

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

Altair de Souza Rodrigues Neto

**Desenvolvimento de teste de DNA para detecção da mutação Q204X no gene *MSTN*
em bovinos da raça Bonsmara**

Campo Grande, MS

2024

Altair de Souza Rodrigues Neto

**Desenvolvimento de teste de DNA para detecção da mutação Q204X no gene *MSTN*
em bovinos da raça Bonsmara**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Banca examinadora da
Universidade Federal do Mato Grosso do
Sul, com a finalidade de obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Aline Pedroso Lorenz

Co-orientadora: Dra. Fabiane Siqueira

Campo Grande, MS

2024

Agradecimentos

Ao apoio que recebi de minha família, uma vez que sempre foram minha base.

Aos professores que entraram em meu caminho, em especial à Profa. Dra. Ana Paula Costa Marques e minha orientadora, Profa. Dra. Aline Pedroso Lorenz e aos meus colegas de curso, em especial à Julia Crepaldi.

À Embrapa Gado de Corte, pela oportunidade de aprendizado.

À Cabaña Bella Alianza pelo financiamento da pesquisa e pelo fornecimento das amostras biológicas e dos dados fenotípicos.

À FUNDAPAM por ter administrado os recursos financeiros e ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC.

E, especialmente, a Dra. Fabiane Siqueira, que além de supervisora e orientadora, se tornou pra mim um símbolo de inteligência e dedicação.

Resumo

A síndrome da musculatura dupla (MD) é observada em diferentes raças bovinas e é caracterizada por hipertrofia muscular, reconhecida pelo aumento dos músculos, especialmente na região do quarto traseiro. A MD se manifesta quando ocorrem mutações no gene *MSTN* (*Myostatin*), responsável por codificar a proteína miostatina, que é um regulador negativo do desenvolvimento muscular. Assim, objetivou-se a prospecção de polimorfismos no gene *MSTN* por meio de sequenciamento, visando o desenvolvimento de um teste de DNA que possibilite a identificação precoce de animais Bonsmara que sejam portadores do alelo mutado. Para isso, foram coletadas amostras biológicas de famílias nas quais o fenótipo MD estava segregando, com base apenas em observações visuais. Para o sequenciamento foram utilizados oito pares de *primers* e os eletroferogramas gerados foram editados e analisados usando o *Software Unipro UGENE* (versão 49.1). As sequências obtidas foram alinhadas contra a sequência de referência do genoma bovino e as sequências consenso foram comparadas para a identificação de mutações. No éxon 2, foi encontrado o polimorfismo Q204X, uma mutação disruptiva causada por transição de citosina para timina no nucleotídeo 610. Para o desenvolvimento do teste de DNA, foram sintetizados quatro pares de *primers* específicos para detectar essa mutação. Esses *primers* foram usados para genotipar 818 animais, por meio da técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*). Os resultados obtidos evidenciaram que em Bonsmara a presença de pelo menos um alelo mutado Q204X está associado ao aumento no peso de bezerras ao nascer, na musculabilidade e aumento no escore para harmonia, sendo harmonia a principal característica fenotípica utilizada pelos produtores para selecionar os animais.

Palavras-chave: ARMS-PCR, gene *GDF-8*, hipertrofia muscular, melhoramento genético, miostatina.

Abstract

Double muscle syndrome (DM) is observed in different cattle breeds and is characterized by muscular hypertrophy, recognized by the increase in muscles, especially in the hindquarter region. DM manifests itself when mutations occur in the MSTN (Myostatin) gene, responsible for encoding the myostatin protein, a negative regulator of muscle development. Thus, the objective was to prospect for polymorphisms in the MSTN gene through sequencing, aiming to develop a DNA test that allows the early identification of Bonsmara animals that carry the mutated allele. For this, biological samples were collected from families in which the DM phenotype was segregating, based only on visual observations. For sequencing, eight pairs of primers were used and the electropherograms generated were edited and analyzed using the Unipro UGENE Software (version 49.1). The sequences obtained were aligned against the reference sequence of the bovine genome and the consensus sequences were compared to identify mutations. In exon 2, the Q204X mutation was found, a disruptive mutation caused by a transition from cytosine to thymine at nucleotide 610. To develop the DNA test, four pairs of specific primers were synthesized to detect this mutation. These primers were used to genotype 818 animals, using the ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction) technique. The results showed that in Bonsmara the presence of at least one Q204X mutated allele is associated with an increase in calf weight at birth, in muscularity and an increase in the harmony score, with harmony being the main phenotypic characteristic used by producers to select the animals.

Key-words: ARMS-PCR, GDF-8 gene, muscle hypertrophy, genetic improvement, myostatin.

Introdução

A raça Bonsmara foi desenvolvida em estações de pesquisa sul-africanas pelo Prof. Jan Bonsma, no período de 1937 a 1963, a partir de cruzamentos do Afrikaner (*Bos taurus africanus*, Sanga) e as raças Shorthorn e Hereford (*Bos taurus taurus*). O objetivo era criar uma raça produtiva, com carne de alta qualidade e adaptada ao calor. Os animais foram submetidos a avaliações detalhadas, considerando fatores como frequência respiratória e cardíaca, capacidade de locomoção, densidade de glândulas sudoríparas, comprimento e espessura dos pelos (ABCB, 2020).

Criada com o objetivo de unir produtividade, qualidade e adaptação, a raça se destaca não apenas por sua origem cuidadosamente planejada, mas também pelo potencial de aprimoramento contínuo por meio de tecnologias modernas, sendo a seleção assistida por marcadores moleculares uma das ferramentas utilizadas pelos programas de melhoramento genético de bovinos de corte. Essa abordagem permite identificar, ainda na idade jovem, reprodutores e matrizes com potencial genético para transmitir alelos favoráveis, promovendo o aprimoramento dos rebanhos. Nesse contexto, os testes de DNA surgem como uma ferramenta promissora, ao possibilitarem a identificação do genótipo de indivíduos para genes associados a características de interesse econômico. Essa tecnologia viabiliza o planejamento eficiente dos sistemas de acasalamento, aumentando a frequência de alelos benéficos na população e, assim, melhorando a eficiência produtiva e a qualidade do produto.

Entre as características genéticas que geram interesse de estudo, destaca-se a síndrome da musculatura dupla (MD), presente em várias raças bovinas. Essa condição é caracterizada pela hipertrofia muscular (*Muscle Hypertrophy* - MH), especialmente na região do quarto traseiro, onde os contornos musculares são nitidamente visíveis sob a pele (Bass *et al.*, 1999). Animais com MD possuem maior proporção de músculo, menor quantidade de osso e gordura e uma elevada porcentagem de cortes de carne de alto valor, gerando cerca de 20% mais carne em cada animal. No entanto, apesar do aumento desejado na massa muscular, essa síndrome está associada a diversos problemas, tais como redução de fertilidade, tanto em machos quanto em fêmeas; genitália externa subdesenvolvida; alta incidência de distocia; baixa viabilidade dos bezerros; língua aumentada e projetada para fora da boca em bezerros recém-nascidos; aumento da susceptibilidade ao estresse; susceptibilidade a doenças respiratórias; entre outros (Arthur, 1995; Goyache *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2006; Fiems, 2012).

A MD é causada pela inativação da proteína miostatina que é um regulador negativo da miogênese e é codificada pelo gene *MSTN* (*Myostatin*). Até o momento, são conhecidas cerca de nove mutações que afetam o código sequencial do gene *MSTN*: seis que inativam a

proteína e três mutações sinônimas (F94L, S105C e D182N) (Miranda, 2002; Gadanho, 2014). Há relatos na literatura de que as seis mutações nas regiões codificantes do gene causam códons prematuros de parada (*stop codons*), inativando a proteína e, conseqüentemente, resultando em hipertrofia das fibras musculares. São elas: nt821 (del11, deleção de 11 pares de bases (pb) entre os nucleotídeos 821 a 831), nt419 (del17-ins10, deleção/inserção na qual dez bases não relacionadas são inseridas no lugar de sete bases que foram deletadas no nucleotídeo 419), Q204X (C → T), E226X (G → T), E291X (G → T) e C313Y (G → A) (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron & Lee, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Cappuccio *et al.*, 1998; Marchitelli *et al.*, 2003).

Com a identificação das diferentes mutações no gene da miostatina bovina, têm sido desenvolvidos testes moleculares baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR), para os quais são desenhados *primers* específicos para detectar os animais homozigotos e heterozigotos para tais mutações. Esse procedimento vem sendo de grande utilidade em programas que visam melhorar a produtividade e a qualidade da carne bovina (Karim *et al.*, 2000).

Dessa forma, objetivou-se prospectar mutações no gene *MSTN* e desenvolver um teste de DNA que permita identificar precocemente os animais portadores de alelo(s) mutado(s). Os resultados obtidos permitirão aos produtores otimizar o processo de seleção genética, tornando mais eficiente a escolha de reprodutores para as próximas gerações. Esse avanço facilitará tanto a introdução controlada de alelos favoráveis quanto sua eliminação, dependendo das metas específicas de melhoramento genético de cada criador.

Material e Métodos

Para o sequenciamento do gene *MSTN*, a identificação de mutações e o desenvolvimento de um teste de DNA, foram realizadas três coletas de amostras biológicas e dados fenotípicos em uma fazenda parceira nos anos de 2020, 2021 e 2022. Na primeira coleta, foram obtidas 52 amostras de sangue e oito de sêmen, provenientes de famílias em que o fenótipo MD estava presente, incluindo pais portadores e irmãos com e sem a síndrome. Nas coletas subsequentes, foram obtidas, aproximadamente, 750 amostras de sangue de animais machos e fêmeas de diferentes idades, ampliando, assim, a base de estudo para análise genética.

O DNA genômico de todas as amostras biológicas foi extraído utilizando o método descrito por Regitano e Coutinho (2001). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific*) e em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE 10X (Tris-Borato-EDTA), por meio de comparação com um padrão de DNA de concentrações conhecidas (50, 100 ou 200 ng/μL), corado com *SyberGold* (1:10.000), visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

Para amplificação dos éxons 1, 2 e 3 e das regiões não traduzida (UTRs) 5'e 3' do gene *MSTN* foram desenhados *primers* específicos a partir das sequências do gene que estão depositados no banco de dados público *Genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), com o auxílio do *software primer 3 plus* disponível *online* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), e sua qualidade foi verificada pelo *software OligoAnalyzer v3.1*, disponível *online* (<http://www.iddna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) (Xavier, 2014). Os pares de *primers* utilizados, o tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicons*) e as temperaturas de anelamento (TA) padronizadas para cada par de *primer* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Posição dos nucleotídeos no gene *MSTN*, as sequências dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizadas no sequenciamento, tamanho dos fragmentos amplificados (*amplicons*) e temperatura de anelamento (TA) padronizada para cada par de *primer*.

Região	Primers (F/R)	Sequência 5'→3'	Fragmentos de DNA (pb)	TA (°C)
UTR5'+1	1F	GAGATTCATTGTGGAGCAAGAG	478	58
	1R	CCTTGGGCAAAAGTTGTCTG		
1	2F	AATGAGAACAGCGAGCAGAAG	538	58
	2R	TGCAAGCATTTCATTTTTGAT		
2	3F	TGATATGGAGGTCGTTCCG	564	58
	3R	GGCACCTTTGTCTGGCTTAT		
3	4F	TCCTTAATGCTGTGCCTTTTA	550	60
	4R	TCCATGTTTGAGGAAGCTATG		
UTR3'+3	5F	GGCCCCTGCTGTACTCCTAG	564	60
	5R	AAATTCAAGTGTTTAAGGATGTTC		
UTR 3'	6F	GGAGATCAAATTCCATTTATGTTC	538	60
	6R	GCCTTTTCAATGCAGCTTCT		
UTR 3'	7F	CAGGTGCATTTTCACACTCC	542	60
	7R	CACATTCACATTATACAGCCATCA		
UTR 3'	8F	TCCATATGCTAATGGTTAGATGGT	507	60
	8R	CCAAACTTTTGTGCTCAGTCAT		

F: *primer forward* e R: *primer reverse*. UTR = Região não traduzida. pb: pares de bases.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 10X (Tris-Borato-EDTA). Foram utilizados cerca de 3 µL da solução de produto de PCR acrescidos de 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl, 0,1 mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02; glicerol 50%). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados em solução contendo *SyberGold* (1:10.000) para observação dos fragmentos amplificados. Os tamanhos dos fragmentos amplificados (Tabela 1) foram determinados pela comparação com um marcador de peso molecular de 1 kb e a imagem de cada gel foi fotografada por um sistema digital de foto-documentação *Gel-Doc*, com transiluminador ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados com 0,5 UI das enzimas *EXO-SAP* (*Exonuclease I*, *Shrimp Alkaline Phosphatase*) e incubados a 37 °C por 30 minutos seguido de 20 minutos a 80 °C. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *kit BigDye®*

Terminator Cycle Sequencing (versão 3.1, *Applied Biosystems*, Foster City CA, USA), sendo a mesma preparada em um volume final de 10 μ L com 1,6 μ M *primer F* ou *primer R* e, aproximadamente, 10 μ L de produto de PCR purificado com *EXO-SAP*. Foram realizadas duas reações+ para cada amostra, um com o *primer F* e outro com o *primer R*.

A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems*, utilizando o seguinte programa: 96 °C /1', seguido de 25 ciclos de 96 °C /10", 50 °C /5" e 60 °C por 4". Por fim, uma nova etapa de purificação foi realizada utilizando-se EDTA (125 mM, pH 8,0), etanol 70% e etanol absoluto. Os produtos da PCR purificados foram sequenciados em um sequenciador automático modelo ABI-3130® (*Applied Biosystems*). Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento foram editados e analisados usando o *Software Unipro UGENE* (versão 49.1) (Okonechnikov *et al.*, 2012).

Inicialmente, as sequências foram editadas para remoção de trechos de baixa qualidade. Em seguida, as sequências geradas para cada produto de PCR (uma com *primer F* e outra com *primer R* para cada uma das amostras) foram alinhadas entre si. E por fim, as sequências consenso geradas a partir das sequências de cada produto de PCR foram alinhadas contra a sequência de referência do gene *MSTN* do genoma de *Bos taurus* obtida no *Genebank*, para prospecção de mutações relacionadas à hipertrofia muscular. Nessa etapa, foram analisados 15 indivíduos nos quais o fenótipo da hipertrofia muscular estava segregando, com base apenas em observações visuais (pais portadores e irmãos com e sem o fenótipo).

Para o desenvolvimento do teste de DNA, foram sintetizados quatro pares de *primers* (Antoniou & Grosz, 1999), que foram usados para genotipar 818 animais, sendo 782 fêmeas e 36 machos, por meio da técnica de ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction*). A reação de amplificação foi realizada em termociclador *Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems*, utilizando o seguinte programa: 95 °C /4', 35 ciclos de 94 °C /1', 64 °C /1' e 72 °C /1', seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 10X (Tris-Borato-EDTA) e os tamanhos dos fragmentos foram determinados pela comparação com um marcador de peso molecular de 1 kb.

Para visualização dos fragmentos amplificados, foram aplicados no gel de agarose 10 μ L de um mix contendo: 1 μ L do produto de PCR, 2 μ L de tampão de corrida (Tris-HCl, 0,1 mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02; glicerol 50%; *SyberGold* na concentração de 1:10.000) e 7 μ L de água milliQ. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram determinados pela comparação com um marcador de peso molecular de 1 kb e a imagem de cada gel foi

fotografada por um sistema digital de foto-documentação *Gel-Doc*, com transiluminador ultravioleta.

A partir dos genótipos identificados nos géis, as frequências alélicas e genótípicas foram determinadas contando o número de cada alelo e de cada genótipo e dividindo pelo número de alelos e genótipos avaliados. Estas frequências foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado a 5% de significância. Os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg também foram analisados pelo teste. (Tabela 2).

No estudo de associação, foram avaliadas as seguintes características fenotípicas: fertilidade (notas de 1-9), musculosidade (1-9), frame (altura/estrutura) (1-5), adaptação (1-9), harmonia (eficiência funcional) (1-9), peso ao nascer, peso ajustado aos 100 dias, peso ajustado aos 205 dias, peso ajustado aos 365 dias e idade ao primeiro parto. Foram avaliados somente os dados das fêmeas que possuíam medidas fenotípicas para todas as características avaliadas e os genótipos homocigoto normal (+/+, com nenhuma cópia do alelo mutado) e heterocigoto (mh/+, com uma cópia do alelo mutado), pois foram genotipados poucos indivíduos machos e apenas quatro animais homocigotos para MD (mh/mh, com duas cópias do alelo mutado).

Foram criados grupos contemporâneos (grupos de animais que nasceram na mesma fazenda e compartilham as mesmas características ambientais) para os pesos ajustados aos 100 dias, 205 dias e 365 dias, sendo que aos 365 dias as análises foram feitas concatenando os 100 dias e os 205 dias e a data da medida do peso aos 365 dias. Além disso, foram excluídos das análises os grupos contemporâneos com um ou dois animais, tendo sido avaliados somente as fêmeas que ficaram em grupos que continham pelo menos três animais. Dessa forma, foram considerados nas análises estatísticas apenas 675 animais (fêmeas).

O estudo de associação foi realizado utilizando Análise de Variância (ANOVA) utilizando o procedimento *General Linear Models* (GLM) do programa estatístico SAS (SAS, *SAS on Demand for Academics*, Cary, NC). Para essa análise foi utilizado um modelo fixo, sendo considerado como efeito fixo os grupos contemporâneos e como co-variável linear a idade do animal no dia da medida. O teste de Tukey-Kramer foi utilizado para comparar as médias de todas as variáveis, considerando 0,05 (5%) como nível de significância.

Resultados e Discussão

Os três éxons e parte das duas UTRs (5' e 3') do gene *MSTN* foram sequenciados e analisados para prospecção de polimorfismos relacionados à síndrome da musculatura dupla em animais Bonsmara. Nessa etapa, foram analisados 15 indivíduos nos quais o fenótipo MD estava segregando, com base apenas em observações visuais (pais portadores e irmãos com e sem o fenótipo).

No éxon 2, foi encontrada a mutação *nonsense* ou disruptiva denominada de Q204X, causada por transição de citosina para timina (C → T) no nucleotídeo 610. Essa mutação produz um *stop códon* no peptídeo N-terminal associado à latência na posição 204 do aminoácido, inativando, assim, a proteína miostatina e causando hipertrofia muscular em algumas raças de bovinos, como Charolês, Limousin e Blonde d'Aquitaine (Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003; Allais *et al.*, 2010, Gadanho, 2014).

Como pode ser observado na Tabela 2, dos 818 animais Bonsmara genotipados, 410 (50,1%) apresentaram o genótipo homozigoto (+/+), sem a presença da mutação Q204X (Figura 1), 404 (49,4%) apresentaram o genótipo heterozigoto (+/mh) (Figura 2), e quatro (0,5%) apresentaram o genótipo homozigoto (mh/mh) (Figura 3), com fenótipo extremo para musculatura dupla. A proporção de touros heterozigotos (66,7%) foi maior do que a proporção de fêmeas heterozigotas (48,6%). A frequência do alelo Q204X na amostra estudada foi estimada em 25,2%, sendo de 24,6% para as fêmeas e de 38,9% para os machos. Essa alta frequência do alelo mutado pode ser explicada devido ao uso intenso de alguns touros que, provavelmente, são portadores do alelo mutante. Além disso, a diferença calculada entre a frequência observada e esperada para os três genótipos evidencia que esta população não está sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que a mutação Q204X tem sido favorecida neste rebanho.



Figura 1- Eletroferograma de um animal normal. Evidenciado que não houve a mutação de troca de uma Citosina por uma Timina (C->T) nos alelos. Análise realizada pelo Software Unipro Ugene.

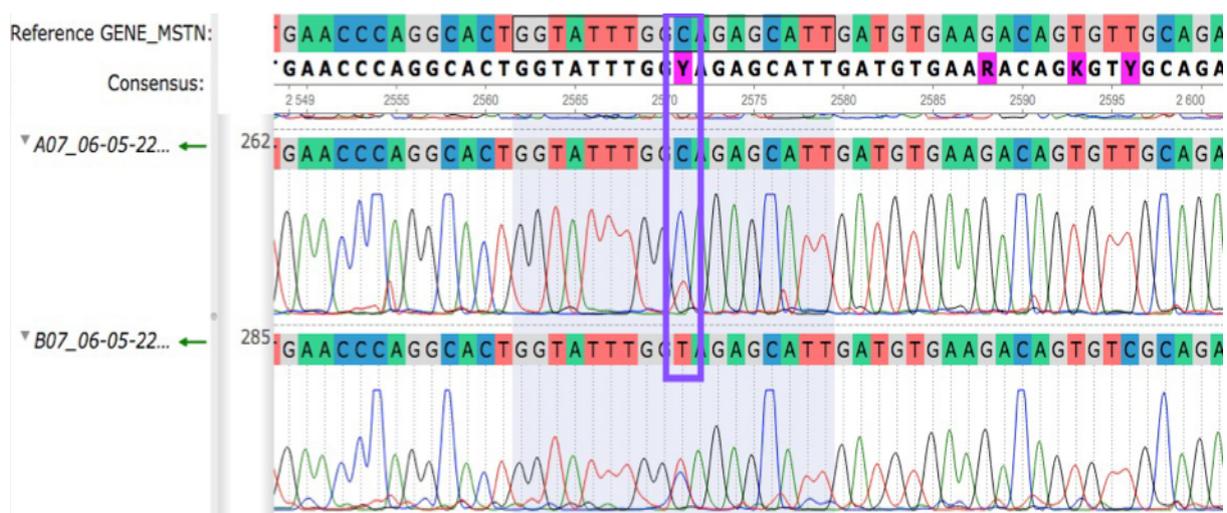


Figura 2- Eletroferograma de um animal heterozigoto. Evidenciada a mutação de troca de uma Citosina por uma Timina (C->T) em somente um alelo. Análise realizada pelo Software Unipro Ugene (versão 49.1).

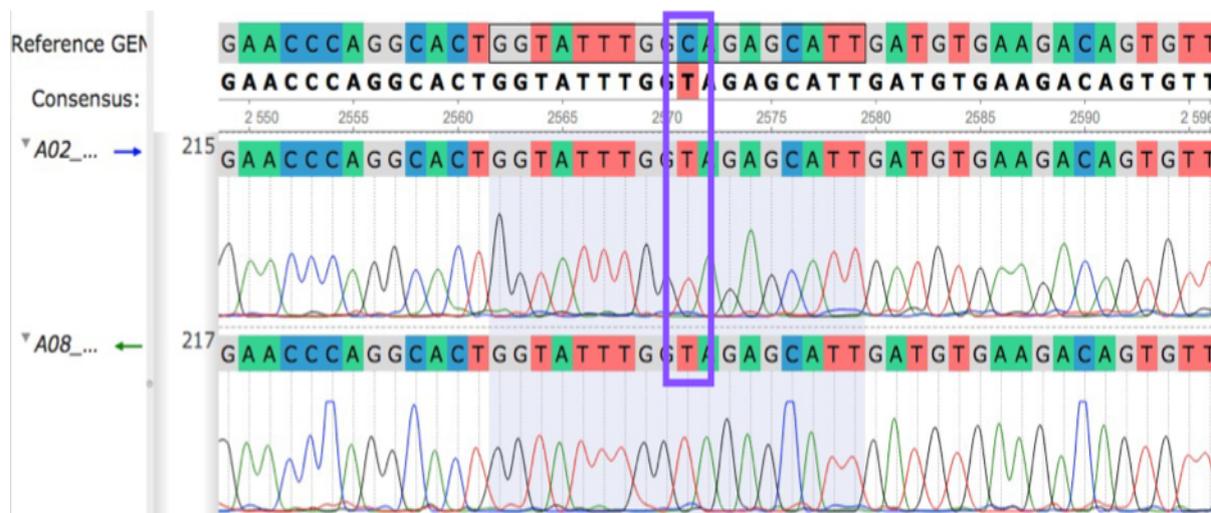


Figura 3- Eletroferograma de um animal homocigoto portador da MD. Evidenciada a mutação de troca de uma Citosina por uma Timina (C->T) nos dois alelos. Análise realizada pelo Software Unipro Ugene.

Tabela 2 - Frequências alélicas e genótípicas para a mutação Q204X observadas em animais da raça Bonsmara.

Q204X							
	Genótipos *			Total	Alelos **		Total
	+/+	+/mh	mh/mh		+	mh	
Frequência Relativa							
Fêmeas	51,2	48,6	0,3	100,0	75,4	24,6	100,0
Machos	27,8	66,7	5,6	100,0	61,1	38,9	100,0
Geral	50,1	49,4	0,5	100,0	74,8	25,2	100,0
Frequência Absoluta							
Fêmeas	400	380	2	782	1180	384	1564
Machos	10	24	2	36	44	28	72
Geral	410	404	4	818	1224	412	1636

* Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as frequências genótípicas, pelo teste de Qui-quadrado.

** Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as frequências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado.

Os resultados obtidos com o estudo de associação entre a mutação Q204X e as características fenotípicas avaliadas evidenciaram que em Bonsmara a presença de pelo menos um alelo mutado Q204X está associada ($P < 0,05$) a um aumento no peso de bezerras ao nascer, aumento de musculosidade e aumento no escore para harmonia, sendo harmonia a principal característica fenotípica utilizada pelos produtores para selecionar os animais. Para

as demais características avaliadas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Como consequência do aumento do peso ao nascer, as dificuldades de parto também aumentaram significativamente, conforme observado por outros autores (Casas *et al.*, 1999; Short *et al.*, 2002; Wiener *et al.*, 2009) e relatado por produtores de Bonsmara (comunicação pessoal). No entanto, Short *et al.* (2002) apontaram que na raça Piemontês, a distocia foi aumentada em novilhas quando estas pariram bezerros com uma ou duas cópias do alelo inativo para a mutação C313Y, mas eles não encontraram nenhum efeito em bezerros com estes fenótipos.

Casas *et al.* (1999) concluíram que o uso de animais da raça Piemontês com dois alelos mutados para MD é problemático em sistemas extensivos de produção (a pasto), devido à necessidade de ter que auxiliar a vaca durante o parto.

Madula *et al.* (2024) concluíram que as variantes Q204X e nt821 do gene da miostatina têm um impacto significativo nas características de crescimento de bovinos Bonsmara. Essas variantes estão associadas a maior musculatura e ganho de peso, o que representa um benefício considerável para a produção de carne. O estudo, que analisou 375 animais utilizando o método de PCR em tempo real (qPCR) para identificar as mutações, avaliou características como peso ao nascimento, na desmama e aos 12 meses, além do ganho de peso diário e atributos morfológicos, como circunferência torácica e índice de musculatura. Diante disso, os autores observaram que os animais heterozigotos para essas variantes apresentaram desempenho superior em crescimento e eficiência. Os autores destacam que os testes de DNA são uma ferramenta valiosa para identificação precoce desses genótipos, tornando-se uma estratégia promissora para otimizar a seleção e o melhoramento genético da raça Bonsmara.

Dessa forma, uma estratégia que pode ser utilizada para evitar a produção de animais com hipertrofia muscular extrema no rebanho é genotipar os reprodutores e selecionar corretamente o rebanho com o intuito de produzir bezerros somente com uma cópia do alelo mutado. Esta seleção propiciará aumento da massa muscular e, conseqüentemente, da produção de carne, sem acarretar problemas no parto. Além disso, a criação de animais heterozigotos pode ser uma opção viável quando o valor obtido com o aumento do rendimento do produto no varejo é maior do que o aumento do custo associado à dificuldade de parto.

Conclusões

A identificação da mutação Q204X no éxon II do gene *MSTN* permite afirmar que essa é uma das mutações responsáveis por hipertrofia muscular em animais da raça Bonsmara. Com base nessas informações, os produtores poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos animais que serão os pais das próximas gerações, pois a identificação precoce dos genótipos dos reprodutores facilita a eliminação de animais que apresentam MD; a manutenção de rebanhos completamente livres desta característica ou a introdução controlada do alelo mutado em determinados rebanhos.

O desenvolvimento do teste de DNA oferece uma ferramenta confiável para detectar a presença da variante associada à síndrome da musculatura dupla, permitindo uma melhor gestão genética e auxiliando no controle dessa condição dentro dos rebanhos. Além disso, a identificação dessa mutação aliada à correta seleção dos reprodutores não só visa melhorar a eficiência da produção de carne, mas também oferecer uma abordagem mais precisa para a seleção de animais com melhores características de crescimento e rendimento, levando a uma produção mais sustentável e rentável no futuro.

Referências

ABCB, *Associação Brasileira dos Criadores de Bonsmara* (2020), disponível em <https://bonsmara.org.br>, acessado em 20 de agosto de 2020.

Allais, S., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C., Journaux, L., Bonnot, A., and Renand, G., *The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds*, J. Anim. Sci. **88**, 446 (2010).

Antoniou, E., and Grosz, M., *PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation*, Anim. Genet. **30**, 231 (1999).

Arthur, P. F., *Double muscling in cattle: A review*, Aust. J. Agric. Res. **46**, 1493 (1995).

Bass, J., Oldham, J., Sharma, M., and Kambadur, R., *Growth factors controlling muscle development*, Domest. Anim. Endocrinol. **17**, 191 (1999).

Cappuccio, L., Marchitelli, C., and Serracchioli, A., *A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects*, Anim. Genet. **29**, 51 (1998).

Casas, E., Keele, J. W., Fahrenkrug, S. C., Smith, T. P., Cundiff, L. V., and Stone, R. T., *Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreeds segregating an inactive myostatin allele*, J. Anim. Sci. **77**, 1686 (1999).

Dunner, S., Miranda, M. E., Amigues, Y., Canon, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J., and Ménissier, F., *Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds*, Genet. Sel. Evol. **35**, 103 (2003).

Fiems, L. O., *Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat*, Animals **2**, 472 (2012).

Gadanhó, A. M. F. M., *Mutações no gene da miostatina na raça bovina Limousin* (M.Sc. Dissertation, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2014).

Goyache, F., Villa, A., Dunner, S., Gutierrez, J. P., Alonso, L., Vallejo, M., and Cañon, J., *Importancia de la hipertrofia muscular hereditaria en la raza asturiana de los valles*, In: El Programa de Mejora Genética de la Raza Asturiana de los Valles, BOVIS **68**, 45 (1996).

Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L. J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménéssier, F., Zanotti, M., Dunner, S., and Georges, M., *Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle*, Mamm. Genome **9**, 210 (1998).

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L., and Bass, J. J., *Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle*, Genome Res. **7**, 910 (1997).

Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Valentini, A., and Georges, M., *Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay*, Anim. Genet. **31**, 396 (2000).

L. Grobet, D. Martin, D. Poncelet, B. Pirottin, J. Brouwers, A. Riquet, S. Schoeberlein, F. Dunner, J. Ménéssier, R. Massabanda, R. Fries, and M. G. Hanset, "A deletion in bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle," Nat. Genet. **17**, 71 (1997).

Madula, R., Visser, C., and van Marle-Köster, E., *The impact of myostatin variants on growth traits in South African Bonsmara beef cattle*, Trop. Anim. Health Prod. **56**, 358 (2024).

Marchitelli, C., Savarese, M. C., Crisa, A., Nardone, A., Marsan, P. A., and Valentini, A., *Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene*, Mamm. Genome **14**, 392 (2003).

McPherron, A. C., and Lee, S., *Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 12457 (1997).

M. E. Miranda, Y. Amigues, M. Y. Boscher, F. Ménéssier, O. Cortés, and S. Dunner, "Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds," J. Anim. Breed. Genet. **119**, 361 (2002).

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., and The UGENE Team, *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit*, Bioinformatics **28**, 1166 (2012).

Regitano, L. C. A., and Coutinho, L. L., *Biologia molecular aplicada à produção animal* (Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2001).

Short, R. E., MacNeil, M. D., Grosz, M. D., Gerrard, D. E., and Grings, E. E., *Pleiotropic effects in Hereford, Limousin and Piedmontese F2 crossbred calves of genes controlling muscularity including the Piedmontese myostatin allele*, J. Anim. Sci. **80**, 1 (2002).

Teixeira, C. S., Oliveira, D. A. A., and Quirino, C. R., *Musculatura dupla. I – Características de desempenho e da carcaça de bovinos*, Arch. Latinoam. Prod. Anim. **14**, 10 (2006).

Xavier, S. R., *Prospecção de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos da raça Senepol* (M.Sc. Dissertation, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014).

Wiener, P., Woolliams, J. A., Frank-Lawale, A., Ryan, M., Richardson, R. I., Nute, G. R., Wood, J. D., Homer, D., and Williams, J. L., *The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality*, Meat Sci. **83**, 127 (2009).

A formatação das citações e referências bibliográficas seguiu as regras de formatação da revista "American Physical Society" (<https://journals.aps.org/revtex>).