

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**VIABILIDADE DO NASCIMENTO DE BEZERROS DA
RAÇA NELORE COM MUTAÇÃO NO GENE DA
MIOSTATINA OBTIDOS POR CONGENIA**

Karoline Silva Paulussi

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VIABILIDADE DO NASCIMENTO DE BEZERROS DA
RAÇA NELORE COM MUTAÇÃO NO GENE DA
MIOSTATINA OBTIDOS POR CONGENIA

Karoline Silva Paulussi

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula
Nogueira

Coorientadora: Profa. Dra. Luzia Helena
Queiroz

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP
2018

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Paulussi, Karoline Silva

P324v

Viabilidade do nascimento de bezerros da raça Nelore com mutação no gene da miostatina obtidos por congênia / Karoline Silva Paulussi.

Araçatuba: [s.n], 2018.

66 f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

1. Belgiam Blue. 2. Distocia. 3. Bovinos. 4. Peso ao nascimento. I. T.

CDD 636.08977

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

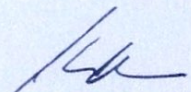
TÍTULO: VIABILIDADE DO NASCIMENTO DE BEZERROS DA RAÇA NELORE COM
MUTAÇÃO NO GENE DAMIOSTATINA OBTIDOS POR CONGENIA

AUTORA: KAROLINE SILVA PAULUSSI

ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

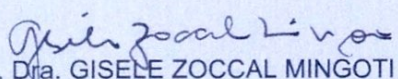
COORIENTADORA: LUZIA HELENA QUEIROZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:



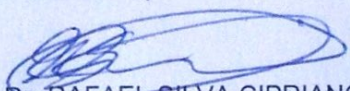
Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO

Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 30 de julho de 2018.

Karoline Silva Paulussi, Médica Veterinária, foi pioneira nas pesquisas de sexagem de embriões equinos produzidos a campo no Brasil sob orientação do Dr. Rodrigo Vitório Alonso junto com a empresa Deoxi Biotecnologia. Foi bolsista FAPESP de Iniciação Científica com o projeto “Diagnóstico Genético Pré- implantacional de Embriões Equinos sob a orientação do Prof. Dr. José Fernando Garcia (UNESP-Araçatuba) em 2012. Vários trabalhos científicos nessa área foram desenvolvidos e apresentados em diferentes Conferências Anuais da Abraceq e na SBTE - Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, culminando com a premiação de segundo melhor Trabalho de Reprodução Equina apresentado na Abraceq, realizado em Campinas/SP no ano de 2013. Foi professora no Cursinho DACA – UNESP, durante 5 anos. Foi bolsista em projeto de Extensão Universitária – Proex durante 2 anos com o projeto “Reprodução assistida dos equídeos de carroceiros e pequenos sítiantes da região de Araçatuba. Realizou estágio curricular supervisionado no Texas - EUA, sob a orientação da Dra. Katrin Hinrichs, onde foram desenvolvidos trabalhos tanto na área de hormônio terapia, aspiração folicular, ICSI, coleta de embrião como na padronização da técnica de micromanipulação e vitrificação de embriões equinos. Participação em resumo apresentado em congresso JAM 2016, em Salt Lake City, UTAH. Atualmente faz mestrado em Ciências Animal na UNESP, onde foi bolsista CNPq (PIBIC).

A vida sem ciência é uma espécie de morte.

Sócrates

Ao meu amado pai, Wagner Paulussi (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar incondicionalmente colocando pessoas em meu caminho, que enxergam em mim quem eu ainda não sou, mas quem eu ainda poderei ser.

Ao meu noivo Eduardo, que foi quem me guiou nos momentos em que me senti perdida, por me ajudar a encontrar nesse caminho, Deus.

Ao meu pai que felizmente teve a oportunidade de acompanhar minha qualificação de mestrado ainda em vida.

A minha mãe que me ensinou a lutar pela vida. Aos meus irmãos que eu amo incondicionalmente.

Aos meus padrinhos, Tio Nene e Tia Denise que nunca mediram esforços para me proporcionarem a melhor orientação educacional, profissional e pessoal.

Ao meu Tio Neu e Tia Lucia pelo carinho e apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, Guilherme de Paula Nogueira, por conceder-me a oportunidade de continuar meus estudos, pela paciência e confiança dedicada a mim.

Ao Rodrigo Vitório Alonso pela paciência e ensinamentos acadêmicos, profissionais e pessoais pelos quais tornou não só o projeto possível mas influenciou quem sou hoje.

Ao Altair (Fiotti), técnico do laboratório da Deoxi Biotecnologia em Araçatuba, pela paciência e competência na execução das biópsias de embrião.

Aos irmãos Yuri e Adam pelo conhecimento e ajuda na análise dos dados do projeto.

A todos os Professores da faculdade da UNESP – Araçatuba pela compreensão e ajuda em diversas áreas de desenvolvimento do projeto.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pelo auxílio em diversas áreas de desenvolvimento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente proporcionaram o desenvolvimento do projeto e condições para que eu conseguisse seguir este caminho.

Ao órgão financeiro CNPq (CAPES), ao qual me proporcionou auxílio financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	CENÁRIO DA PEPUÁRIA NACIONAL	20
2.2	FENÓTIPO DE DUPLA MUSCULATURA EM BOVINOS DEVIDO A MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA	21
2.3	REGULAÇÃO DA MASSA MUSCULAR PELA MIOSTATINA	22
2.4	BIOSÍNTESE, SINALIZAÇÃO E AÇÃO BIOLÓGICA DA MIOSTATINA.....	24
2.5	ORIGEM DA RAÇA BELGIAN BLUE	30
2.6	ORIGEM DA RAÇA NELORE	31
2.7	NELORE COM POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA E DUPLA MUSCULATURA ..	32
2.8	CONGENIA: INTROGRESSÃO GÊNICA EM UMA LINHAGEM RECEPTORA	34
2.9	PESO AO NASCIMENTO: FATOR PREDISPONENTE A DISTOCIA E AUMENTO DA TAXA DE MORTALIDADE NEONATAL	37
2	OBJETIVO	39
2.10	3.1 OBJETIVO GERAL	39
2.11	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÃO	56
6	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – ESQUEMA INDICANDO AS ETAPAS PARA FORMAÇÃO DA MUSCULATURA NOS MEMBROS E GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NESSE PROCESSO. ONDE, N.C= NOTOCORDA; T.N= TUBO NEURAL; S.E= SUPERFÍCIE DA ECTODERMA. (BUCKINGHAM ET AL., 2003).....23
- FIGURA 2** – AUMENTO DA MASSA MUSCULAR ESQUELÉTICA EM RATOS COM A MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA (IMAGENS DE BAIXO) COMPARADOS COM RATOS SEM A MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA (IMAGENS DE CIMA). A) FACE, B) MEMBRO SUPERIOR E C) MEMBRO INFERIOR (MCPHERRON ET AL., 1997).25
- FIGURA 3** – MODELO DO PAPEL DA MIOSTATINA NO CRESCIMENTO MUSCULAR. MODELO A: COM A EXPRESSÃO DA MIOSTATINA E MODELO B: SEM A EXPRESSÃO DA MIOSTATINA (THOMAS ET AL., 2000).27
- FIGURA 4** – EXPRESSÃO, SÍNTESE, ATIVAÇÃO E AÇÃO DA MSTN (ADAPTADO DE RABBAPRAGADA ET AL., 2003; RODINO-KLAPAC ET AL., 2009; ELKINA ET AL., 2011).....28
- FIGURA 5** – BOVINO MACHO DA RAÇA BELGIAN BLUE, MOSTRANDO O FENÓTIPO DE DUPLA MUSCULATURA (MCPHERRON ET AL., 1997).....30
- FIGURA 6** – COMPARAÇÃO FENOTÍPICA DA MUSCULATURA DE UMA NOVILHA SEM O POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA (À ESQUERDA) E UM GARROTE COM A PRESENÇA DE 3 DIFERENTES POLIMORFISMOS NO GENE DA MIOSTATINA (À DIREITA) PRODUZIDO POR EDIÇÃO GÊNICA (PROUDFOOT ET AL., 2015).33
- FIGURA 7** – COMPARAÇÃO DO MODELO DE CRUZAMENTO CLÁSSICO E CRUZAMENTO SELETIVO PARA OBTENÇÃO DE UMA LINHAGEM CONGÊNICA (ROGNER; AVINER, 2003).....36
- FIGURA 8** – ESQUEMA DE RETRO-CRUZAMENTO (BACKCROSS) PARA INTROGRESSÃO DA MUTAÇÃO DO GENE DA MIOSTATINA NA RAÇA NELORE,

PROVENIENTE DO BELGIAN BLUE, VISANDO À PRODUÇÃO DOS PRIME ANIMAIS HOMOZIGOTOS.	41
FIGURA 9 – IMAGEM DOS BEZERROS NASCIDOS COM AS TRÊS VARIAÇÕES NO GENE DA MIOSTATINA. A) HOMOZIGOTO SEM A MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA; B) HETEROZIGOTO; C) HOMOZIGOTO COM A MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA.	44
FIGURA 10 – BOXPLOTS PARA PESO AO NASCIMENTO EM FUNÇÃO DO SEXO DOS BEZERROS. VALORES ESTÃO EXPRESSOS EM TERMOS DE DESVIOS PADRÃO DA MÉDIA GERAL PARA PESO AO NASCIMENTO EM FUNÇÃO DO SEXO (MACHO OU FÊMEA) DOS BEZERROS.	50
FIGURA 11 – BOXPLOTS PARA PESO AO NASCIMENTO EM FUNÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA. VALORES ESTÃO EXPRESSOS EM TERMOS DE DESVIO PADRÃO DA MÉDIA GERAL PARA PESO AO NASCIMENTO EM FUNÇÃO DA MUTAÇÃO DO GENE DA MIOSTATINA (MYO^+/MYO^+) – HOMOZIGOTO SEM A MUTAÇÃO; (MYO^+/MYO^-) – HETEROZIGOTO, COM UMA CÓPIA MUTADA; (MYO^-/MYO^-) – HOMOZIGOTO COM AS DUAS CÓPIAS MUTADAS).....	51
FIGURA 12 – IMAGEM DEMONSTRANDO SINAIS CLÍNICOS ASSOCIADOS COM BEZERROS HOMOZIGOTOS PARA O POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA A) MACROGLOSSIA; B) SUBDESENVOLVIMENTO DE GENITÁLIA EXTERNA; C) INSERÇÃO DA CAUDA ANTERIOR.	54

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO QUANTITATIVA DO NÚMERO DE BEZERROS NASCIDOS (N) DOS GRUPOS ANALISADOS DE ACORDO COM A VARIANTE NO GENE DA MIOSTATINA, SEXO E MÉTODO REPRODUTIVO UTILIZADO.	47
QUADRO 2 – PESO AO NASCIMENTO DE BEZERROS COM AS 3 VARIAÇÕES GENÉTICAS DA MIOSTATINA (KG).....	48
QUADRO 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL RESPOSTA “PESO AO NASCIMENTO” EM KG, APRESENTANDO OS RESULTADOS DE NÍVEIS DE SIGNIFICÂNCIA, GRAU DE LIBERDADE, SOMA DE QUADRADOS, QUADRADO MÉDIO E RESÍDUOS DAS VARIÁVEIS COMPARATIVAS SEXO E MÉTODO REPRODUTIVO.....	48
QUADRO 3 – ESTIMATIVAS DOS COEFICIENTES DAS VARIÁVEIS EXPLICATIVAS DE PESO AO NASCIMENTO EM KG, CONSIDERANDO O POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA E O SEXO DOS BEZERROS.	49
QUADRO 4 – TAXA DE PARTOS DISTÓCICOS DE BEZERROS PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	52
QUADRO 5 – TAXA DE MORTALIDADE DE BEZERROS PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> , DAS 3 VARIAÇÕES NO GENE DA MIOSTATINA.....	53
QUADRO 6 – TAXA DE MORTALIDADE DE BEZERROS PRODUZIDOS PELA TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DE VACAS NELORE (PRIMIÍPARAS E MULTÍPARAS) COM SÊMEN DE TOUROS HETEROZIGOTOS PARA O POLIMORFISMO NO GENE DA MIOSTATINA.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC = Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
Cdk2 = Cinase dependente de ciclina 2
DEP = Diferença esperada na progênia
DM = Dupla Musculatura
DNA = Deoxyribonucleic acid
eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP = Cipionato de Estradiol
F1 = Primeira geração
F2 = Segunda geração
F3 = Terceira geração
F10 = Décima geração
FIV = Fertilização in vitro
FLRG = Follistatin-related gene
GASP-1 = Growth and Differentiation Factor - Associated Serum Protein-1
GBLUP = Genomic best linear unbreasted prediction
GDF-8 = Growth Differentiation Factor 8
IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo
LAP = Latency Associated Protein
LBBMA = Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal
LOS = Large Offspring Syndrome
Mrf4 = Myogenic Regulatory Factor 4
MSTN = Miostatina
Myf5 = Myogenic Factor 5
MyoD = Myogenic Differentiation 1
N.C = Notocorda
Pax 3 = Transcricional Paired Box 3
PCR = Reação em cadeia de polimerase
PIV = Produzidos in vitro
PN = Peso ao nascimento

Rb = Retinoblastoma

REML = Restricted Maximum Likelihood

S.E = Superfície da Ectoderma

SNP = Single-nucleotide polymorphism

T.N = Tubo Neural

TE = Transferência de embriões

TGF-b = Transforming Growth Factor b

UTR = Untranslated Region

VIABILIDADE DO NASCIMENTO DE BEZERROS DA RAÇA NELORE COM MUTAÇÃO NO GENE DA MIOSTATINA OBTIDOS POR CONGENIA

RESUMO- Os animais congênicos possuem apenas uma região específica do cromossomo transferida de uma linhagem para outra através de cruzamentos monitorados por análises genéticas. Essa metodologia foi utilizada para produzir linhagem congênica de bovinos da raça Nelore carreando o polimorfismo no gene da miostatina proveniente do Belgian Blue. O objetivo desse trabalho foi comparar o peso ao nascimento, incidência de partos distócicos e taxa de mortalidade neonatal em animais de 3 variações genéticas para o gene da miostatina (homozigotos sem o polimorfismo, heterozigotos e homozigotos mutados). Animais homozigotos sem a mutação nasceram com 31,19 kg \pm 0,32 kg, os heterozigotos com 35,82 kg \pm 0,32 kg (diferença de 4,63 kg) e os homozigotos mutados nasceram com 40,46 \pm 0,32 kg, com acréscimo médio de 9,26 kg acima dos bezerros homozigotos não mutados ($p=2 \times 10^{-16}$). Além disso bezerros machos apresentaram um acréscimo de 1,55 Kg em relação as fêmeas. A taxa de distocia dos bezerros homozigotos sem o polimorfismo e dos heterozigotos foram de 5,4% e 5,7%. A taxa de mortalidade dos bezerros homozigotos sem o polimorfismo e dos heterozigotos foram de 5,4% e 5,2%, dentro das normalidades esperadas. Entretanto, animais homozigotos mutados apresentaram altas taxas de distocia 47,5% e de mortalidade de bezerros 37,3%. Os dados indicam que a mutação no gene da miostatina quando em heterozigose gera um aumento de peso ao nascimento sem causar aumento de distocia ou de mortalidade neonatal. Concluímos que heterozigotos podem ser produzidos em larga escala, podendo ser uma estratégia vantajosa para aumentar a produtividade da pecuária de corte.

PALAVRAS-CHAVE: Belgian Blue, Distocia, Bovinos, Peso ao nascimento.

BIRTH VIABILITY OF NELORE CALVES WITH MYOSTATIN GENE MUTATION PRODUCED BY CONGENY

ABSTRACT- Congenic animals have only one chromosome specific region transferred from one lineage to another through crosses monitored by genetic analysis. This methodology was used to produce a Nelore cattle congenic line carrying the myostatin gene polymorphism from Belgian Blue. The objective of this study was to compare birth weight, incidence of dystocia and neonatal mortality rate in animals from the 3 genetic variations for the myostatin gene (homozygotes without the polymorphism, heterozygotes and mutated homozygotes). Homozygous animals without the mutation were born with $31,19 \pm 0,32$ kg, heterozygotes were born with $35,82 \pm 0,32$ kg, a difference of 4,63 kg and the mutated homozygotes were born with $40,46 \pm 0,319$ kg, with an increase of 9,26 kg above homozygotes without the polymorphism calves ($p = 2 \cdot 10^{-16}$). In addition, male calves showed an increase of 1,55 kg in relation to females. The rates of dystocia of calves homozygous within polymorphism and heterozygotes were 5,4% e 5,7%. The rates of mortality of calves homozygous within polymorphism and heterozygotes were 5,4% e 5,2%, within expected normalities. However, mutated homozygous animals had high rates of dystocia (47.5%) and calves mortality (37.3%). The data indicate that mutation in the myostatin gene when in heterozygosis results in an increase birth weight without causing increased dystocia or neonatal mortality. We conclude that animals heterozygotes can be produced on a large scale, and may be an advantageous strategy to increase the productivity of beef cattle.

KEYWORDS: Belgian Blue, Dystocia, Beef Cattle, Birth weight.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados publicados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – ABIEC (2018) o Brasil reduziu a área ocupada com a pecuária de corte, mas ainda assim aumentou a produção de carne. Entre os anos de 1990 até 2017 a produtividade aumentou em 146% e neste mesmo período a produtividade passou de 1,63 @/ha/ano para 4,01@/ha/ano. A expectativa é que até 2027, a pecuária deverá aumentar sua produção em 45% (ABIEC, 2018). O Brasil ocupa posição de destaque internacional na indústria da carne, pois é detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, atingindo a marca record em 2016, com 218,23 milhões de cabeças (IBGE, 2017). Além disso, a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano, oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos e colocando o país como o maior exportador de carne bovina nos últimos anos.

As raças zebuínas representam cerca de 80% do rebanho nacional (ABIEC, 2014), representando a grande maioria do rebanho brasileiro, devido sua plena capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas de um país subtropical, resistência a carrapatos e a infecções, adaptações às pastagens, fertilidade, facilidade de parto e rusticidade (ACNB, 2018; SANTIAGO, 1987; SILVA, 2012). Entretanto, as raças taurinas apresentam maiores índices produtivos com relação às raças zebuínas, mas com grande dificuldade de adaptação ao nosso sistema produtivo e clima. Por essas razões, uma das estratégias utilizadas na pecuária brasileira é a utilização de touros de raças taurinas para acasalamento com matrizes da raça Nelore, com o objetivo de aumentar a produtividade (BÓ, et al., 2003; JORGE et al., 1999, RESTLE., 2000).

Dentre as raças taurinas, o Belgian Blue se destaca pela grande capacidade de produção de carne, com elevados níveis de rendimento de carcaça e de maciez, apresentando a característica conhecida como Dupla Musculatura (ARTHUR, 1995). Essa característica é causada por uma mutação

no gene da miostatina, que controla o desenvolvimento da musculatura esquelética de várias espécies (MCPHERRON et al., 1997).

A miostatina foi descoberta em 1997, por McPherron. Ele descobriu um novo membro da família de fatores de diferenciação e crescimento β (do inglês Transforming growth factor beta, *TGF- β*). Esta proteína apresenta uma sequência N-Terminal, seguida de uma região de processamento proteolítica dibásica, e uma região C-Terminal bioativa apresentando nove cisteínas. Sua atividade fisiológica foi posteriormente relacionada ao desenvolvimento anormal de musculatura em animais como o gado bovino da raça Belgian Blue e Piemontês, e ovelhas da raça Texel. A miostatina foi experimentalmente comprovada como sendo um fator de inibição do crescimento e diferenciação da musculatura esquelética em camundongos nocaute para o seu gene correspondente (MSTN) (WEINTRAUB et al., 1991)

O conceito de congenia é amplamente conhecido cientificamente para a produção de linhagens de ratos e camundongos utilizados em modelos experimentais, e as principais aplicações desta metodologia são para estudo de mutações específicas em linhagens padronizadas e o efeito de determinados haplótipos para fenótipos de interesse (BOYSE, 1977; ROGNER; AVNER, 2003).

Os animais congênicos são caracterizados como uma linhagem (receptora) de animais que apresentam uma região específica de seu genoma proveniente de outra linhagem (doadora), adquirida através de cruzamentos específicos. O termo congênico se aplica quando apenas uma região do cromossomo é transferida de uma linhagem para outra (SILVER, 2001).

Em trabalho conduzido por Alonso et al., (2013) a metodologia de congenia assistida por marcadores moleculares foi utilizada para produção de linhagem de bovinos da raça Nelore carreando a mutação no gene da miostatina proveniente do Belgian Blue, aumentando o rendimento de carcaça do gado Nelore e a produtividade. Entretanto, apesar das prováveis vantagens

relacionadas aos ganhos de carcaça dos animais com a variante genética no gene da miostatina, uma das grandes limitações para a multiplicação e difusão dessa nova linhagem em larga escala é que, o polimorfismos no gene da miostatina têm sido associados com dificuldade de parto (distocia); aumento do peso ao nascimento e redução da viabilidade do bezerro.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade do nascimento de bezerros da raça Nelore com mutação no gene da miostatina produzidos por congénia, com grau de sangue 15/16 Nelore x Belgian Blue, comparando as 3 variantes genéticas: homocigotos sem a mutação (Myo^+/Myo^+), heterocigotos (Myo^+/Myo^-) e homocigotos mutados (Myo^-/Myo^-).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cenário da pecuária nacional

A pecuária brasileira tem se tornado a cada ano mais alto sustentável. Nos últimos anos, o Brasil reduziu a área ocupada com a pecuária de corte, mas ainda assim aumentou a produção de carne. De acordo com dados publicados pela ABIEC (2018), entre os anos de 1990 até 2017 a produtividade aumentou em 146% e neste mesmo período a produtividade passou de 1,63 @/ha/ano para 4,01@/ha/ano. A expectativa é que até 2027, a pecuária deverá aumentar sua produção em 45%, o que deve liberar mais de 10 milhões de hectares em área (ABIEC, 2018).

Atualmente o Brasil possui 19% de seu território em pastagens com condições de uso e 51% de vegetação nativa, a quantidade de florestas protegidas no Brasil equivale a seis vezes o tamanho da Alemanha. Além disso 99% da água utilizada na pecuária pertence ao ciclo natural das chuvas (ABIEC, 2018).

O Brasil ocupa posição de destaque internacional na indústria da carne, pois é detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, atingindo a marca record em 2016, com 218,23 milhões de cabeças (IBGE, 2017). Além disso, a bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano, oferecendo cerca de 7,5 milhões de empregos e colocando o país como o maior exportador de carne bovina nos últimos anos. De acordo com a previsão da FAO (2017), precisará aumentar em mais de 200 milhões de toneladas a produção de carne até o ano 2050 para suprir o aumento na demanda de alimentos provocada pelo grande crescimento populacional dos próximos 30 anos, o que faz do Brasil um ator de fundamental importância nesse contexto.

2.2 Fenótipo de Dupla Musculatura em bovinos devido a mutação no gene da miostatina

O fenótipo de dupla musculatura (DM) foi primeiramente documentado em 1807 por Culley e descrito em detalhes por Kaiser em 1888. Em 1929, Wriedt propôs que a determinação genética da hipertrofia muscular era monogênica. Entretanto, esta hipótese foi contestada posteriormente por Kronacher (1934), sugerindo um modelo poligênico com envolvimento de três genes. Um novo modelo foi proposto em 1971 por Sopeña Quisada e Blanco Cachafeiro, com dois genes, apresentando nove possibilidades de genótipos com expressão de quatro fenótipos. Posteriormente, vários pesquisadores chegaram à conclusão de que apenas um gene autossômico está envolvido na síndrome de dupla musculatura (HANSET; MICHAUX, 1985; LOGEAY; VISSAC et al., 1974; OLIVER, 1968).

Em 1997, McPherron e colaboradores, enfim, descobriram a causa da dupla musculatura, que chamaram de miostatina, proteína codificada no gene MSTN ou GDF-8 (do inglês: Growth Differentiation Factor 8), pertencente à família TGF- β (do inglês: Transforming Growth Factor β). A proteína miostatina

possui efeito inibitório do crescimento muscular, regulando negativamente a proliferação de mioblastos e sua diferenciação (MCPHERRON et al., 1997).

Após a descoberta da relação da miostatina com a dupla musculatura nos bovinos, foi então identificada tal característica em diversas raças taurinas: Asturiana de los Valles, Charolesa, Limousin, Maine Anjou, Marchiana, Parthenaise, Rubea Galela e com maior frequência fenotípica nas raças Belgian Blue e Piemontesa, as quais apresentam extrema musculosidade (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2005).

McPherron e colaboradores, em 1997 também descobriram em seu trabalho uma deleção, na raça Belgian Blue, de 11 pares de base no terceiro éxon, intitulada nt 821 (del 11), que muda a fase de leitura do RNAm resultando em um códon de parada prematuro e produzindo uma proteína truncada, sendo os 102 aminoácidos da ponta C-terminal ausentes e sem atividade biológica, apresentando dessa maneira o fenótipo de dupla musculatura (GROBET et al., 1997; MCPHERRON et al., 1997; DUNNER et al., 1997; SMITH et al., 2000).

2.3 Regulação da massa muscular pela miostatina

O processo de formação do tecido muscular se inicia na embriogênese e é denominado como miogênese, consistindo basicamente na transformação dos somitos (estrutura originada da mesoderme) em mioblastos (BUCKINGHAM et al., 2003).

Como descrito na Figura 1, Buckingham et al., (2003), propuseram que a miogênese fosse dividida em 5 etapas, sendo: delaminação, migração, proliferação, determinação e diferenciação. Primeiramente ocorre a delaminação do demomiótomo hipoaxial e então as células provenientes dos somitos (precursoras dos músculos) são liberadas e migram para o broto dos membros, ocorrendo a proliferação celular aumentando o número de células

pré-musculares, ocorrendo assim a determinação e a diferenciação das células precursoras em células musculares.

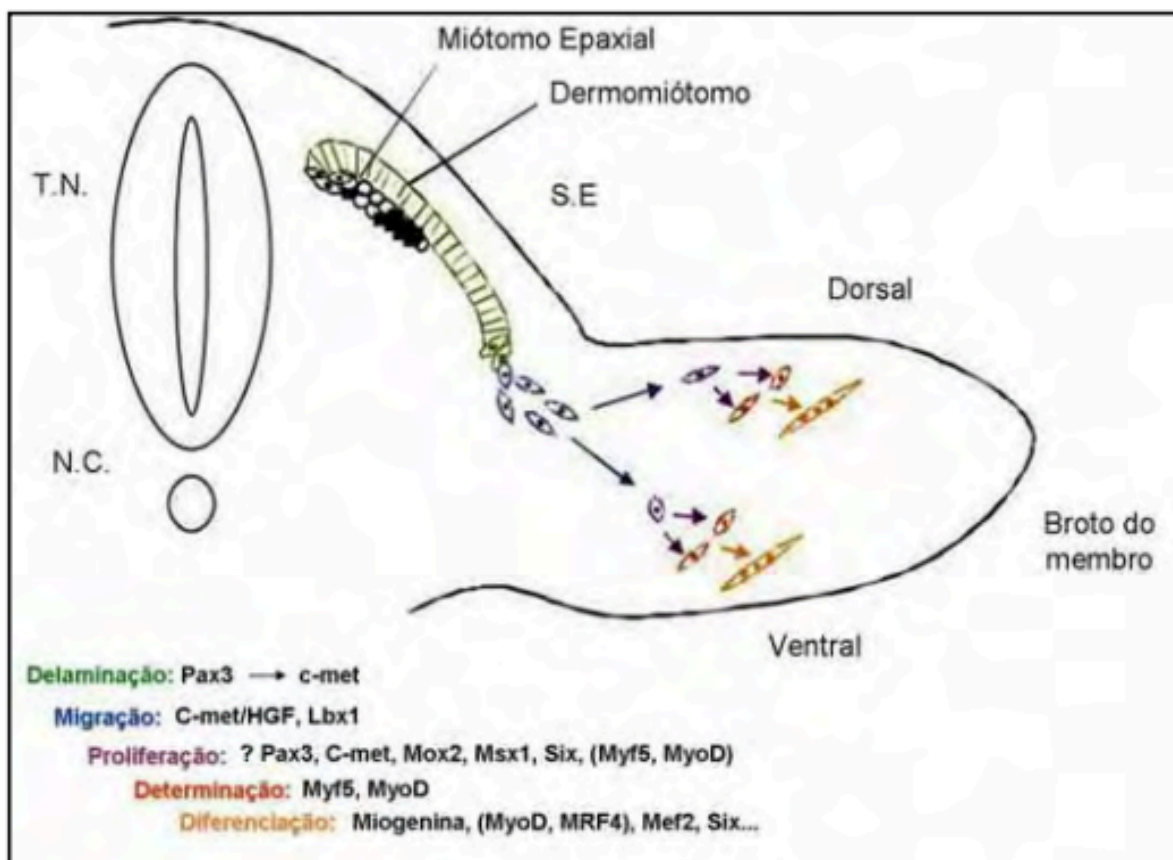


FIGURA 1 – Esquema indicando as etapas para formação da musculatura nos membros e genes potencialmente envolvidos nesse processo. Onde, N.C= Notocorda; T.N= Tubo Neural; S.E= Superfície da Ectoderma. (BUCKINGHAM et al., 2003).

Esses processos são determinados em parte pela expressão dos fatores de regulação miogênicos MyoD (do inglês: Myogenic Differentiation 1), Myf5 (do inglês: Myogenic Factor 5) e Mrf4 ou miogenina (do inglês: Myogenic Regulatory Factor 4) que são produzidos por genes reguladores, funcionando como fatores de transcrição, que inibem ou ativam os demais genes da via de diferenciação (LANGLEY et al., 2002). A miostatina promove bloqueio da

miogênese pela regulação negativa na expressão do fator Pax 3 (do inglês: transcricional paired box 3) e conseqüentemente inibição na expressão da MyoD (MCFARLANE et al., 2006). Alguns trabalhos mostraram que a inativação da miostatina em camundongos e bovinos pode aumentar a expressão da MyoD e da miogenina, levando assim um aumento na proliferação dos mioblastos e a intenso crescimento muscular (LANGLEY et al., 2002; JOULIA et al., 2003).

2.4 Biosíntese, sinalização e ação biológica da miostatina

A miostatina atua tanto no período embrionário como durante o ciclo pós-natal (MCPHERRON et al., 1997; ZIMMERS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003; MANCEAU et al., 2008), inibindo a diferenciação de mioblastos e induzindo a quiescência celular, funcionando também como antimitótico induzindo assim a atrofia muscular (TAJBAKHSI et al., 1997).

Mcp Herron et al., em 1997 inativaram o gene que codifica a miostatina em ratos, promovendo a perda da função desse gene, produzindo 3 tipos de descendentes: homozigoto com a mutação no gene da miostatina, heterozigoto e homozigoto sem a mutação no gene da miostatina. Os autores observaram que os ratos homozigotos com a mutação no gene da miostatina apresentaram de duas a três vezes mais massa muscular comparados com os ratos sem o polimorfismo, como ilustrado na Figura 2.

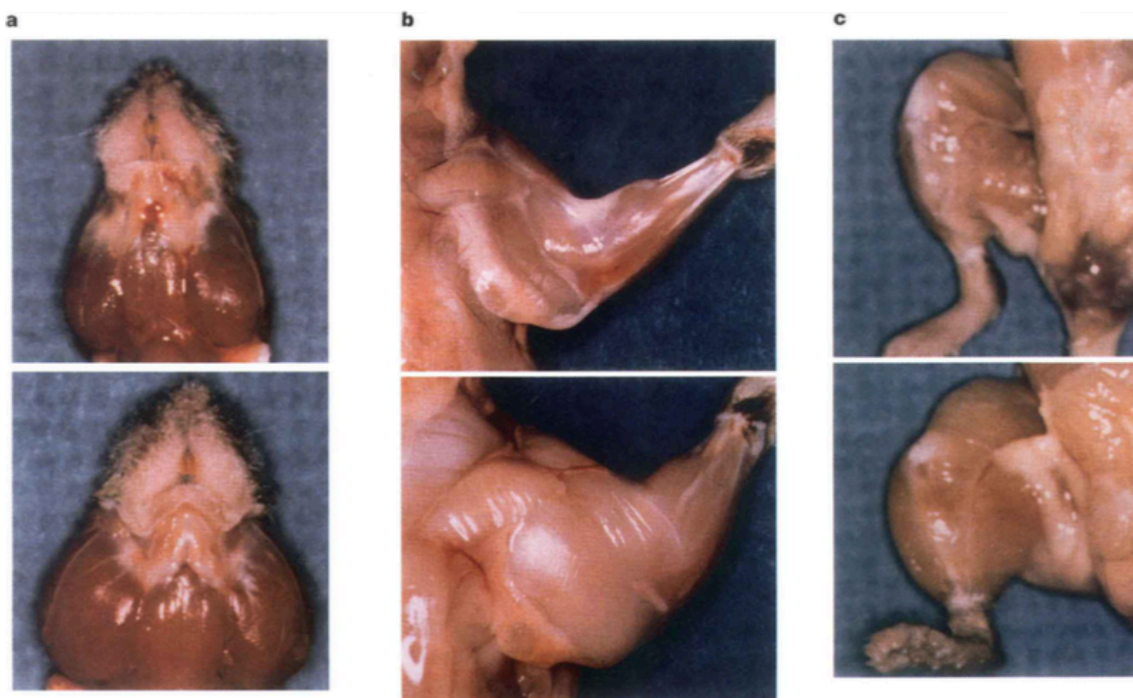


FIGURA 2 – Aumento da massa muscular esquelética em ratos com a mutação no gene da miostatina (imagens de baixo) comparados com ratos sem a mutação no gene da miostatina (imagens de cima). a) face, b) membro superior e c) membro inferior (MCPHERRON et al., 1997).

O gene da miostatina da espécie bovina foi mapeado a 3,1 cM (centimorgan) da região centromérica do cromossomo 2 e chamado de locus mh (SOLINAS-TOLDO et al., 1995; CHARLIER et al., 1995; DUNNER et al., 1997; CASAS et al., 1998). O gene da miostatina consiste de 3 éxons e 2 íntrons. Os éxons 1, 2 e 3 apresentam respectivamente 373, 374 e 381 pb. Podendo o éxon 3 apresentar variações em seu tamanho (1701, 1812 ou 1887 pb), devido a inserção de uma região codificadora - UTR (do inglês: Untranslated Region) O 1° íntron apresenta 1840 pb e o 2° apresenta 2033 pb (CHARLIER et al., 1995; GROBET et al., 1997; SMITH et al., 1997). O mRNA do MSTN apresenta 2767 nucleotídeos (Gene Bank ID 281187) e traduz uma proteína com 375 aminoácidos (JEANPLONG et al., 2001; SHIBATA et al., 2003).

A miostatina é sintetizada como uma proteína precursora, sendo necessários dois processos proteolíticos para se tornar ativa. O primeiro evento remove a sequência N-terminal da extremidade com 24 aminoácidos da extremidade, necessária para enviar a proteína para vias de secreção celular. O segundo evento ocorre no sítio RSRR (Arginina – Serina – Arginina – Arginina) localizado nos aminoácidos 240-243 (ou 264-267 se levarmos a sequência sinal em consideração). Ocorre uma clivagem neste local o que produz dois fragmentos: o N-terminal de 243 aminoácidos nomeado como Proteína Associada à Latência (LAP, do inglês: Latency Associated Protein), e o C-terminal de 108 aminoácidos. Este peptídeo C-terminal se transformará em um dímero por pontes de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína específicos (DOMINIQUE; GERÁRD, 2006). Este dímero é conhecido como miostatina na forma ativa (LEE, 2004, LEE; MCPHERRON, 2001).

O LAP tem um papel importantíssimo no metabolismo da miostatina, inibindo seus efeitos biológicos, assim como outras proteínas: Folistatina, FLRG (do inglês: follistatin-related gene), GASP-1 (do inglês: Growth and differentiation factor-associated serum protein-1) e LAP (Figura 4) (HILL et al., 2002; LEE, 2004; LEE; MCPHERRON, 2001; RODGERS; GARIKIPATI, 2008).

A miostatina na sua forma ativa interage com seu receptor de membrana (Activina IIB), exercendo assim a sua função biológica de inibição da hipertrofia e hiperplasia muscular (AOKI et al., 2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a miostatina atua na hiperplasia de mioblastos de mamíferos através da inibição da progressão do ciclo celular através dos estágios G1 e G2. Sua ação se dá pela redução dos níveis de Cdk2 (Cinase dependente de ciclina 2), um aumento da p21 (inibidor de Cdk) e uma conseqüente hipofosforilação de retinoblastoma - Rb (proteína relacionada à inibição da expressão de genes relacionados à Fase S), como ilustrado na Figura 3 (THOMAS et al., 2000).

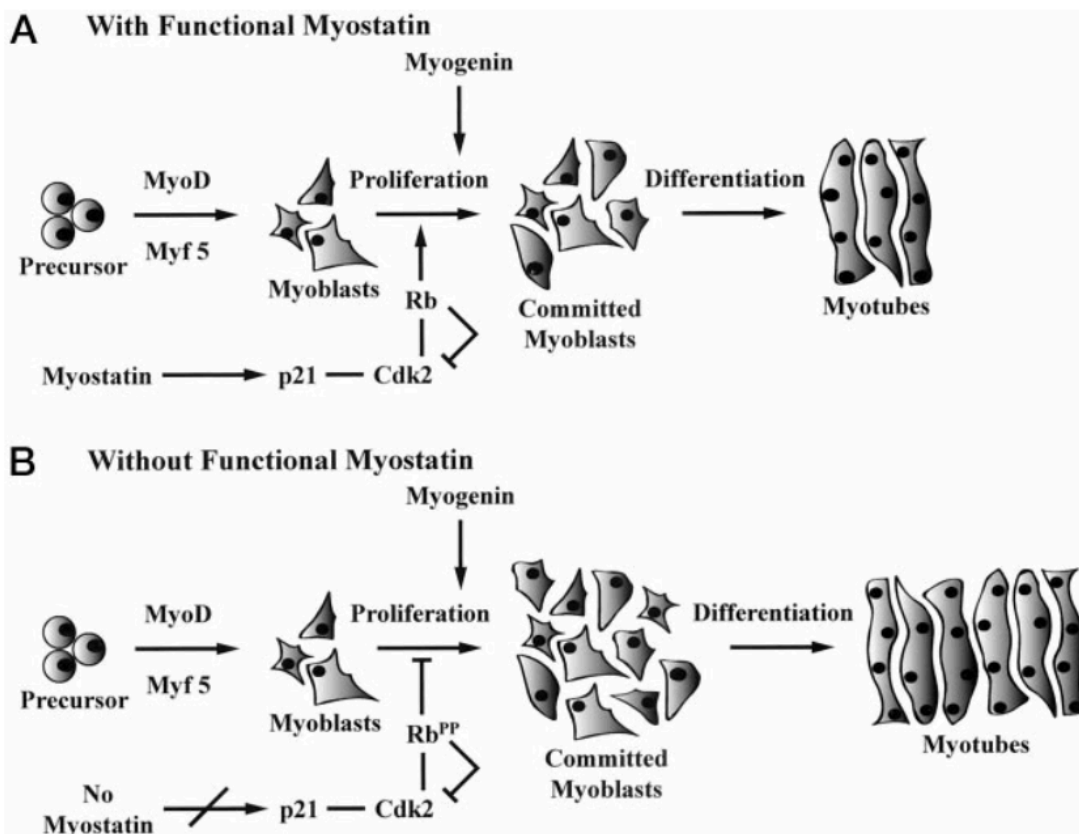


FIGURA 3 – Modelo do papel da miostatina no crescimento muscular. Modelo A: Com a expressão da miostatina e Modelo B: Sem a expressão da miostatina (THOMAS et al., 2000).

A ação da MSTN sobre o controle da massa muscular esquelética é exercido de maneira autócrina-parácrina. Em sua forma ativa essa proteína é capaz de interagir com seu receptor de membrana ActIIB (receptor quinase do tipo serina/treonina) que recruta receptores do tipo I (receptor quinase 4 e ou 5 semelhantes a activina), como ilustrado na Figura 4.

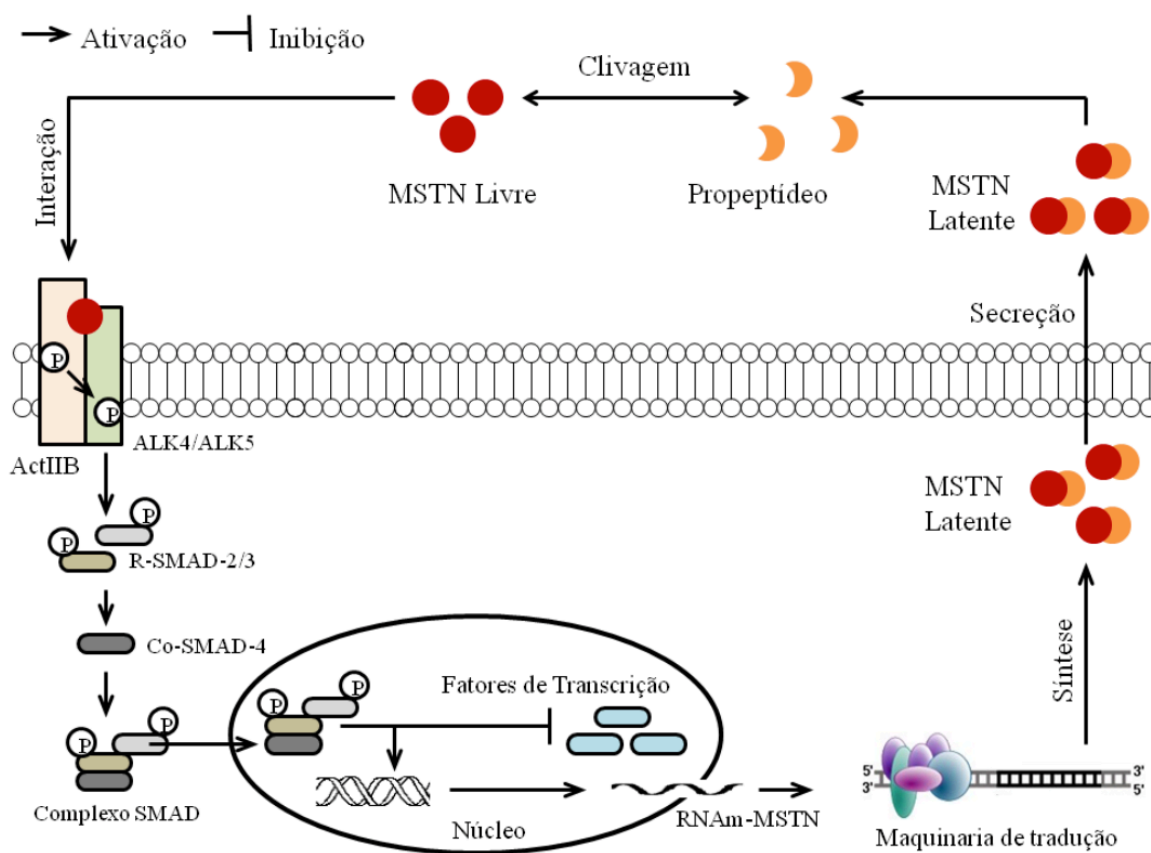


Figura 4 – Expressão, síntese, ativação e ação da MSTN (adaptado de REBBAPRAGADA et al., 2003; RODINO-KLAPAC et al., 2009; ELKINA et al., 2011).

A sinalização da miostatina ocorre pela ligação a complexos de receptores heteroméricos de cinase de serina-treonina compostos de dois receptores do tipo 1 (receptor de activina do tipo I, ActRI) e dois do tipo 2 (receptor de activina do tipo II, ActRIIB). A ligação da miostatina ao homodímero de receptor do tipo II propicia que o homodímero de receptor I se ligue formando um complexo heterotetramérico. A formação do complexo aproxima os domínios cinase intracelulares, ocorrendo a transfosforilação do receptor do tipo I pelo do tipo II. Então os ActRI fosforilados irão fosforilar, através de seu domínio C-terminal, uma classe de proteínas sinalizadoras intracelulares denominadas R-Smads (Smad regulado por receptor), mais

especificamente os R-Smad 1, 2, 3, 5 e 8. As R-Smads fosforiladas irão se ligar a Co-Smads (de Smad mediador comum). Este complexo heteromérico irá ser translocado para o núcleo celular se ligando a fatores de transcrição específicos (co-ativadores e co-repressores), ativando ou reprimindo genes específicos. O Smad 7 é denominado I-Smad (Smad de inibição) e inibe a via de sinalização de duas maneiras: se ligando aos domínios intracelulares dos receptores transmembrana ativados (evitando a fosforilação dos R-Smads), ou se ligando diretamente aos complexos de R-Smad ativados localizados no núcleo inibindo sua atividade transcricional. As R-Smads ainda podem sofrer modificações pós-traducionais como a ubiquitinação e sumoilação, sendo transportadas para fora do núcleo e inibindo sua ação nuclear. Os complexos de R-Smads também recrutam histonas acetiltransferases para facilitar a transcrição, inclusive os próprios complexos podem ser acetilados, aumentando sua eficiência na transcrição (DOMINIQUE; GERÁRD, 2006; MOUSTAKAS; HELDIN, 2009; RODGERS; GARIKIPATI et al., 2008).

Nas duas últimas décadas, diversos trabalhos foram publicados com estudos referentes ao gene da miostatina em várias espécies (bovinos, ovinos, suínos, cachorros e até em humanos) (DU et al., 2007; GROBET et al., 1998; KARIM et al., 2000; MOSHER et al., 2007; SCHUELKE et al., 2004). Nos bovinos foram descritos pelo menos 6 tipos diferentes de mutações no gene da miostatina associados ao fenótipo da Dupla Musculatura: NT419 (del 7 – ins10), NT910 (C→T), NT676 (G→T), NT821 (del11), NT874 (G→T) e NT938 (G→A) (CAPPUCIO et al., 1998, GROBET et al., 1998; MCPHERRON et al., 1997).

2.5 Origem da raça Belgian Blue

De acordo com a Associação Internacional de Criadores de Belgian Blue (BBI), a raça começou a ser formada com a importação de bovinos da raça Shorthorn da Inglaterra para a Bélgica no início do século XIX. Inicialmente a raça Shorthorn foi cruzada com outras raças locais, sendo utilizada tanto para produção de carne como para produção de leite. Apenas quando os cruzamentos foram focados para a produção de carne é que a característica fenotípica de Dupla Musculatura (DM) se destacou dando origem a raça atual Belgian Blue (Figura 5) (BBI, 2017).



FIGURA 5 – Bovino macho da raça Belgian Blue, mostrando o fenótipo de Dupla Musculatura (McPherron et al., 1997).

A partir de 1950, a raça Belgian Blue já estava tão intensamente selecionada, apresentando Dupla Musculatura em grau extremo, que chegou ao ponto de não ser mais possível encontrar animais dessa raça sem a mutação da miostatina (GENGLER et al., 1995).

A raça Belgian Blue é uma das raças que apresentam maior rendimento de carcaça devido à exuberante musculatura, chegando a médias acima de 65% de rendimento de carcaça com altos níveis de maciez. Além disso, a carcaça apresenta quantidade reduzida de gordura (até 16% a menos de marmoreio e marmorização, comparando com um animal sem a mutação do gene da miostatina), com cortes bastante apreciados pelo mercado europeu que propiciaram alta valorização e expansão da raça (WEBER; ILSSEN, 1934; OLIVER, 1968).

2.6 Origem da raça Nelore

O primeiro registro de entrada do bovino da raça Nelore no Brasil ocorreu em 1868, quando um navio que destinava-se a Inglaterra, ancorou em Salvador, com apenas um casal de reprodutores da raça. Em 1878, houve a segunda importação de um lote de animais da raça Nelore diretamente da Índia, e assim começou a sua expansão pelos principais estados brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais), sendo atualmente a raça que representa a grande maioria do rebanho de corte nacional, devido sua alta adaptação ao clima brasileiro (ACNB, 2018; SILVA, 2012).

Apesar do grande avanço do melhoramento genético da raça Nelore ocorrido nos últimos anos, os animais zebuínos ainda apresentam índices inferiores de produtividade quando comparados a animais de raças taurinas, ou até mesmo quando comparados com animais provenientes de cruzamento industrial (PASTOR et al., 2017). As raças taurinas apresentam altos índices produtivos, mas com baixa adaptação ao clima subtropical brasileiro,

principalmente nas regiões centrais e ao norte do país, onde está localizada a maior parte da pecuária de corte nacional, o que justifica a maior preponderância das raças zebuínas no Brasil. Uma estratégia bastante utilizada é o acasalamento entre animais de raças taurinas e zebuínas, visando aumento da produtividade com a manutenção da rusticidade.

2.7 Nelore com polimorfismo no gene da miostatina e Dupla Musculatura

Grisolia et al. (2009) trabalhou na identificação de polimorfismos no gene da miostatina (GDF8) em bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*). A análise revelou a existência de 14 polimorfismos nos éxons e 38 em regiões não traduzidas e íntrons. Entretanto, nenhum dos polimorfismos descritos previamente e associados com síndrome da Dupla Musculatura em raças taurinas foi encontrado, não sendo possível associar as variantes genéticas com o aumento de musculatura na raça Nelore.

A primeira linhagem de bovinos da raça Nelore com mutação no gene da miostatina e com o fenótipo de Dupla Musculatura foi produzida por Proudfoot e colaboradores em 2015, com a utilização de técnicas de edição gênica, injetando TALEN RNAm (do inglês: Transcription Activator-like Effector Nucleases) em zigotos bovinos produzidos *in vitro*. Conforme demonstrado na Figura 6 é nítida a diferença de musculatura entre um bezerro macho com polimorfismos no gene da miostatina e uma bezerra fêmea “wild type”.



FIGURA 6 – Comparação fenotípica da musculatura de uma novilha sem o polimorfismo no gene da miostatina (à esquerda) e um garrote com a presença de 3 diferentes polimorfismos no gene da miostatina (à direita) produzido por edição gênica (PROUDFOOT et al., 2015).

Embora as técnicas de edição gênica estejam sendo cada vez mais difundidas e empregadas na comunidade científica, ainda há muita discussão sobre a regulamentação e aprovação dos animais editados geneticamente na cadeia alimentar (SUZUKI, 2005.; LIMA et al., 2018).

Dessa maneira, a metodologia de congênia é uma estratégia de introgressão gênica que não utiliza ferramentas de engenharia genética ou de transgenia, e conseqüentemente, sem a produção de um organismo geneticamente modificado (OGM) ou de um animal transgênico.

2.8 Congenia: introgressão gênica em uma linhagem receptora

O conceito de congenia é amplamente conhecido cientificamente para a produção de linhagens de ratos e camundongos utilizados em modelos experimentais, e as principais aplicações desta metodologia são para estudo de mutações específicas em linhagens padronizadas e o efeito de determinados haplótipos para fenótipos de interesse (BOYSE, 1977; ROGNER; AVNER, 2003).

Os animais congênicos são caracterizados como uma linhagem (receptora) de animais que apresentam uma região específica de seu genoma proveniente de outra linhagem (doadora), adquirida através de cruzamentos direcionados e monitorados por testes genéticos. O termo congênico se aplica quando apenas uma região do cromossomo é transferida de uma linhagem para outra (SILVER, 2001).

Para se obter uma linhagem congênica receptora com apenas a região de interesse da outra linhagem doadora, são feitos retrocruzamentos sempre entre a progênie do cruzamento entre as duas linhagens (doadora e receptora) e a sua linhagem de interesse (a receptora). Ao se cruzar duas linhagens distintas, serão obtidos animais da primeira geração (F1) com 50% de seu genoma provindo da geração parental de uma linhagem (receptora) e 50% provindo da outra linhagem (doadora). Ao retrocruzar-se a geração F1 com a linhagem receptora, em média tem-se animais de segunda geração (F2) com 75% do genoma proveniente da linhagem receptora. Se for repetido este procedimento e retrocruzar-se a geração F2 com a linhagem receptora, serão obtidos animais de terceira geração (F3) com média de 87,5% do genoma proveniente da linhagem receptora. Ou seja, ao retrocruzar-se a progênie com a linhagem receptora, a cada geração, em média, metade da carga genética da linhagem doadora presente no animal é substituída pela carga genética da linhagem receptora. Portanto, ao fim de 10 cruzamentos, tem-se uma linhagem com aproximadamente 99,9% de seus genes provenientes da linhagem receptora. Como o objetivo da metodologia de congenina é fazer a introgressão

de parte específica do genoma da linhagem doadora na linhagem receptora, todos os animais produzidos ao longo das gerações são submetidos a testes genéticos por tecnologias de biologia molecular para identificação da presença ou ausência da região genética alvo, utilizando apenas animais que mantenham a característica genética para produção das próximas gerações. Se o objetivo é criar uma linhagem congênica homocigota para a determinada característica, basta endocruzar a décima geração (F10), que, em média, serão obtidos um quarto da progênie de indivíduos homocigotos para esta característica (NADEAU, 2001; ROGNER; AVNER, 2003).

Na bovinocultura, a metodologia de congenia também é conhecida por "backcross" ou introgressão gênica. Entretanto, uma das grandes limitações para aplicação dessa estratégia em bovinos é o longo intervalo de gerações que compreende de 3 a 4 anos (YANG; WOMACK, 1997). De acordo com Rogner e Avner (2003) é necessário a produção de no mínimo nove gerações para que se obtenha uma linhagem congênica pela metodologia clássica. Entretanto, novos esquemas que utilizam tanto a seleção positiva para o segmento genético desejado quanto a seleção contra os segmentos genômicos indesejados provenientes da linhagem doadora, permitem a obtenção de linhagem congênica mais rapidamente.

Essa metodologia, conhecida como "speed congenics", é baseada no grau de heterocigosidade entre os indivíduos de cada progênie, assumindo-se que existe uma distribuição normal entre o grau de heterocigosidade entre esses indivíduos, ou seja, existem animais com maior e menor quantidade de alelos herdados da linhagem doadora e da linhagem receptora. Os animais mais indicados para serem selecionados para darem origem às próximas gerações, são aqueles que possuem a variante genética desejada, mas que possuam em sua composição genética a menor proporção de genes provenientes da linhagem doadora. Teoricamente, esse processo pode levar a criação de uma linhagem congênica com menos de 0,5% de composição genética da linhagem doadora em cinco gerações. Dessa forma, o tempo

necessário para criação de uma linhagem congênica é reduzido pela metade (Figura 7)

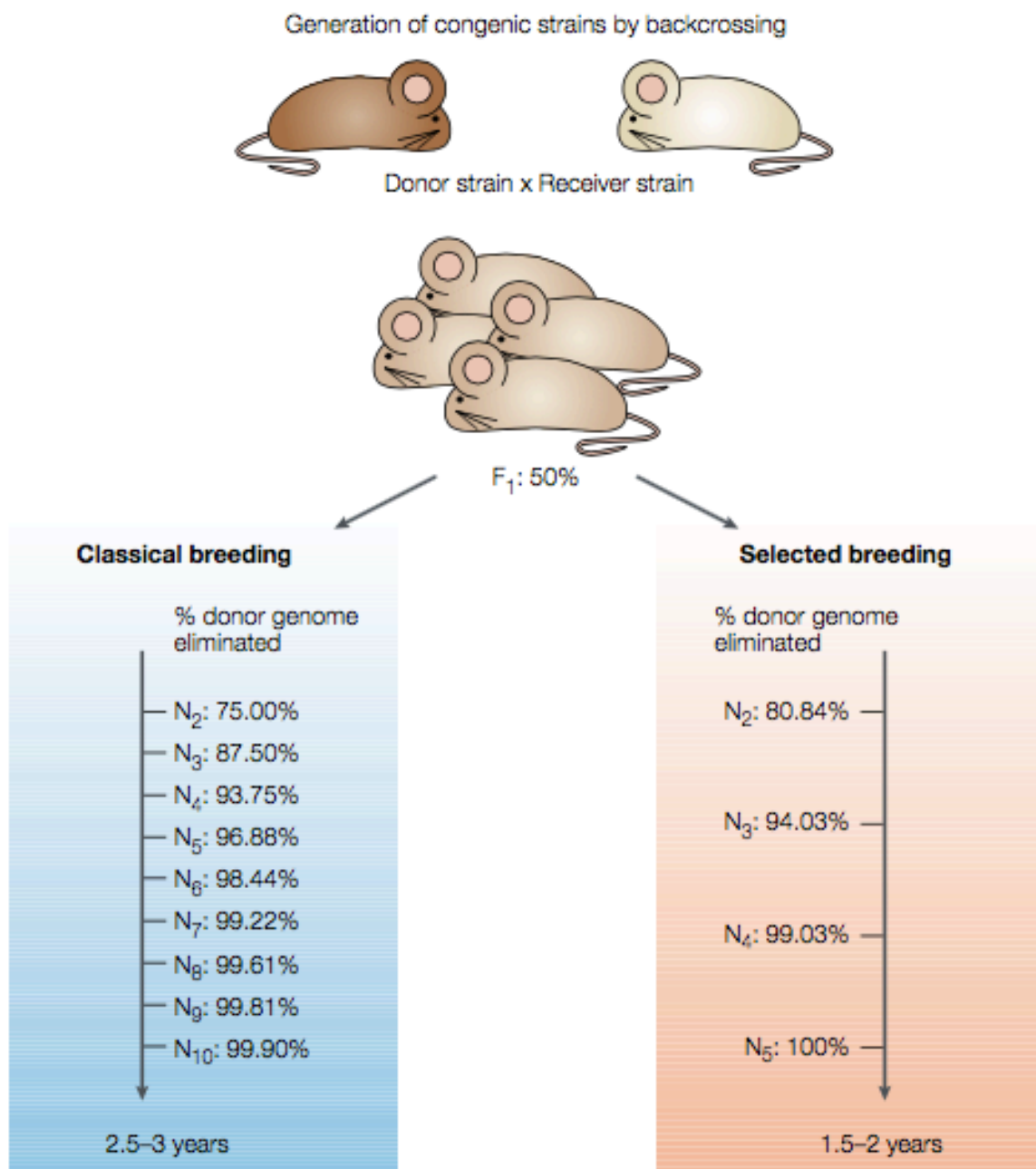


FIGURA 7 – Comparação do modelo de cruzamento clássico e cruzamento seletivo para obtenção de uma linhagem congênica (ROGNER; AVINER, 2003).

2.9 Peso ao nascimento: fator predisponente a distocia e aumento da taxa de mortalidade neonatal

O peso ao nascimento é uma característica importante, devido a vasta gama de informações associadas com traços relacionados ao crescimento, porte do animal e peso da carcaça (COOPMAN et al., 2004; RICE; WILTBANK, 1972). Vários fatores genéticos e ambientais influenciam no peso ao nascimento. Fatores genéticos: sexo, duração da gestação, raça, heterosis, consanguinidade e genótipo (BROWN; GALVEZ, 1969; DICKERSON, 1959; KOCH; CLARK, 1955). Fatores não genéticos: idade, quantidades de partos da vaca e nutrição durante as fases da gestação (BOURDON; BRINKS, 1982; ERIKSSON et al., 2004).

No Brasil a grande maioria do gado de corte é da raça Nelore, apresentando média de peso ao nascimento, segundo Lopes et al (2008), de $30,44 \pm 2,43$ Kg. A estratégia dos criadores de gado de corte no Brasil para evitar a ocorrência de distocia, principalmente na inseminação de primíparas, é utilizar touros com bons índices produtivos, mas com valores genéticos de peso ao nascimento abaixo da média da raça, ou seja, touros que produzem bezerros com baixo peso ao nascimento (ALIANÇA, 2011).

Entretanto as raças taurinas apresentam maior peso ao nascimento, principalmente raças com o fenótipo de Dupla Musculatura (MENISSIER, 1982; VISSAC et al., 1974). Vários trabalhos sugerem que animais com a mutação no gene da miostatina tem apresentado maior peso ao nascer quando comparados aos animais sem a mutação, cerca de 30% a mais (ARTHUR et al., 1988; HANSET, 1967).

Kolkman et al. (2010), apresentou em seu trabalho a média de peso ao nascimento de bezerros da raça Belgian Blue de $49,2 \pm 7,1$ Kg. Em 1991, Hanset em seu trabalho observou que o período de gestação de animais com Dupla Musculatura é mais longo, resultando assim em bezerros com maior peso ao nascimento.

O sexo também é um fator que influencia no peso ao nascimento, diversos autores demonstraram que bezerros machos nascem mais pesados que as fêmeas (ALBUQUERQUE et al., 1993; AMARAL et al., 1991; CUBAS, et al., 2001; JARDIM; PIMENTEL, 1998; NEWMAN; DELAND, 1991; PEROTTO et al., 1999; ROVIRA, 1974). De acordo com trabalho desenvolvido por Mendonça et al. (2003), bezerros machos apresentaram peso 3,94 kg superior ao peso das fêmeas.

A produção de embriões *in vitro* também tem influenciado no peso ao nascimento de bezerros, acredita-se que seja devido a exposição dos oócitos e embriões ao meio de cultivo contendo componentes como soro fetal bovino (SFB) (BREUKELMAN et al., 2004). Na espécie bovina, a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV), associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom (ovum pick up – OPU), tem sido utilizada para maximização da produtividade, diminuindo o intervalo entre gerações, acelerando o melhoramento genético animal (VARAGO et al., 2008).

Alguns autores mostraram, que animais provenientes da produção *in vitro* apresentam maior peso ao nascimento comparados com animais produzidos *in vivo* (JACOBSEN et al., 2000; YOUNG et al., 1998). Animais com peso anormal, juntamente com algumas alterações fenotípicas (macroglossia, microgenitália, inserção anterior da cauda) são consideradas como parte da Síndrome da Cria Grande ou LOS (do inglês: Large Offspring Syndrome) (JACOBSEN et al., 2000) e Síndrome da Cria Anormal ou AOS (do inglês: Abnormal Offspring Syndrome) (WILSON et al., 1995).

A técnica de clonagem também tem sido associada com bezerros de tamanho gigante (BATCHELDER et al., 2007; GARRY et al., 1996). Estes casos não estão claramente elucidados pela literatura, entretanto atualmente o que tem sido observado na prática é que o nascimento de bezerros gigantes provenientes da técnica de produção *in vitro* esta sendo cada vez menos frequente, provavelmente devido ao aprimoramento das técnicas de cultivo de embriões.

Vários trabalhos tem mostrado alto índice de distocias associadas a animais com dupla musculatura (DM) devido ao alto peso dos bezerros ao nascimento (ARTHUR et al., 1988; ARTHUR, 1995; HANSET; JANDRIAN, 1979). Além disso esses bezerros apresentam baixa viabilidade após o nascimento devido a dificuldade no parto e alta taxa de deformidades, como a macroglossia (dificultando o bezerro de mamar adequadamente), aumentando assim a taxa de mortalidade neonatal nesses animais (ARTHUR et al., 1988; ARTHUR, 1995; HANSET; JANDRIAN, 1979; VISSAC et al., 1974).

2 OBJETIVO

2.10 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do polimorfismo no gene da miostatina; introgridido pela raça Belgian Blue, de quarta geração (15/16 Nelore x Belgian Blue); no aumento do peso ao nascimento, na taxa de distocia e na taxa de mortalidade neonatal.

2.11 3.2 Objetivos específicos

- Analisar a variável de peso ao nascimento associada com:
 - As 3 possíveis variações no gene da miostatina (homozigotos sem o polimorfismo (Myo^+/Myo^+), heterozigotos (Myo^+/Myo^-) e homozigotos mutados (Myo^-/Myo^-).
 - Sexo do bezerro (macho ou fêmea).
 - Método reprodutivo utilizado na produção das prenhez: Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) ou Transferência de Embriões Produzidos in vitro (TE-FIV).
- Avaliar a taxa de distocias dos bezerros produzidos pelo método

de transferência de embriões produzidos in vitro (TE-FIV), associado com as três variações genéticas ((Myo⁺/Myo⁺), (Myo⁺/Myo⁻) e (Myo⁻/Myo⁻)).

- Avaliar a taxa de mortalidade neonatal dos bezerros produzidos pelo método de transferência de embriões produzidos in vitro (TE-FIV), associado com as três variações genéticas ((Myo⁺/Myo⁺), (Myo⁺/Myo⁻) e (Myo⁻/Myo⁻)).
- Avaliar a taxa de mortalidade neonatal dos bezerros produzidos pelo método de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), associado com as duas variações genéticas ((Myo⁺/Myo⁺), (Myo⁺/Myo⁻)).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma análise retrospectiva dos nascimentos de bezerros de linhagem congênica de bovinos da raça Nelore com polimorfismo no gene da miostatina. A produção dos animais foi iniciada em 2004, quando vacas da raça Nelore foram inseminadas com sêmen de touros da raça Belgian Blue. Em 2005, nasceram os animais meio sangue (1^o geração), sendo todos heterozigotos para a variante genética.

A Figura 8 ilustra o esquema de acasalamentos realizados desde o início do projeto até a quarta geração e produção dos primeiros animais homozigotos mutados.

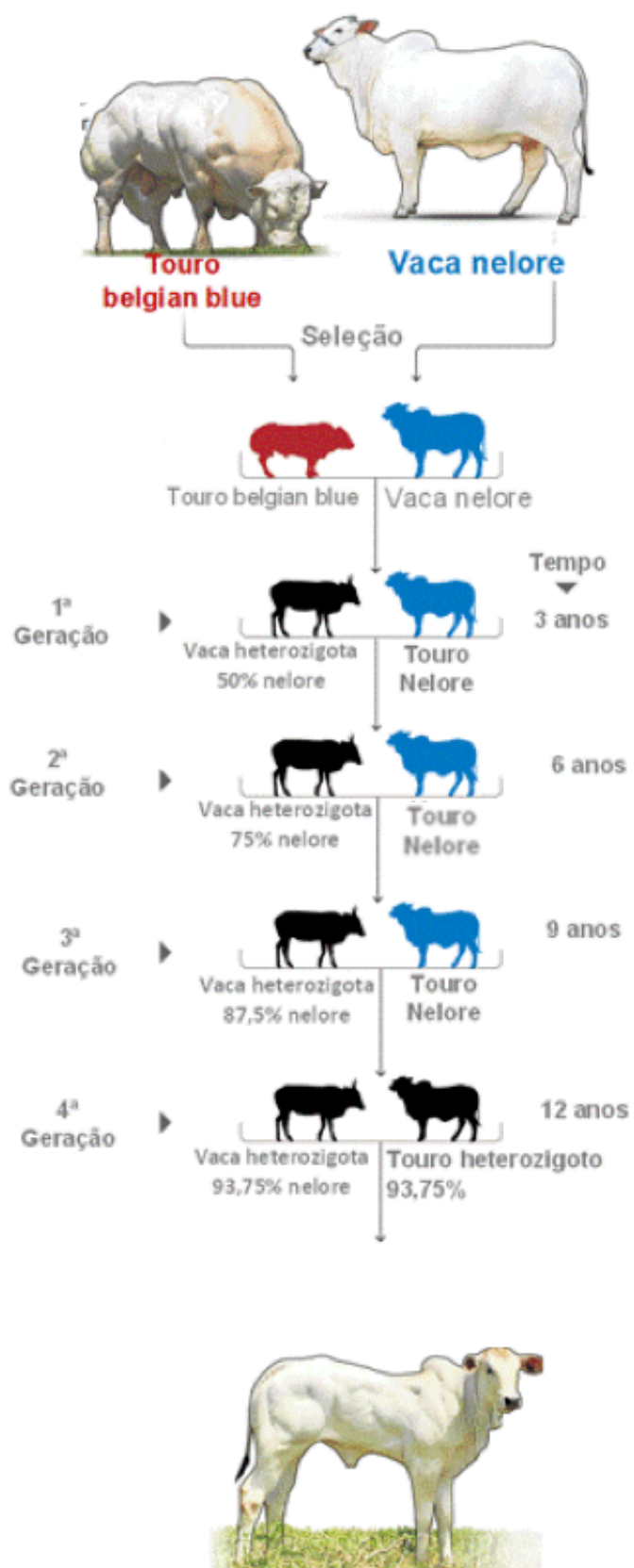


FIGURA 8 – Esquema de retro-cruzamento (Backcross) para introgressão da mutação do gene da miostatina na raça Nelore, proveniente do Belgian Blue, visando à produção dos primeiros animais homozigotos.

Fonte: Araçatuba, 2017.

Em 2007, as fêmeas heterozigotas foram acasaladas com touros Nelore, para produção de animais 3/4 Nelore x Belgian Blue (2° geração), que nasceram no início de 2008. As bezerras nascidas nessa geração foram submetidas a coleta de material biológico (pelos da cauda) para extração e purificação de DNA e posterior análise do gene da miostatina pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para seleção das heterozigotas.

Após a seleção das fêmeas 3/4 Nelore x Belgian Blue heterozigotas para a variante no gene da miostatina, nos anos de 2009 e 2010, 15 novilhas foram escolhidas como doadoras para os trabalhos de aspiração folicular e produção de embriões *in vitro*, realizados em laboratórios comerciais, de acordo com protocolo padrão de cada empresa. Nessa fase do projeto, foi utilizado sêmen de touros da raça Nelore para a fertilização *in vitro* dos oócitos. Os embriões foram transferidos em receptoras previamente sincronizadas. O nascimento dos animais da terceira geração (7/8 Nelore x Belgian Blue) ocorreu até o final de 2011.

Assim como na fase anterior, foi realizado PCR de todos os animais nascidos para identificação da mutação no gene da miostatina e seleção de machos e fêmeas heterozigotos. Além disso, o DNA foi submetido a genotipagem em plataforma de alta densidade de marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) da Illumina, utilizando o BeadChip Bovine HD, com aproximadamente 777 mil marcadores genéticos. Esses dados foram submetidos à análises de bioinformática que permitiram avaliar a proporção genômica racial de cada indivíduo, ou seja, quanto cada animal possui de genoma proveniente da raça Nelore e quanto ainda existe de DNA proveniente da raça Belgian Blue. Essa informação, junto com a avaliação visual, foi utilizada para selecionar os touros e doadoras com maior proporção genômica da raça Nelore para a produção dos animais 15/16 Nelore x Belgian Blue (4° geração), que tiveram início em 2013.

Para a produção dos animais 15/16 Nelore x Belgian Blue, machos e fêmeas, foram utilizadas diferentes estratégias:

- 1) Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de vacas Nelore (Myo^+/Myo^+) com sêmen de touros heterozigotos (Myo^+/Myo^-), 7/8 Nelore x 1/8 Belgian Blue. Produção de animais 15/16 Nelore X 1/16 Belgian Blue, sendo 50% sem a mutação (Myo^+/Myo^+) e 50% heterozigotos (Myo^+/Myo^-).
- 2) Aspiração folicular de doadoras Nelore (Myo^+/Myo^+) acasaladas com touros heterozigotos (Myo^+/Myo^-), 7/8 Nelore x 1/8 Belgian Blue. Produção de animais 15/16 Nelore X 1/16 Belgian Blue, sendo 50% sem a mutação (Myo^+/Myo^+) e 50% heterozigotos (Myo^+/Myo^-).
- 3) Aspiração folicular de doadoras heterozigotas (Myo^+/Myo^-), 7/8 Nelore x 1/8 Belgian Blue, acasaladas com touros Nelore líderes dos principais sumários de avaliação genética do país: Orff AJ, CFM Orgulho, Quark da Colonial, Bacana da MN, Torpedo da Paquetá, Kulal AJ, dentre outros. Produção de animais 15/16 Nelore X 1/16 Belgian Blue, sendo 50% sem a mutação (Myo^+/Myo^+) e 50% heterozigotos (Myo^+/Myo^-).

Essa fase do projeto foi realizada em 4 diferentes fazendas localizadas uma no Estado de São Paulo (Latitude: -21.2115, Longitude: -50.4261), duas em Goiás (Latitude: -16.6651, Longitude: -49.28604), e uma em Mato Grosso do Sul (Latitude: -20.4435, Longitude: -54.6478). Os primeiros animais 15/16 Nelore X Belgian Blue (4° geração) nasceram entre 2013 e 2014.

Em 2015 foram realizados os primeiros procedimentos de aspiração folicular de doadoras 15/16 Nelore x Belgian Blue acasaladas com touros 15/16 Nelore x Belgian Blue, ambos heterozigotos (Myo^+/Myo^-), visando a produção de embriões das três possíveis variantes genéticas, ou seja, homozigotos sem a mutação (Myo^+/Myo^+ = "wild type"), heterozigotos (Myo^+/Myo^-), que carregam a variação em apenas um dos cromossomos e homozigotos mutados (Myo^-/Myo^-), com duas cópias mutadas do gene da miostatina.

Dessa forma, os primeiros bezerros homozigotos mutados nasceram em 2016, possibilitando a realização de análises fenotípicas que permitiram comparar os animais com os três diferentes genótipos (Figura 9).



FIGURA 9 – Imagem dos bezerros nascidos com as três variações no gene da miostatina. A) homozigoto sem a mutação no gene da miostatina; B) heterozigoto; C) homozigoto com a mutação no gene da miostatina.

Fonte: Araçatuba-SP, 2017.

No dia do nascimento, todos os bezerros foram submetidos aos cuidados neonatais de cura de umbigo e aplicação de medicamento antiparasitário e foram devidamente identificados com tatuagem na orelha ou com brinco. Foram coletados dados de peso ao nascimento, sexo (macho ou fêmea) e amostra de pelos da vassoura da cauda para extração de DNA e análise do polimorfismo no gene da miostatina pela técnica de PCR.

Para as análises, inicialmente foi utilizado o seguinte modelo de regressão múltipla:

$$y_{ijk} = \mu + Myo_i + Sexo_j + TR_k + (Myo_i * Sexo_j * TR_k) + e_{ijk}$$

onde,

y_{ijk} = observação associada ao i-ésimo nível de Myo, j-ésimo nível de Sexo e k-ésimo nível do método reprodutivo empregado;

μ = média geral;

Myo_i = i-ésimo nível de Myo;

$Sexo_j$ = j-ésimo nível de Sexo;

TR_k = k-ésimo nível do método reprodutivo;

$(Myo_i * Sexo_j * TR_k)$ = representação de todas as possíveis interações entre as variáveis explicativas;

e_{ijk} = erro aleatório;

Após ajuste desse modelo de regressão múltipla e verificação dos efeitos de interação entre as variáveis explicativas do modelo, a continuidade das análises utilizou novo modelo de regressão linear múltipla:

$$y_{ijk} = \mu + Myo_i + Sexo_j + e_{ijk}$$

onde,

y_{ijk} = observação associada ao i-ésimo nível de Myo, j-ésimo nível de Sexo e k-ésimo nível do método reprodutivo empregado;

μ = média geral;

Myo_i = i-ésimo nível de Myo;

$Sexo_j$ = j-ésimo nível de Sexo;

e_{ijk} = erro aleatório;

Além das análises de peso ao nascimento, foram observados os índices de distocia e as taxas de mortalidade neonatal (0 – 28 dias) dos bezerros produzidos por transferência de embriões produzidos *in vitro* (TE-FIV), entre as 3 possíveis variantes no gene da miostatina. Os partos foram classificados em partos normais (sem necessidade de nenhum auxílio) e partos distócicos (com necessidade de auxílio). Dentre os partos distócicos foi realizada a subdivisão em: auxílio obstétrico, quando foram utilizadas apenas manobras obstétricas para facilitar a liberação do neonato no momento do parto, e cesaria, quando houve necessidade de intervenção cirúrgica.

No grupo dos animais produzidos por IATF foi avaliado a taxa de mortalidade neonatal apenas entre os bezerros homozigotos sem o polimorfismo na miostatina e os heterozigotos, pois nessa fase do projeto não foi produzido nenhum animal homozigoto com a mutação no gene da miostatina proveniente da técnica de IATF.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi acompanhado o nascimento de 898 bezerros 15/16 Nelore x Belgian Blue com as três possíveis variantes no gene da miostatina, sendo: 331 (37%) homozigotos sem o polimorfismo (Myo^+/Myo^+), 508 (57%) heterozigotos (Myo^+/Myo^-) e 59 (6%) homozigotos mutados (Myo^-/Myo^-); Das prenhez produzidas pela técnica de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) nasceram 273 fêmeas (148 Myo^+/Myo^+ e 125 Myo^+/Myo^-) e 300 machos (146 Myo^+/Myo^+ e 154 Myo^+/Myo^-), totalizando 573 animais. Das prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (TE-FIV) nasceram 158 fêmeas (28 Myo^-/Myo^- ; 108 Myo^+/Myo^- ; 22 Myo^+/Myo^+) e 167 machos (31 Myo^-/Myo^- ; 121 Myo^+/Myo^- ; 15 Myo^+/Myo^+), totalizando 325 animais (Quadro 1).

QUADRO 1 – Descrição quantitativa do número de bezerros nascidos (n) dos grupos analisados de acordo com a variante no gene da miostatina, sexo e método reprodutivo utilizado.

MIOSTATINA	IATF		TE-FIV		TOTAL
	FÊMEA	MACHO	FÊMEA	MACHO	
Myo⁻/Myo⁻	0	0	28	31	59
Myo⁺/Myo⁻	125	154	108	121	508
Myo⁺/Myo⁺	148	146	22	15	331
TOTAL	273	300	158	167	898

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

Esses dados foram submetidos a análise estatística com o objetivo de avaliar quais foram os fatores associados com o peso ao nascimento dos bezerros.

A variante no gene da miostatina apresentou efeito altamente significativo ($p=2 \times 10^{-16}$) sobre o peso ao nascimento, com acréscimo de $4,63 \pm 0,32$ kg para cada alelo com a mutação no gene da miostatina. Dessa forma, os animais homozigotos sem a mutação no gene da miostatina (Myo^+/Myo^+) tiveram em média de $31,19 \pm 0,32$ kg ao nascimento. Os bezerros heterozigotos (Myo^+/Myo^-), apresentaram em média $4,63 \pm 0,32$ kg superior ao grupo anterior, com média de $35,82 \pm 0,32$ kg. Os bezerros homozigotos mutados (Myo^-/Myo^-) apresentaram acréscimo médio de $9,26$ kg com relação aos bezerros wild type, com média de $40,46 \pm 0,32$ kg (Quadro 2).

O peso dos animais homozigoto sem a mutação no gene da miostatina ($31,19 \pm 0,32$) foram semelhantes aos valores de peso ao nascimento de animais da raça Nelore ($30,44 \pm 2,43$ kg) apresentados por Lopes et al. (2008) em seu trabalho. O peso dos animais homozigoto com mutação no gene da miostatina ($40,46 \pm 0,32$ kg) foram inferiores aos valores de peso ao nascimento de bezerros da raça Belgian Blue ($49,2 \pm 7,1$ kg) apresentados por Kolkman et al. (2010).

QUADRO 2 – Peso ao nascimento de bezerros com as 3 variações genéticas da miostatina (kg).

SEXO	PESO ENTRE AS VARIANTES DA MIOSTATINA (Kg)		
	Myo+/Myo+	Myo+/Myo-	Myo-/Myo-
MACHO	32,74	37,37	42,01
FÊMEA	31,19	35,82	40,45

valor de $p = 2 \times 10^{-16}$

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

Esses dados foram submetidos a análise estatística com o objetivo de avaliar quais foram os fatores associados com o peso ao nascimento dos bezerros, considerando: 1) polimorfismo no gene da miostatina (Myo⁻/Myo⁻; Myo⁺/Myo⁻; Myo⁺/Myo⁺); 2) sexo (macho ou fêmea); 3) método reprodutivo utilizado (IATF ou TE-FIV), conforme apresentado no Quadro 3.

QUADRO 3 – Análise de variância da variável resposta “peso ao nascimento” em kg, apresentando os resultados de níveis de significância, grau de liberdade, soma de quadrados, quadrado médio e resíduos das variáveis comparativas sexo e método reprodutivo.

VARIÁVEIS	GL	SQ	QM	F	p-valor(>F)
MYO	1	6771,7	6771,7	216,0	$< 2,2e^{-16}$ ***
SEXO	1	537,5	537,5	17,1	$3,794e^{-05}$ ***
MÉTODO	1	8,10	8,10	0,26	0,61
MYO:SEXO	1	0,00	0,00	0,00	0,98
MYO:MÉTODO	1	57,90	57,90	1,85	0,17
SEXO:MÉTODO	1	9,20	9,20	0,29	0,59
MYO:SEXO:MÉTODO	1	19,00	19,00	0,61	0,44
RESÍDUOS	890	27905,5	31,4		

Níveis de significância: 0 (****) 0.001 (***) 0.01 (**) 0.05 (*) 0.1 (.) 1

GL = Graus de liberdade; SQ = Soma de quadrados; QM = Quadrado médio;

F = Teste F; p-valor (>F) = Valor da probabilidade

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

De acordo com o modelo de regressão múltipla utilizado nas análises de peso ao nascimento, não ocorreram efeitos de interações entre as variáveis explicativas do modelo. Somente os efeitos principais do polimorfismo no gene da miostatina e do sexo apresentaram significância estatística, conforme apresentado no Quadro 3.

Como o método reprodutivo não interferiu de forma significativa no peso ao nascimento ($p=0,6110$) o modelo foi ajustado considerando apenas as variáveis de polimorfismo no gene da miostatina e sexo.

As estimativas dos coeficientes mostraram o comportamento da variável “peso ao nascimento” quando há diferença significativa da variável sexo em relação a variação no polimorfismo no gene da miostatina, conforme descrito no Quadro 3.

QUADRO 3 – Estimativas dos coeficientes das variáveis explicativas de peso ao nascimento em kg, considerando o polimorfismo no gene da miostatina e o sexo dos bezerros.

VARIÁVEIS	ESTIMATIVA (Kg)	ERRO-PADRÃO	T	P-VALOR (> t)
MÉDIA	31,19	0,34	90,63	$< 2e^{-16}$ ***
MYO	4,63	0,32	14,52	$< 2e^{-16}$ ***
SEXO (MACHO)	1,55	0,37	4,15	$3.72e^{-05}$ ***

Níveis de significância: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Erro padrão residual: 5.593 sobre 895 graus de liberdade (GL)

R²: 0.207, R² ajustado: 0.2052

Estatística F: 116.8 sobre 2 e 895 GL, p-valor: $< 2.2e^{-16}$

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

Com relação a variável sexo, os machos ($n = 467$) apresentaram $1,55 \pm 0.37$ kg no peso ao nascer acima das fêmeas ($n = 431$) ($p = 3,72^{-05}$). O peso ao nascimento em relação a variável sexo se comportou como descrito na literatura, em diversos trabalhos, em que os machos apresentaram peso superior as fêmeas (ALBUQUERQUE et al., 1993; AMARAL et al., 1991; CUBAS

et al., 2001; JARDIM; PIMENTEL, 1998; MENDONÇA, 2003; NEWMAN; DELAND, 1991; PEROTTO et al., 1999; ROVIRA, 1974).

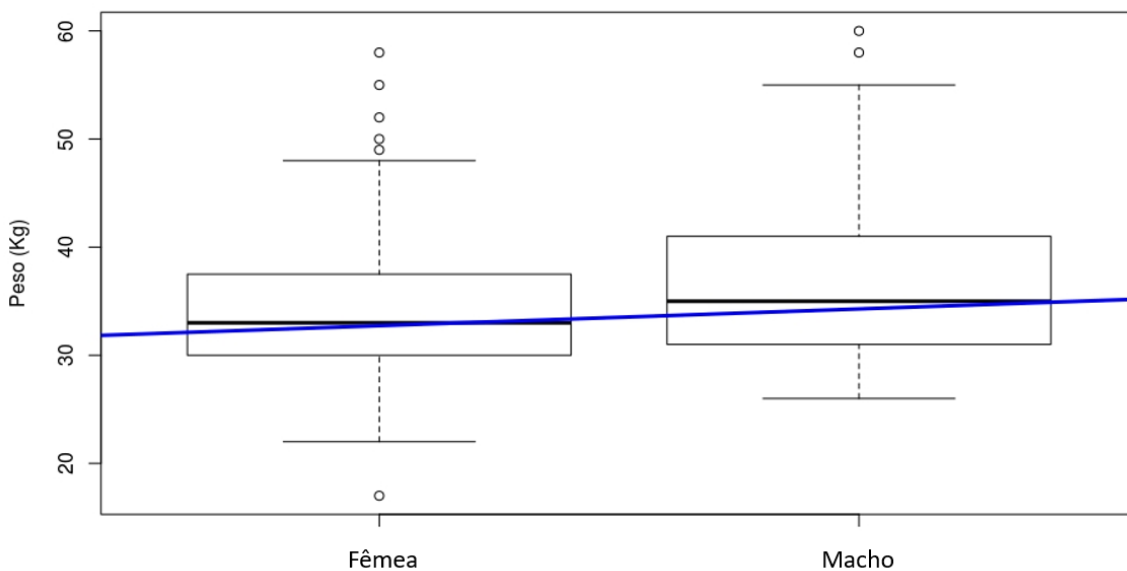


FIGURA 10 – Boxplot para peso ao nascimento em função do sexo dos bezerros. Valores estão expressos em termos de desvios padrão da média geral para peso ao nascimento em função do sexo (macho ou fêmea) dos bezerros.

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

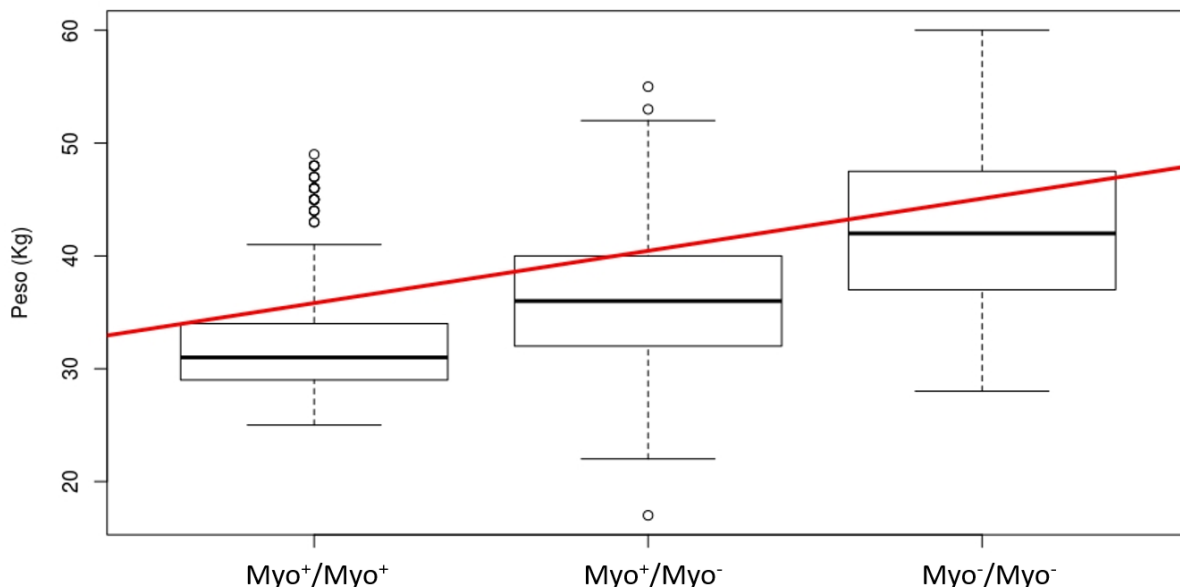


FIGURA 11 – Boxplots para peso ao nascimento em função do polimorfismo no gene da miostatina. Valores estão expressos em termos de desvio padrão da média geral para peso ao nascimento em função da mutação do gene da miostatina (Myo⁺/Myo⁺) – Homozigoto sem a mutação; (Myo⁺/Myo⁻) – Heterozigoto, com uma cópia mutada; (Myo⁻/Myo⁻) – Homozigoto com as duas cópias mutadas).

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

As análises das taxas de parto distócico e mortalidade de bezerros foram subdivididas entre o grupo proveniente de bezerros nascidos pela técnica de transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro* (TE-FIV) e pela técnica de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

No grupo TE-FIV em que foram produzidos bezerros com as 3 possíveis variações no gene da miostatina, dos 325 nascimentos, foram relatados 282 partos normais (sem nenhum tipo de auxílio) e 43 partos distócicos. Dos 59 partos de bezerros homozigotos para o polimorfismo no gene da miostatina, 28 foram distócicos (47,5%). Dos 229 partos de heterozigotos, 13 foram distócicos (5,7%). E dos 37 partos de homozigotos sem o polimorfismo, 2 foram distócicos (5,4%), conforme apresentado no Quadro 4.

QUADRO 4 – Taxa de partos distócicos de bezerros produzidos por transferência de embriões produzidos *in vitro*.

VARIANTE NA MIOSTATINA	NASCIMENTOS	PARTO NORMAL	DISTOCIA	TAXA DE DISTOCIA
Myo-/Myo-	59	31	28	47,5%
Myo+/Myo-	229	216	13	5,7%
Myo+/Myo+	37	35	2	5,4%
TOTAL	325	282	43	13,2%

Fonte: Araçatuba –SP, 2018.

Os 43 partos distócicos foram subclassificados em 37 casos em que apenas houve necessidade de auxílio obstétrico para liberação do neonato no momento do parto e 6 cesarianas. Nos animais homocigotos sem a mutação, apenas em 2 casos houve necessidade de auxílio obstétrico. Nos animais heterocigotos, houve necessidade de realização de uma cesariana de um bezerro com peso de 55 kg ao nascimento, sendo que os outros 12 partos distócicos foram apenas realizadas manobras obstétricas. Nos animais homocigotos mutados, a incidência de intervenção cirúrgica por cesariana foi de 8,5% (5/59) tendo sido realizadas 5 cirurgias e 23 auxílios apenas com manobras obstétricas realizadas no momento do parto.

Com relação aos animais produzidos por IATF em vacas primíparas e múltiparas utilizando sêmen de touros heterocigotos para o polimorfismo no gene da miostatina 15/16 Nelore x 1/16 Belgian Blue, não houve relatos de partos distócicos dentre os 282 nascimentos de bezerros heterocigotos e 291 homocigotos sem o polimorfismo no gene da miostatina.

Para a análise de taxa de mortalidade neonatal foram consideradas os animais que morreram até os primeiros 28 dias, após o nascimento. As taxas de mortalidade dos neonatos produzidos por TE-FIV e IATF estão descritas nos **Quadros 5 e 6**, respectivamente.

QUADRO 5 – Taxa de mortalidade de bezerros produzidos pela técnica de transferência de embriões produzidos *in vitro*, das 3 variações no gene da miostatina.

VARIANTE NA MIOSTATINA	NASCIMENTOS	VIVOS	MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE
Myo-/Myo-	59	37	22	37,30%
Myo+/Myo-	229	217	12	5,20%
Myo+/Myo+	37	35	2	5,40%
TOTAL	325	289	36	11,10%

Fonte: Araçatuba –SP, 2018.

A taxa de mortalidade de bezerros produzidos por TE-FIV nas variantes homocigotos sem a mutação e heterocigotos foi bastante semelhante, com taxa de 5,4% (2/37) para homocigotos normais e 5,2% (12/229) para heterocigotos. Entretanto, a taxa de mortalidade dos animais homocigotos mutados foi significativamente superior, com 22 bezerros mortos dentre os 59 nascidos, o que representa taxa de mortalidade de 37,3%.

QUADRO 6 – Taxa de mortalidade de bezerros produzidos pela técnica de inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore (primíparas e múltiparas) com sêmen de touros heterocigotos para o polimorfismo no gene da miostatina.

MIOSTATINA	NASCIMENTOS	VIVOS	MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE
Myo+/Myo-	282	276	6	2,1%
Myo+/Myo+	291	284	7	2,4%
TOTAL	573	560	13	2,3%

Fonte: Araçatuba – SP, 2018.

A taxa de mortalidade dos bezerros produzidos pela técnica de IATF foi bastante semelhante entre animais heterocigotos (2,1%) e animais homocigotos sem o polimorfismo (2,4%).

Além da alta taxa de distocia e mortalidade de bezerros encontradas nos animais homocigotos mutados, foram observados alguns dos sinais clínicos

descritos na literatura para as raças que possuem a dupla musculatura, como macroglossia (Figura 12A), subdesenvolvimento de genitália externa (Figura 12B) e inserção da cauda anterior (Figura 12C).

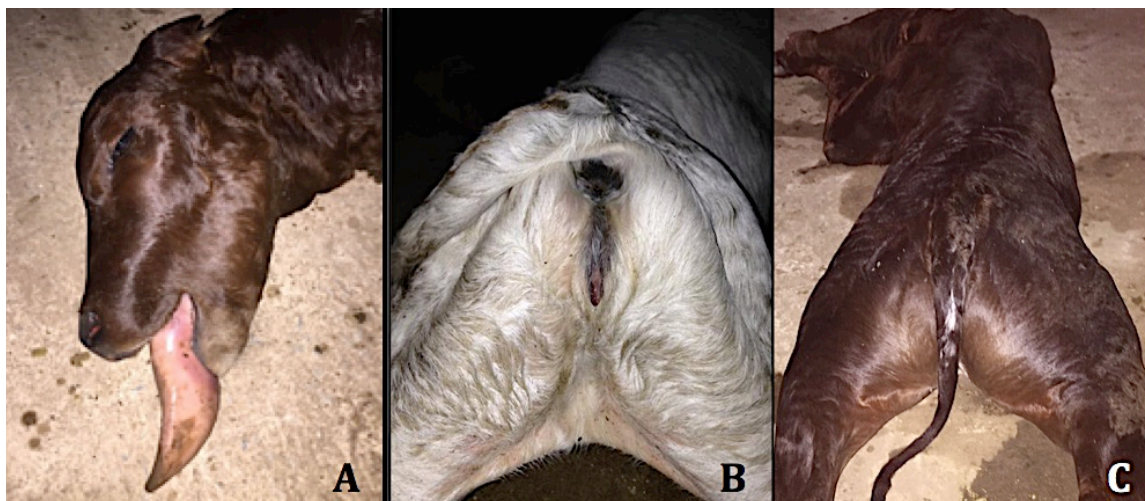


Figura 12 – Imagem demonstrando sinais clínicos associados com bezerros homocigotos para o polimorfismo no gene da miostatina A) macroglossia; B) subdesenvolvimento de genitália externa; C) inserção da cauda anterior.

Fonte: Araçatuba –SP, 2018.

O projeto denominado de Nelore Myo vem sendo conduzido há mais de 13 anos, com o objetivo de introduzir o polimorfismo no gene da miostatina na raça Nelore, através da metodologia de congênia, com o objetivo principal de aumentar o rendimento de carcaça e, conseqüentemente, a produtividade e lucratividade da pecuária de corte.

Enquanto animais da raça Nelore apresentam variação de 50% a 56% de rendimento de carcaça, as raças taurinas que possuem o polimorfismo no gene da miostatina chegam a alcançar até 70% nessa característica, o que representa considerável aumento na lucratividade da cadeia de produção de carne. Entretanto, embora o rendimento de carcaça seja uma das

características mais impactantes financeiramente, uma das principais preocupações relacionada com essa nova linhagem da raça Nelore está relacionada com o nascimento dos bezerros com polimorfismo no gene da miostatina, visto que a literatura científica e os relatos de campo demonstram alto índice de distocia nas raças que apresentam dupla musculatura, como a Belgian Blue, Piemontês, Limousin, Charolês, Marchigiana, entre outras. Dessa forma, antes de multiplicar a linhagem Nelore Myo em fazendas de terceiros, foi realizada criteriosa avaliação do nascimento dos bezerros das três variações genéticas, permitindo avaliação crítica sobre o impacto da mutação da miostatina no nascimento, e os eventuais prejuízos que isso poderia causar no sistema de produção extensivo normalmente utilizado no país. Os dados demonstraram que os bezerros homozigotos sem a mutação genética nascem com média de peso semelhante à raça Nelore, com média de 31,2 kg, sendo que os machos apresentaram em média 1,5 kg acima das fêmeas.

Nas análises referentes ao peso ao nascimento dos bezerros, foi evidenciado que o polimorfismo no gene da miostatina apresentou efeito altamente significativo sobre o peso ao nascimento dos bezerros, comparando as três possíveis variações genéticas. Os dados demonstraram que cada cópia mutada do gene representa, em média, o acréscimo de 4,6 kg no peso ao nascimento dos bezerros. Apesar desse acréscimo, os bezerros heterozigotos não apresentaram altas taxas de distocias e de mortalidade neonatal quando comparados com os bezerros wild type em ambos os métodos reprodutivos empregados.

Por outro lado, o peso ao nascimento dos bezerros homozigotos mutados foi extremamente alto, com média de 40,5 kg, mas com indivíduos que atingem até 60 kg ao nascer. No caso desses animais com peso extremamente elevado, foram encontrados diversos problemas tanto no nascimento como na sobrevivência dos bezerros após o parto.

Vale ressaltar que, até o presente momento, todos os animais homozigotos mutados foram produzidos pela técnica de transferência de

embriões produzidos *in vitro*. Diversos autores já relataram alguns problemas envolvidos com o aumento no tamanho desses bezerros, conhecido com a síndrome do bezerro grande (LOS, do inglês: Large Offspring Syndrome). Uma possibilidade a ser considerada é a associação dos efeitos da miostatina somada aos efeitos da produção *in vitro* (BERTOLINI; ANDERSON, 2002; NUMABE et al., 2001; SINCLAIR et al., 1994). Dessa forma, uma das propostas futuras é produzir animais homocigotos mutados pelas técnicas de produção de embriões *in vivo* e até mesmo pela inseminação de fêmeas heterocigotas.

5 CONCLUSÃO

Os dados sugerem que na raça Nelore a mutação no gene da miostatina quando em heterocigose produz bezerros com maior peso ao nascimento sem causar aumento na taxa de distocia ou na taxa de mortalidade neonatal e que a produção de bezerros homocigotos com o polimorfismo no gene da miostatina ainda apresenta altas taxas de distocia e mortalidade. Concluímos que heterocigotos podem ser produzidos em larga escala, podendo ser uma estratégia vantajosa para aumentar a produtividade da pecuária de corte.

6 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. G.; ELER, J. P.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; SOUZA, R. C. Produção de leite e desempenho do bezerro na fase de aleitamento em três raças de bovinos de corte. **Rev Soc Bras Zoot**, v. 22, n. 5, p. 745-754, 1993.

ALIANÇA NELORE. **Aliança**: sumário aliança touro 2017. Aliança Nelore. Campo Grande, Brasil: GenSys. 2017.

ALIANÇA NELORE. **Aliança**: sumário de touros. Aliança Nelore. Porto Alegre, Brasil: GenSys Consultores Associados. 2011.

ALONSO, R. V. **Fatores que afetam a viabilidade e a proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro em programa comercial de sexagem**. 59 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2008.

ALONSO, R. V.; TANURI, A.; VISINTIN, J. A.; UTSUNOMIYA, Y. T.; GUILHEM, F. C.; CARMO, A.; SOSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F. Application of Congenics to Introgress a Myostatin Mutation in Nellore Cattle via via SNP-Assisted Backcrossing. **Plant and animal genome XXI**, The Largest Ag-Genomics Meeting in the world, San Diego, CA. 2013.

AMARAL, M. O.; QUEIROZ, S. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Efeito da endogamia sobre o peso ao nascer e à desmama de bezerros da raça Caracu. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, João Pessoa, PB. **ANAIS**: Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 28, p. 540, 1991.

AOKI, M. S.; SANTOS, A. R.; LEAL, M. L. Adaptações moleculares ao treinamento de força: recentes descobertas sobre o papel da miostatina. **Rev. Mackenzie Educ. Fís. Esporte**, v. 7, n. 1, p. 161-167, 2008.

ARTHUR, P. F. Double muscling in cattle: a review. **Austr. J. Agric. Res.**, v. 46, p. 1493- 1515, 1995.

ARTHUR, P. F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M. A.; BERT, R. T. Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. **J. Anim. Sci.**, v. 67. p. 902-910, 1988.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). 2018. **A sustentabilidade da carne brasileira**. 2018. Disponível em: <<http://abiec.com.br/NoticiasTexto.aspx?id=1579>>. Acesso em: 6 Jun. 2018.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL (ACNB). **Nelore**: raça. 2016. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca>>. Acesso em: 6 Jun. 2018.

BATCHELDER, C. A.; BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; MOYER, A. L.; HOFFERT, K. A.; PETKOV, S. G.; FAMULA, T. R.; ANGELOS, J.; GEORGE, L. W.; ANDERSON, G. B. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning & Stem Cells**, v. 9, p. 63-82, 2007.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, p. 181-187, 2002.

BOURDON, R. M.; BRINKS, J. S. Genetics, environmental and phenotypic relationships among gestation length, birth weight, growth traits and age at first calving in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 55, n. 3, p. 543-553, 1982.

BOYSE, E. A. The increasing value of congenic mice in biomedical research. **Lab. Anim. Sci.**, v. 27, p. 771 – 781, 1977.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos Indicus* cattle. **Anim. Rep. Sci.**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BREUKELMAN, S. P.; REINDERS, J. M. C.; JONKER, F. H.; RUIGH, L.; KAAL, L. M. T. E.; WAGTENDONK-DE LEEUWB, A. M. VAN.; VOSA, P. L. A. M.; DIELEMANA, S. J.; BECKERSC, J. F.; PERE'NYIC, ZS.; TAVERNEA, M. A. M. Fetometry and fetal heart rates between Day 35 and 108 in bovine pregnancies resulting from transfer of either MOET, IVP-co-culture or IVP-SOF embryos. **Theriogenology**, v. 61, p. 867-882, 2004.

BROWN, C. J.; GALVEZ, M. V. Maternal and other effects on birth weight of beef calves. **J. Anim. Sci.**, v. 28, p. 162-167, 1969.

BUCKINGHAM, M. B. L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUËL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J. Anat.**, v. 202, p. 59-68, 2003.

CAPPUCIO, I.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A.; NARDONE, A.; FILIPPINE, F.; AJMONE-MARSON, P.; VALENTINI, A. A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. **Anim. Genet.**, v. 29, suppl. 1, p. 51, 1998.

CASAS, E.; KEELE, J. M.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; SONSTGARD, T. S.; SMITH, T. P.; KAPPES, S. M.; STONE, R. T. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 468, 1998.

CHARLIER, C.; COPPIETERS; FARNIR, F.; GROBET, L.; LEROY, P. L.; MICHAUX, C.; MNI, M.; SCHWERS, A.; VANMANSHOVEN, P.; HANSET, R.; GEORGES, M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. **Mamm. Genome**, v. 6, n. 11, p. 788-792, 1995.

COOPMAN, F.; GENGLER, N.; GROEN, A. F.; SMET, S.; ZEVEREN, A. Comparison of external morphological traits of newborns to inner morphological traits of the dam in the double muscled Belgian Blue breed. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 121, p. 128–134, 2004.

CUBAS, A. C.; PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J. J. S.; MELLA, S. C. Desempenho até a desmama de bezerros Nelore e cruzas com Nelore. **Rev. Bras. de Zoot.**, v. 30, n. 3, p. 694-701, 2001.

CULLEY, G. **Observations on livestock**. London: G. Woodfall, 1807.

DICKERSON, G. E. **Technique for research in quantitative animal genetics**. ASAP Monograph, 1959.

DOMINIQUE, J. E.; GERÁRD, C. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis natural mutations, physiopathological aspects. **Exp. Cell. Res.**, v. 312, n. 13, p. 2401-2414, 2006.

DU, R.; AN, X.; CHEN, Y.; QIN, J. Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep. **Sci. China C. Life Sci.**, v. 50, n. 5, p. 648-54, 2007.

DUNNER, S.; CHARLIER, C.; FANIR, F. BROUWERS, B.; CANON, J.; GEORGES, M. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: doublemuscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. **Mamm. Gen.**, v. 8, n. 6, p. 430-435, 1997.

ELKINA, Y.; HAEHLING, S.; ANKER, S. D.; SPINGER, J. The role of miostatin in muscle wasting: an overview. **J. Cac. Sar. Mus.**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

ERIKSSON, S.; NÅSHOLM, A.; JOHANSON, K.; PHILIPSON, J. Genetic parameters for calving difficulty, stillbirth, and birth weight for Hereford and Charolais at first and later parities. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 375-383, 2004.

FARIN, P.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178–191, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>. Acesso em: 15 de Novembro de 2017.

GARRY, F. B.; ADAMS, R.; MCCANN, J. P.; ODDE, K. G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 141-152, 1996.

GENGLER, N.; SEUTIN, C.; BOONEN, F.; VAN VLECK, L. D. Estimation of genetic parameters for growth, feed consumption and conformation traits for double-musled Belgian Blue bulls performance-tested in Belgium. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3269- 3273, 1995.

GRISOLIA, A.; ANGELO, G.; PORTO NETO, L. Miostatina (*GDF8*) polimorfismos de nucleotídeo único em bovinos Nelore. **Genética Molecular e Pesquisa**, v. 8, p. 822-830, 2009.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. **Nat. Gen.**, v. 17, n. 1, p. 71- 74, 1997.

GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L. J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MÉNISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mamm Genome**, v. 9, n. 3, p. 210-213, 1998.

HANSET, R.; JANDRIAN, M. Selection for double muscling and calving problems. In: HOFFMANN, B.; MASON, I. L.; SCHMIDT, J. **Current topics in veterinary medicine and animal science**. Suíça: Springer Nature, v. 4, p. 91-104, 1979.

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

HILL, J. J.; QIU, Y.; HEWICK, R. M.; WOLFMAN, N. M. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. **Mol. Endocrinol.**, v. 17, n. 6, p. 1144–1154. 2003.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF BELGIAN BLUE CATTLE BREEDERS (BBI). The presence of the Belgian Blue breed in the world. 2017. Disponível em: http://www.belgianblueinternational.com/bb_in_world.htm. Acessado em 03 de fevereiro de 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/16992-pecuaria-municipal-2016-centro-oeste-concentra-34-4-do-rebanho-bovino-do-pais.html>. Acesso em: 15 de Novembro de 2017.

JACOBSEN, H.; SCHMIDT, M.; HOLM, P.; SANGLID, P.T.; VAJTA, G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultered with or without serum and oviduct epithelium cells. **Theriogenology**, v. 53, p. 1761-1769, 2000.

JARDIM, P. O. C.; PIMENTEL, M. A. Bovinos de Corte. 1 ed. Pelotas: **Editora Universitária/UFPel**, p.185, 1998.

JEANPLONG, F.; SHARMA, M.; SOMERS, G.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 220, n. 1-2, p. 31-37, 2001.

JORGE, A. M.; FONTES, C. A. A.; PAULINO, M. F.; GOMES JÚNIOR, P.; FERREIRA, J. N. Desempenho produtivo de animais de quatro Raças Zebuínas, abatidos em três estádios de maturidade. 2. Características da carcaça. **Rev. Bras.Zoot.**, v. 28, n. 1, p. 381-387, 1999.

JOULIA, D.; BERNARDI, H.; GARANDEL, V.; RABENOELINA, F.; VERNUS, B.; CABELLO, G. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. **Exp. Cell Res.**, v. 286, p. 263-275, 2003.

KAISER. Uber die sogenannten doppelendigen. **Rinder. Landw. Jbr.**, v. 17, p. 387-403, 1888.

KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. **Anim. Genetic**, v. 31, n. 6, p. 396-399, 2000.

KOCH, R. M.; CLARK, R. T. Influence of sex, season of birth and age of dam on economic traits in rage beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 14, p. 386-397, 1955.

KOLKMAN, I.; OPSOMER, G.; LIPS, D.; LINDENBERGH, B.; DE KRUIF, A.; DE VliegHER, S. Pre-operative and operative difficulties during bovine cesarean section in Belgium and associated risk factors. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 45, n. 6, p. 1020-1027, 2010.

KRONACHER, C. Genetik und tierzuchtung. In: BAUR, E.; HARTMANN, M. (Eds) **Handbuch der vererbungswissenschaft**. Berlin: Gerbriider Borntraeger, 1934. v. 3, p. 139.

LANGLEY, B.; THOMAS, M.; BISHOP, A. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 51, p. 49831-49840, 2002.

LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 20, p. 61-86, 2004.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n.16, p. 9306-9311. 2001.

LIMA, G. P.; LIMA L. E. O.; NOLASCO, L. G. Organismos geneticamente modificados: uma proposta de gestão de riscos. **Rev. Jur. Dir. Soc. Justiça**, v. 6, n. 1, p. 160-175, 2018.

LOGEAY, B.; VISSAC, B. Etude du caractère culard. V. Experience de croisement entre bovins culards et normaux. **Ann. Genet. Sel. Anim.**, v. 2, n. 1, p. 5-17, 1970.

LOPES, C. R. A.; BARBOSA, S. B. P.; PEREIRA, R. G. A.; SANTORO, K. R.; LIRA, A. V. Eficiência reprodutiva e influência de fatores de meio e de herança sobre a variação no peso ao nascer de bubalinos no estado de Rondônia. **Rev. Bras.Zootec.**, v. 37, p. 1595-1600, 2008.

MANCEAU, M.; GROS, J.; SAVAGE, K.; THOMÉ, V.; MCPHERRON, A.; PATERSON, B.; MARCELLE, C. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. **Genes Develop.**, v. 22, p. 668-681, 2008.

MCFARLANE, C.; PLUMMER, E.; THOMAS, M. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J. Cell. Physiol.**, v. 209, n. 2, p. 501-514, 2006.

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

MENDONÇA, G.; PIMENTEL, M. A.; CARDELLINO, R. C.; OSÓRIO, J. C. S. Época de nascimento, genótipo e sexo de terneiros cruzas taurinos e zebuínos sobre o peso ao nascer, à desmama e eficiência individual de primíparas Hereford. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, 2003.

MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: KING, J.W.B.; MÉNISSIER, F. **Current topics in veterinary medicine and animal science**. Dordrecht: Springer, 1982. v. 16, p. 23-53.

MOSHER, D. S.; QUIGNON, P.; BUSTAMANTE, C. D.; SUTTER, N. B.; MELLERSH, C. S.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **PLOS Gen.**, v. 3, n. 5, p. 779-786, 2007.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. The regulation of TGFbeta signal transduction. **Development**, v. 136, n. 22, p. 3699-3714, 2009.

NADEAU, J. Modifier genes in mice and human. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, p. 165-174, 2001.

NEWMAN, S.; DELAND, M. P. Lifetime productivity of crossbred cows. 2 Age and weight at first oestrus, calf birth weight, assisted calvings, calving interval and reproduction rate. **Austr J Exp Agric, Port Melbourne**, v. 31, n. 3, p. 293 - 300, 1991.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth weight and birth rate of heady calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 64, p. 13-20, 2001.

OLIVER, W. M. **Double muscling in cattle**. A review of expression, genetics and economic implication. 12.ed. Texas: Texas A.& M University, p. 1968. 58.

PASTOR, F. M.; FALÇONI, F. M. S. M.; LIMA, D. V. Cruzamentos entre a raça Nelore e Bos Taurus: um potencial para melhoria do rendimento de carcaça. **PUBVET**, v. 11, n. 7, p. 723-726, 2017.

PEIXER, M. A. S.; DODE, M. A. M.; RUMPF, R. In vitro production of embryos Embrapa genetic resources and biotechnology poin of view. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, p. 163-166, 2000.

PEROTTO, D., ABRAHÃO, J. J. S., CUBAS, A. C. Efeitos da raça e da heterozigose sobre características ponderais de bezerros Nelore e mestiços Red Angus x Nelore. **R. Bras. Zootec.**, v. 28, n. 3, p. 504-511, 1999.

PRESTES, N. C. In vitro production of bovine embryos an obstetric overview of problems and challenges. **Acta. Scient. Vet.**, v. 33, p. 119-124, 2005.

PROUDFOOT, C.; CARLSON, D. F.; HUDDART, R.; LONG, C. R.; PRYOR, J. H.; KING, T. J.; LILICO, S. G.; MILEHAM, A. J.; MCLAREN, D. G.; WHITELAW, C. B. A.; FAHRENKRUG, S. C. Genome edited sheep and cattle. **Transgenic Res**, v. 24, p. 147–153, 2015.

REBBAPRAGADA, A.; BENCHABANE, H.; WRANA, J. L.; CELESTE, A. J.; ATTISANO, L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, v. 23, n. 20, p. 7230-42, 2003.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; FEIJÓ, G. L. D.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; BERNARDES, R. A. C.; FATURI, C.; PACHECO, P. S. Características da carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes composições raciais Charolês e Nelore. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 5, p. 1371-1379, 2000.

RICE, L. E.; WILTBANK, J. N. Factors affecting dystocia in beef heifers. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 161, n. 11, p. 1348-1358, 1972.

RODINO-KLAPAC, L. R.; HAIDET, A. M.; KOTA, J.; HANDY, C.; KASPAR, B. K.; MENDELL, J. R. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle Nerve**, v. 39, n. 3, p. 283-296, 2009.

RODGERS, B. D.; GARIKIPATI, D. K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. **Endocr. Rev.**, v. 29, n. 5, p. 513-534, 2008.

ROGNER, U. C.; AVNER, P. Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, p. 243 – 252, 2003.

ROVIRA, J. Reproduccion y manejo de los rodeos de cria. Montevideo : Hemisferio Sur, p. 296, 1974.

SANTIAGO, A. A. **A raça Nelore**. Gado Nelore: 100 anos de seleção. São Paulo: Ed. dos Criadores, 1987. 594 p.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F. In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. **J Anim Sci**, v. 60, p. 55-64, 1995.

SCHUELKE, M.; KATHRYN, R. W.; STOLZ, L. E.; HÜBNER, C.; RIEBEL, T.; KÖMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S-J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 10, p. 2682-2688, 2004.

SHIBATA, M.; OHSHIMA, K.; KOJIMA, T.; MURAMOTO, T.; MATSUMOTO, K.; KOMATSU, M.; AIKAWA, K.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M. Nucleotide sequence of myostatin gene and its developmental expression. In skeletal muscles of Japanese Black cattle. **Anim. Sci. J.**, v. 74, p. 383-390, 2003.

SILVA, M. C.; BOAVENTURA, V. M.; FIORAVANTI, M. C. S.; História do povoamento bovino no Brasil central. **Rev. UFG.**, v. 13. p. 34-41, 2012.

SILVER, S. Congenic strain. In: *ENCYCLOPEDIA of genetics*. United Kingdom: Elsevier, 2001. p. 443-445,

SOLINAS-TOLDO, S.; LENGAUER, C.; FRIES, R. Comparative genome map of man and cattle. **Genomics**, v. 27, p. 489-496, 1995.

SOPEÑA QUESADA, A.; BLANCO CACHAFEIRO, M. E. Reproduction de la femelle culard en race Asturienne. **Ann. Genet. Sel. Anim.**, v. 4, p. 132, 1971.

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

SMITH, J. A.; LEWIS, A. M.; WIENER, P.; WILLIAMS, J. L. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: Allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Anim. Gen.**, v. 31, p. 306-309, 2000.

SUZUKI, J. B. **OGM**: aspectos polêmicos e a nova lei de biossegurança. Disponível em: <<http://idisa.org.br/img/File/OGM.pdf>.> Acesso em: 20 mar. 2018.

TAJBAKHSH, S.; ROCANCOURT, D.; COSSU, G. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. **Cell**, v. 89, p. 127-138, 1997.

TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla: II – Determinação genética. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v. 14, n. 1, p. 17-23, 2005.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 51, p. 40235–40243, 2000.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 32, p. 100-109, 2008.

VISSAC, B.; PERREAU, B.; MANLEON, P.; MENISSIER, F. Etude du caractere culard. IX. Fertilité des femelles et aptitude maternelle. **Ann. Genet. Sel. Anita.**, v. 6, p. 35, 1974.

WALKER, S. K.; HARTWICH, K. M.; SEAMARK, R. F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. **Theriogenology**, v. 45, p. 111-120, 1996.

WEBER, A. D.; IBSEN, L. The occurrence of the double-muscled character in purebred beef cattle. **Proc. Am. Soc. Anim. Prod.**, v. 27, p. 228, 1934.

WEINTRAUB, H.; DAVIS, R.; TAPSCOTT, S.; THAYER, M.; KRAUSE, M.; BENEZRA, R.; BLACKWELL, T. K.; TURNER, D.; RUPP, R.; HOLLENBERG, S. The myoD gene Family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. **Science**, v. 251, p. 761-766, 1991.

WHITTEMORE, L. A.; SONG, K.; LI, X.; AGHAJANIAN, J.; DAVIES, M.; GIRGENRATH, S. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 300, n. 4, p. 965–971, 2003.

WILSON, J. M.; WILLIAMS, J. D.; BONDIOLI, K. R.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; MCCALLA, D. F. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim Reprod Sci**, v. 38, p. 73-83, 1995.

WRIEDT, C. Die vererbung des doppelender – kharacters die rindern. **Z. Indukt. Abstamm. VererbungsI**, v. 51, p. 482–486, 1929.

YANG, Y. P.; WOMACK, J. E. Construction of a bovine chromosome 19 linkage map with an interspecies hybrid backcross. **Mamm. Genome**, v. 8, n. 4, p. 262-266, 1997.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v. 3, p. 155–163, 1998.

ZIMMERS, T. A.; DAVIES, M. V.; KONIARIS, L. G.; HAYNES, P.; ESQUELA, A. F.; TOMKINSON, K. N. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, v. 296, p. 1486–8, 2002.