.; SHI-GANG, Y.; HONG, C. The polymorphism of a mutation of IGF-1 gene on two goat breeds in China. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.4, p.790-794, 2010.

LUND, P.K. Insulin-like growth factor I: Molecular biology and relevance to tissue-specific expression and action. **Recent Progress in Hormone Research**, v.49, p.125-148, 1994.

MACKAY, T.F.C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Review of Genetics**, v. 35, n.1, p.303-339, 2001.

MADRUGA, M.S.; NARAIN, N.; ARUUDA, S.G.B.; SOUZA, J.G.; COSTA, R.G.; BESERRA, F.J. Influência da Idade de Abate e da Castração nas Qualidades FísicoQuímicas, Sensoriais e Aromáticas da Carne Caprina. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.31, n.3, p.1562-1570, 2002.

MAY, S. G.; MIES, W. L.; EDWARDS, J. W. Beef carcass composition of slaughter cattle differing in frame size, muscle score, and external fatness. **Journal of Animal Science**, v.70, p.2431-2445, 1992.

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.12457-1246, 1997..

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

MEIRHAEGHE, A.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AMOUYEL, P. Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French

population. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders**, v.24, n.3, p.382-387, 2000.

MELO, A. L. P. **Efeito de polimorfismo nos loci CSN1S1, GH, DGAT1 e POU1F1 sobre os valores genéticos de produção e composição do leite de cabra**. Tese Doutorado, Viçosa-MG. 2012.

MIORANZA, A. **Análise de polimorfismo do gene DGAT1 em caprinos**. Trabalho de conclusão de curso – Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel. 2006.

MISSOHOU A; TALAKI E; MAMAN LAMINOU I. Diversity and genetic relationships among seven West African goat breeds. **Journal of Animal Science**. v.19, p.1245–1251, 2006.

MURTAGH J., MARTIN F., GRONOSTAJSKI RM. The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.8 , p.241-254. 2003.

ORDOVÁS, L.; ROY, R.; ZARAGOZA, P.; RODELLAR, C. Structural and functional characterization of the bovine solute carrier family 27 member 1 (SLC27A1) gene. **Cytogenet Genome Research**, v.115, p.115–122, 2006.

PEREIRA FILHO, J. M.; RESENDE, K. T.; TEIXEIRA, I. A. M. A. Efeito da restrição alimentar no desempenho produtivo e econômico de cabritos F1 Boer x Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.188-196, 2005.

PÉREZ-CASELLAS, L. A.; WANG, X.; HOWARD, K. D.; REHAGE, M. W.; STRONG, D. D.; LINKHART, T. A. Nuclear Factor I transcription factors regulate IGF binding protein 5 gene transcription in human osteoblasts. **Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1789, n. 2, p.78–87, 2009.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509–515, 2004.

RAJAS, F.; DELHASE, M., VERDOOD P, CASTRILLO, J. L.; HOOGHE-PETERS, E. L. Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human PIT1/GHF1 gen. **Biochemical Journal**, v.333 , p.77-84. 1998.

RANGEL, A. M. **Polimorfismo nos Genes IGF-1 e NF1-C2 e sua Associação com Características Produtivas em Caprinos Leiteiros**. Dissertação Mestrado, Seropédica-RJ. 2015.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília, DF: EMBRAPA. p 213. 2001.

REYNA, X. F. DE LA.; MONTOYA, H. M.; CASTRELLÓN, V. V.; RINCÓN, A. M. S.; BRACAMONTE, M. P.; VERA, W. A. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in mexican beef cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.2, p.875–883, 2010.

ROTHSCHILD, M. F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling of economic importance in domestic livestock. **In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal**, Viçosa –MG. Anais... Viçosa: UFV, p.219-242, 1999.

SAVELL, J.; SHACKELFORD, S.D. Significance of tenderness to the meat industry. **In: Reciprocal Meat Conference**. Collins: Colorado State University, p.43-46,1992.

SELLIER, P., MONIN, G. Genetics of pig meat quality: a review. **Journal of Muscle Foods**, v.5, p.187-219, 1994

SELLIER, P. Genetically caused retarded growth in animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.19, n.2, p.105–119, 2000.

SILVA SOBRINHO, A.G.; GONZAGA NETO, S. **Produção de carne caprina e cortes da carcaça**. Disponível em: <[http://www.caprtec.com.br/pdf/producao\\_carnecaprina.PDF](http://www.caprtec.com.br/pdf/producao_carnecaprina.PDF)>. Acesso em: 08/02/17.

SILVEIRA, A. C. **Produção de novilhos superprecoces**. In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Gado de Corte, 2000, Goiânia. Anais. Goiânia/GO: CBNA, p.67–90, 2000.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J. Selection of housekeeping genes for genes expression studies in human reticulocytes using real time PCR. **Molecular Biology**, v.7, s/n, 2006.

SIMELA, L.; NDLOVU, R.L.; SIBANDA, L.M. Carcass characteristics of the marketed matebele goat from south-western. **Small Ruminant Research**, v.32, p.173-179, 1999.

SMITH, G.C. Factors affecting the palatability of beef. <http://www.colostate.edu/Depts/AnimSci/ran/beef/smith7pdf> Acesso: Novembro 2015.

SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; MOGNOL, G. P. Polymorphism of alphas1-casein gene in a dairy goat herd in the southeastern region of Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1026-1032, 2009.

SOLLER, M. **Candidate genes as QTL**. In: plant & animal genome vi conference. San Diego, 1998.

STANFORD, K., McALLISTER, T.A., MacDOUGALL, M. Use of ultrasound for the prediction of carcass characteristics in Alpine goats. **Small Ruminates Research**, v.15, p.195-201, 1995.

STEWART, C.E.H.; ROTWEIN, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. **Physiological Reviews**, v.76, p.1005-1026, 1996.

STROBL, J. S.; THOMAS, M. J. Human growth hormone. **Pharmacology Review**, v.46, p.1-34, 1994.

STUHLSATZ-KROUPER, S. M.; BENNETT, N. E.; SCHAFFER, J. E.; Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport protein inhibits long chain fatty acid transport. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.28642-28650, 1998.

SUPAKORN, C. The Important Candidate Genes in Goats - A Review. **Journal of Science and Technology**, v.6(1), p.17-36, 2009.

THALLER, G.; KÜHN, C.; WINTER, A. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v.34, p.354-357, 2003.

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

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, 2002.

VOGEL, J. L.; SANTIAGO, C. A. T.; AAD, P. Y.; GOAD, D. W.; MALAYER, J. R.; SPICER, L. J. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol,

insulin, and gonadotropins. **Domestic Animal Endocrinology**, v.26, p.241–258, 2004.

VOSSEN, R. H.; ATEN, E.; ROOS, A.; DEN DUNNEN, J. T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Human Mutation*, v.30, p.860–866, 2009.

WANG, W.; MULLIKIN-KILPATRICK, D.; CRANDALL, J. E.; GRONOSTAJSKI, R. M.; LITWACK, E. D.; KILPATRICK, D. L. Nuclear factor I coordinates multiple phases of cerebellar granule cell development via regulation of cell adhesion molecules. **Journal Neurosciens**, v.27, p.6115-6127, 2007.

WANG, P.; XU, Q.; LAN, X.; Li, Z.; Li, M.; Fang, X.; Li, M.; Chen, H. A novel EcoRII PCR-RFLP detecting genetic variation of goat NF1-C2 gene and its association with milk yield. **Archiv Tierzucht**, v.54, n.2, p.224-226, 2011.

WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. & KOOHMARAIE M. Standardizing collection and interpretation of Warner-Bratzler shear force and sensory tenderness data. **Meat Conference**, v.50, p.68-77, 1997.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos Indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, 1990a.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E. Predicting beef longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 12, p. 4193- 4199, 1990b.

WINTER, A.; KRÄMER, W.; WERNER, F.A. Association of a lysine- 232-alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.99, p.9300-9305, 2002.

WITWER, C. T.; REED, G. H.; GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; PRYOR, R. J. Highresolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Molecular Diagnostics and Genetics**. v.49, p.853-860. , (2003).

WU, G. Q.; WU G. Q.; DENG, X. M.; LI, J. Y.; LI, N.; YANG, N. A potential molecular marker for selection against abdominal fatness in chickens. **Poultry Science**, v.85, p.1896-9, 2006.

XOCHITL. F.; DE LA ROSA, R.; RODRÍGUEZ, P. M.; SIFUENTES-RINCÓN, A. Microsatellite polymorphism in intron 1 of the bovine myostatin gene. **Journal Applcicon Genetics**. v 47, p:55–57, 2006.

XU QL, CHEN YL, MA RX AND XUE P. Polymorphism of DGAT1 associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 232–237, 2009.

YEN, C. L. E.; STONE, S. J.; KOLIWAD, S.; HARRIS, C.; FARESE, R. C. V. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Researc**., v.49, p.2283-2301, 2008.

ZHANG, C.; ZHANG, W.; LUO, H.; YUE, W.; GAO, M.; JIA, Z. A new single nucleotide polymorphism in the IGF-I gene and its association with growth traits in the Nanjiang Huang goat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.21, n.8, p.1073–1079, 2008.

ZHANG, YU.; ZHANG, X.; LIU, X. Reference Gene Screening for Analyzing Gene Expression Across Goat Tissue. **Asian-Australasian. Journal of Animal Sciences**, v.26, n.12, p.1665 – 1671, 2013.

ZHANG, L. Z.; REN, G.; HUA, L. S.; LAN, X. Y.; LEI, C. Z.; CHEN, H. Polymorphism in the 5'-UTR of the insulin-like growth factor I gene associated with production traits in Chinese cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.13 (3), p.6899-6905, 2014.

ZHAO, Z. D.; LI, A. N.; WEI, S. J.; WANG, M. M.; LI, S. J.; ZAN, L. S. Genetic polymorphisms of the FATP1 gene and their associations with meat quality traits in Chinese Qinchuan cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.17439–17446, 2015.

ZHOU, H.; MITCHELL, A. D.; MCMURTRY, J. P. ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. **Poultry Science**, v.4, p.212-21, 2005.