

Musculatura dupla: visão geral dos mecanismos de ação do gene *MSTN* e sua relevância para bovinos de corte



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 289

Musculatura dupla: visão geral dos mecanismos de ação do gene *MSTN* e sua relevância para bovinos de corte

*Fabiane Siqueira
Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes
Marlene de Barros Coelho Caviglioni*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
Fax: (67) 3368 2150
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Rodrigo Amorim Barbosa

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto
Romeiro de Oliveira Menezes, Luiz Orcício
Fialho de Oliveira, Marcelo Castro Pereira,
Mariane de Mendonça Vilela, Marta Pereira
da Silva, Mateus Figueiredo Santos, Vanessa
Felipe de Souza

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto
Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa

1ª edição
Publicação digitalizada (2022)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte

Siqueira, Fabiane.

Musculatura dupla : visão geral dos mecanismos de ação do gene MSTN e sua relevância para bovinos de corte / Fabiane Siqueira, Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes, Marlene de Barros Coelho Caviglioni. – Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2022.

PDF (57 p.) : il. color. – (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 289).

1. Biologia molecular. 2. Doença animal. 3. Gado de corte. 3. Hipertrofia muscular.
4. Proteína miostatina. I. Siqueira, Fabiane. II. Menezes, Gilberto Romeiro de Oliveira.
III. Caviglioni, Marlene de Barros Coelho. IV. Título. V. Série.

Autores

Fabiane Siqueira

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Genética), pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes

Zootecnista, doutor em Genética e Melhoramento Animal, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Marlene de Barros Coelho Caviglioni

Engenheira Metalúrgica, doutora em Engenharia Metalúrgica e de Minas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Sumário

Introdução	7
Herança genética e história da musculatura dupla em bovinos	9
Mutações descritas no gene <i>MSTN</i>	14
Miogênese e miostatina	18
Adipogênese e miostatina	26
Características físicas e fisiológicas de bovinos com musculatura dupla	29
Associação de mutações no gene <i>MSTN</i> com fenótipos de interesse	35
Considerações finais	46
Referências bibliográficas	47

Introdução

Musculatura dupla (MD) é o termo usado para designar uma hipertrofia muscular que ocorre em várias espécies de animais, tais como bovinos (Ménissier, 1982; McPherron & Lee, 1997), ovinos (Boman *et al.*, 2009; Miar *et al.*, 2014), suínos (Stinckens *et al.*, 2005, Stinckens *et al.*, 2008), equinos (Dall'Olio *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2010a), peixes (Xu *et al.*, 2003; Ostbye *et al.*, 2007), roedores (McPherron *et al.*, 1997; Szabo *et al.*, 1998), cães (Mosher *et al.*, 2007), aves (Sazanov *et al.*, 1999), e, até mesmo, em humanos (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Schuelke *et al.*, 2004) (Figura 1).

Esta condição é hereditária e surge no período fetal, quando ocorre aumento no número total de fibras musculares (hiperplasia celular), e no período pós-natal, quando ocorre aumento no diâmetro das fibras pré-existentes (hipertrofia celular), sendo o termo musculatura dupla utilizado erroneamente, pois não ocorre duplicação dos músculos (Arthur, 1995).

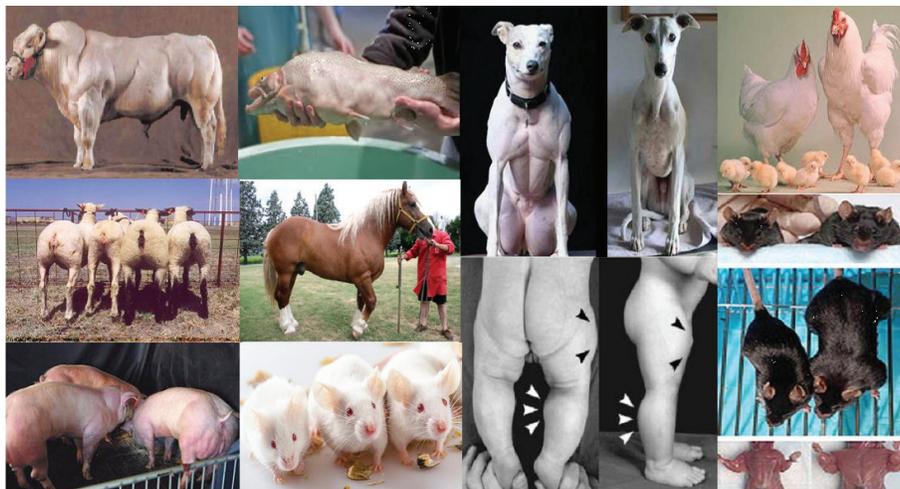


Figura 1. Imagens de indivíduos de diferentes espécies expressando o fenótipo de hipertrofia muscular.

Fontes: bovino: https://www.researchgate.net/figure/Belgian-Blue-bull-exhibiting-double-muscling-photo-from-accessed-16-April-2008_fig1_263273729; peixe: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/100329-six-pack-mutant-trout-genetically-engineered-modified-gm>; cães: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.06.008>; galinhas e roedores: Google Imagens; ovinos: <http://www.portlandprairietexels.com/pdfs/callipyge.pdf>; equino: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20706663/>; suínos: <https://www.scientificamerican.com/article/super-muscular-pigs-created-by-small-genetic-tweak/#>; humano: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa040933>; camundongos: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000789>.

Em bovinos, a síndrome da MD foi descrita pela primeira vez no início do século XIX, sendo, atualmente, relatada em diversas raças, nas quais a hipertrofia muscular é observada especialmente na região do quarto traseiro, onde os músculos são protuberantes com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele. Comparados com animais normais, aqueles com MD possuem melhor conversão alimentar, maior rendimento de carcaça, menos osso, menos gordura, mais músculos e maior proporção de cortes de carne com alto valor de mercado, proporcionando, em média, 20% mais carne. No entanto, apesar do aumento desejado na massa muscular, bovinos hipertróficos apresentam 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.

Esta síndrome é causada por diferentes mutações no gene *MSTN* (*Myostatin*) ou *GDF-8* (*Growth Differentiation Factor - 8*). Esse gene codifica a proteína miostatina (MSTN) e é altamente conservado em mamíferos. A proteína MSTN é, predominantemente, sintetizada e expressa no músculo esquelético e atua em pontos-chave durante a vida pré e pós natal de um animal para determinar a sua massa muscular geral, regulando, assim, a quantidade e o diâmetro das fibras musculares. De acordo com seu papel negativo na miogênese, a expressão da miostatina é rigidamente regulada em vários níveis, incluindo epigenético, transcricional, pós-transcricional e pós-traducional (Sharma *et al.*, 2015).

A identificação de indivíduos portadores de alelos mutados pode ser feita por meio de testes de DNA, tornando, assim, mais eficiente o processo de seleção dos animais que serão os pais da próxima geração. Além disso, a identificação precoce dos genótipos dos reprodutores facilita a eliminação de animais que apresentam hipertrofia muscular; a manutenção de rebanhos completamente livres desta característica, ou ainda, a introdução controlada do(s) alelo(s) mutado(s) em determinados rebanhos.

Diante dos potenciais problemas que essa síndrome causa, principalmente, os relacionados com a redução da aptidão reprodutiva dos animais e com a necessidade de cesariana para contornar a alta incidência de distocia, bem como dos potenciais benefícios do uso de animais com MD para o aumento da produção de carne, é essencial que os criadores adotem uma abordagem

cautelosa para utilizar esses animais em seus rebanhos. Neste contexto, a presente revisão tem como objetivos apresentar a herança genética da síndrome da musculatura dupla em bovinos, as limitações e as vantagens associadas a esta condição bem como ao potencial uso destes animais em sistemas de produção de carne.

Herança genética e história da musculatura dupla em bovinos

Diferentes evidências científicas permitem concluir que a síndrome da MD é uma condição genética parcialmente recessiva, controlada por um único gene e que causa efeitos fisiológicos semelhantes em todas as raças bovinas que expressam esta característica (Arthur, 1995; Charlier *et al.*, 1995; McPherron & Lee, 1997; Bass *et al.*, 1999).

A MD foi documentada na Inglaterra pela primeira vez por Culley em 1807 em bovinos Shorthorn e descrita em detalhes por Kaiser em 1888 (Arthur, 1995). Desde então, outros pesquisadores descreveram o fenótipo de hipertrofia muscular em diferentes raças, sempre ressaltando a maior quantidade de carne, o maior rendimento de carcaça e a menor porcentagem de gordura. Por outro lado, vários autores consideram a carne de animais com hipertrofia muscular de má qualidade, devido à pouca gordura tanto subcutânea quanto intramuscular, e descrevem esses animais como desajeitados, uma vez que eles apresentam a parte posterior do corpo muito grande (Teixeira *et al.*, 2006).

Durante o século XX, no continente europeu, a produção de carne bovina proveniente de raças especializadas foi condicionada pela necessidade dos criadores de aumentar a produtividade e de atender a demanda dos consumidores por carne macia, leve e magra. Assim, animais hipertróficos difundiram-se por vários países europeus, mantendo, até os dias atuais, os alelos responsáveis pela manifestação da MD em diversos rebanhos (Martín, 2003).

Atualmente, este fenótipo é encontrado no mundo todo ocorrendo em inúmeras raças francesas como Charolês, Maine d'Anjou, Blonde d'Aquitaine, Parthenaise, Tarentaise, Bazadaise e Limousin; em raças italianas como Piemontesa e Marchigiana; Belgian Blue na Bélgica; raças britânicas como Hereford, Angus, Galloway e Devon; raças espanholas como Rubia Gallega,

Asturiana de los Valles e Pirenaica; em raças taurinas adaptadas, como a Senepol (Xavier, 2014); na raça composta Santa Gertrudis; entre outras.

Até o final do século XX, a identificação de animais portadores de MD só podia ser feita por meio de avaliações visuais subjetivas, observando o grau de hipertrofia da musculatura do animal; a presença de ranhuras intermusculares; a inclinação pélvica; o maior ponto de ligação da cauda; e, o tamanho aumentado da língua em recém-nascidos. Dessa forma, os métodos de identificação disponíveis eram acurados somente na classificação de animais extremos, ou seja, de animais normais ou com evidente hipertrofia muscular.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e dos projetos de mapeamento genômico, pesquisadores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Liège, na Bélgica, identificaram um gene candidato no cromossomo 2 de bovinos (BTA2) para esta característica (Charlier *et al.*, 1995), confirmando a proposta de Wriedt (1929) de que a determinação genética da síndrome da MD apresenta herança simples e autossômica.

Para isso, Charlier *et al.* (1995) analisaram um painel de 213 marcadores microssatélites em animais obtidos a partir do cruzamento de touro Belgian Blue com MD com vaca Holandesa sem MD e mapearam um loco no BTA2 responsável por toda a variação fenotípica observada na geração de retrocruzamento. Esse loco, cuja existência foi anteriormente postulada por Hanset e Michaux (1985) e referido por eles como *mh* (hipertrofia muscular), foi posicionado em relação a um mapa composto por sete microssatélites específicos de BTA2, a 2 cM do marcador mais próximo. O resultado obtido confirmou a validade na população Belgian Blue do modelo monogênico envolvendo o loco *mh* autossômico, caracterizado por um alelo “+” de tipo selvagem e um alelo “mh” recessivo, causando o fenótipo MD na condição homozigótica.

Em seguida, Charlier *et al.* (1995) confirmaram a relação de ligação entre o loco *mh* e os marcadores do BTA2 em três pedigrees informativos coletados da população geral de Belgian Blue, reforçando a observação da homogeneidade genética do fenótipo MD nesta raça. Com estes resultados, esses autores abriram caminho para a seleção assistida por marcadores a favor ou contra a característica de hipertrofia muscular em bovinos e para a clonagem posicional do gene correspondente.

Dois anos depois, pesquisadores do Centro de Pesquisa em Produção Animal dos Estados Unidos (*US Meat Animal Research Center - USMARC*), em Clay Center, Nebraska, completaram o mapeamento do gene responsável pela MD bovina e relataram que este gene está localizado próximo do centrômero do cromossomo bovino 2 (BTA2) na posição 2q11, sendo esta a mesma localização do loco *mh* (Smith *et al.*, 1997).

Em 1997, McPherron e colaboradores determinaram a causa da hipertrofia muscular, que os criadores já vinham observando desde o início do século XIX. Estes autores identificaram em camundongos um novo membro da superfamília do fator de crescimento transformante beta (*Transforming Growth Factor- β* - TGF- β). Essa superfamília abrange um grande grupo de fatores de crescimento e diferenciação que desempenham papéis importantes na regulação do desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase dos tecidos de animais adultos. Este novo membro da família TGF- β foi denominado pelos referidos autores de fator 8 de crescimento e diferenciação (GDF-8) ou proteína miostatina.

Para determinar a função biológica dessa proteína, estes autores interromperam em camundongos (camundongos knockout – KO ou nulos para miostatina) o gene que a codifica por meio de direcionamento genético (*gene targeting*). Como resultado, os animais nulos para a produção de MSTN foram significativamente maiores do que os animais do tipo selvagem e mostraram um aumento grande e generalizado na massa muscular esquelética, sem um aumento correspondente na quantidade de gordura. Os músculos individuais dos animais mutantes pesaram duas a três vezes mais do que os dos animais selvagens, sendo que este aumento na massa muscular pode ter sido resultante de uma combinação de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares.

Em outro trabalho publicado no mesmo ano, McPherron e Lee (1997) caracterizaram a proteína MSTN em nove espécies de vertebrados, tais como: rato, humano, babuíno, bovino (raça Holandesa), porcino, ovino, frango (White Leghorn), peru e peixe-zebra. Para clonar o gene *GDF-8* destas espécies, bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de RNA isolado de tecidos de músculos esqueléticos e foram rastreadas, por meio de hibridização fluorescente *in situ*, com uma sonda de MSTN proveniente de camundongo, que correspondia à região C-terminal, ou seja, a porção ativa e madura da molécula da proteína. O alinhamento das sequências de aminoácidos pre-

vistas destas espécies mostrou que todas as sequências apresentavam uma sequência sinal putativa para secreção e um sítio putativo de processamento proteolítico RSRR (aminoácidos 263-266), seguido por uma região contendo os resíduos conservados de cisteína C-terminal que são encontrados em todos os membros da superfamília TGF- β .

A partir deste alinhamento, McPherron e Lee (1997) relataram que o gene *GDF-8* é altamente conservado entre as espécies de vertebrados, sendo que as sequências da proteína MSTN em camundongo, rato, humano, suíno, frango e peru são 100% idênticas na região C-terminal; em babuíno, bovino e ovino ocorrem de um a três aminoácidos diferentes na proteína madura; e em peixe-zebra há apenas 88% de similaridade desta região com as outras espécies analisadas. Para determinar se a proteína MSTN também desempenha um papel importante na regulação da massa muscular em outras espécies, além do que foi observado em camundongos por McPherron *et al.* (1997), os autores investigaram a possibilidade de mutações no gene *GDF-8* serem responsáveis pelo aumento da massa muscular observada em raças bovinas que apresentam hipertrofia muscular.

Cabe ressaltar que na época eles sabiam que na raça Belgian Blue, que era até o momento a mais estudada para a característica de MD, este fenótipo segregava como um único loco genético designado de *mh* (Hanset & Michaux, 1985). E que este loco estava intimamente ligado a marcadores moleculares em uma região do BTA2 (Charlier *et al.*, 1995), que é sintênico a região 2q32 do cromossomo humano 2 (Solinas-Toldo *et al.*, 1995), e para a qual eles tinham acabado de mapear o gene que codifica a proteína MSTN humana por hibridização fluorescente *in situ*. Devido a essas posições semelhantes no mapa do gene da MSTN humana com o loco *mh* em Belgian Blue e as semelhanças observadas no fenótipo muscular entre os camundongos nulos de MSTN e bovinos que apresentam hipertrofia muscular, McPherron e Lee (1997) sugeriram o homólogo bovino da miostatina, o gene *GDF-8*, como um gene candidato para o loco *mh*. Atualmente, este gene também é chamado de *MSTN* (*Myostatin*).

Para prospectar mutações no gene *MSTN* em animais das raças Belgian Blue e Piemontês associadas com o fenótipo MD, McPherron e Lee (1997) sequenciaram os três éxons do gene, utilizando como tipo selvagem a raça Holandesa. Como resultado, a sequência de codificação da proteína MSTN do Belgian Blue foi idêntica à sequência analisada na raça Holandesa, exceto

por uma deleção dos nucleotídeos 937-947 no éxon 3. Esta deleção de 11 nucleotídeos causa uma mudança no quadro de leitura da *MSTN*, resultando em uma proteína truncada que termina 14 códons a jusante do local da mutação. Esta é uma mutação nula que ocorre após os sete primeiros aminoácidos da região C-terminal da proteína, resultando em uma perda de 102 aminoácidos (aminoácidos 274-375). Além disso, ela é semelhante à mutação direcionada em camundongos nulos para *MSTN* (McPherron *et al.*, 1997), nos quais toda a região que codifica a proteína madura foi deletada.

Na raça Piemontês, a sequência que codifica a proteína *MSTN* continha duas alterações de nucleotídeos em relação à sequência de Holandês. Uma delas foi uma transversão de citosina (C) para adenina (A) no éxon 1, resultando em uma substituição da leucina por fenilalanina (aminoácido 94). A segunda foi uma transição de guanina (G) para A no éxon 3, resultando em uma substituição de cisteína para tirosina na região madura da proteína (aminoácido 313), sendo que, por análise de *Southern Blot*, esta mutação foi encontrada em ambos os alelos em todos os 10 indivíduos com MD (McPherron & Lee, 1997).

Segundo os autores, é provável que a transição G → A resulte em uma perda completa ou quase completa da função da *MSTN*, uma vez que este resíduo de cisteína é invariante não apenas entre todas as sequências analisadas, mas também entre todos os membros conhecidos da superfamília do TGF-β (McPherron & Lee, 1996). Este resíduo de cisteína é conhecido por ser um dos aminoácidos envolvidos na formação da estrutura do nó de cistina intramolecular em membros desta superfamília para a qual a estrutura tridimensional é conhecida (Daopin *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 1996). Além disso, quando a cisteína correspondente na ativina A (cisteína-44) foi mutada para alanina por mutagenese induzida, a proteína mutante apresentou atividade biológica e de ligação ao receptor de tipo selvagem reduzidas de duas a três vezes (Mason, 1994).

Para McPherron e Lee (1997), as posições semelhantes no mapa do gene da miostatina e do loco *mh* e a identificação de mutações relativamente graves no gene que codifica esta proteína em duas raças de bovinos que apresentam MD sugeriram que estas mutações eram responsáveis por este fenótipo. Para apoiar ainda mais essa hipótese, os autores analisaram o DNA de 120 animais de sangue puro de outras raças que não são classificadas como de músculos duplos (11 Angus, 11 Charolês, 10 Holandês, 10 Brown Swiss, 10 Polled Hereford, 10 Gelbvieh, nove Simental, nove Jersey, nove Guernsey,

nove Ayrshire, sete Limousin, quatro Brahman, quatro Polled Shorthorn, quatro Red Angus, dois Chianina e um Texas Longhorn) para a presença de cada uma destas mutações. Segundo os autores, por meio de análise de *Southern Blot*, a substituição de cisteína por tirosina presente na raça Piemontês não foi detectada em nenhum dos 120 indivíduos das 16 raças analisadas. Enquanto a deleção de 11 nucleotídeos presente na raça Belgian Blue foi detectada em um alelo de um único touro Red Angus que não apresentava hipertrofia muscular.

Finalmente, para descartar a presença de outras mutações em raças sem MD, McPherron e Lee (1997) determinaram a sequência completa da região codificadora da proteína MSTN de 11 dessas raças (Angus, Charolês, Brown Swiss, Polled Hereford, Gelbvieh, Guernsey, Ayrshire, Limousin, Brahman, Polled Shorthorn e Texas Longhorn). Esta análise revelou apenas polimorfismos que eram mudanças silenciosas nas sequências de codificação ou que estavam presentes nos íntrons e regiões não traduzidas. Desta forma, e devido ao alto grau de conservação da sequência da MSTN em diferentes espécies animais, como camundongo, rato, humano, babuíno, bovino, porquinho, ovino, frango, peru e peixe-zebra, esses autores deduziram que a função biológica da miostatina foi amplamente conservada em todo o reino animal.

Mutações descritas no gene *MSTN*

Algumas mutações localizadas no gene *MSTN* podem ocasionar perda da função gênica, causando o fenótipo de hipertrofia muscular em diferentes raças bovinas e em várias outras espécies de animais. Neste sentido, dependendo da região do gene onde as mutações estão localizadas, podem ocorrer alterações no processo normal de leitura, transcrição e tradução da proteína miostatina, ocasionando, assim, distintos efeitos fenotípicos nos indivíduos que as possuem.

À semelhança do que ocorre em outras mutações genéticas em características recessivas, mutações no gene *MSTN* se apresentam em diferentes níveis de intensidade, ou seja, exibem-se de forma mais ou menos exuberante, dependendo do tipo da mutação e se o animal apresenta uma ou duas cópias do alelo mutado para hipertrofia muscular. Como o grau de expressão varia de acordo com a herança genética, alguns fenótipos podem passar despercebidos pelos criadores de bovinos, que, geralmente, reconhecem somente os casos mais pronunciados de músculos hipertrofiados.

Embora o gene *MSTN* esteja localizado no cromossomo 15 em suínos (Sonstegard *et al.*, 1998); 7 em frangos (Sazanov *et al.*, 1999); 1 em camundongos (Szabo *et al.*, 1998); 9 em ratos (Salerno *et al.*, 2004); 37 em cães (Mosher *et al.*, 2007); 18 em equinos (Hill *et al.*, 2010b); e, no cromossomo 2, tanto em bovinos (Grobet *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) quanto em ovinos (Boman *et al.*, 2009; Miar *et al.*, 2014) e humanos (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998), observa-se como característica comum nas várias espécies nas quais ele já foi estudado a presença de três éxons de tamanhos semelhantes separados por dois íntrons (Rodgers & Garikipati, 2008).

Em bovinos, até o momento, foram encontradas e relatadas na literatura 19 mutações diferentes neste gene, sendo 13 delas localizadas nas sequências codificadoras e seis nas sequências intrônicas. A representação esquemática do gene *MSTN* e a localização destas mutações no DNA são apresentadas na Figura 2. Das 13 mutações localizadas nos éxons, seis afetam o código sequencial do gene *MSTN*, inativam a proteína miostatina e são descritas como:

(1) uma mutação de mudança de matriz de leitura ou *frameshift* causada por uma deleção de 11 pares de bases (pb) no éxon 3 do gene, entre os nucleotídeos 821 a 831 (nt821), resultando na inserção de um códon prematuro de parada (*stop codon*) e na formação de uma proteína truncada. É considerada uma mutação nula, pois a deleção ocorre após os primeiros sete aminoácidos do domínio bioativo C-terminal da proteína, levando a uma perda de 102 aminoácidos. Esta deleção foi a primeira mutação descrita neste gene em estudos com a raça Belgian Blue, sendo, em seguida, observada também nas raças Blonde d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturiana de los Valles, Rubia Gallega e Senepol (McPherron & Lee, 1997; Dunner *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003; Martín, 2003; Gadanho, 2014; Xavier, 2014);

(2) uma mutação não-sinônima ou *missense* causada por uma transição de guanina para adenina (G → A) no nucleotídeo 938 do éxon 3, resultando na substituição de um resíduo de cisteína altamente conservado na região madura da proteína por um resíduo de tirosina (C313Y). Foi relatada na literatura nas raças Piemontês e Gasconne (Kambadur *et al.*, 1997; Dunner *et al.*, 2003);

(3) uma mutação de mudança de matriz de leitura causada por uma deleção/inserção na posição 419 do éxon 2, contando a partir do códon de iniciação, que

substitui sete pb por um trecho aparentemente não relacionado de 10 pb (nt419 - del7-ins10), inserindo, assim, um stop códon no peptídeo N-terminal associado à latência (*Latency associated peptide* – LAP) na posição do aminoácido 140. Essa mutação foi relatada na raça Maine-Anjou (Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003);

(4) uma mutação sem sentido, *nonsense* ou disruptiva causada por uma transição de citosina para timina (C → T) no nucleotídeo 610 do éxon 2, produzindo um *stop códon* no peptídeo N-terminal associado à latência na posição do aminoácido 204 (Q204X). Esta mutação foi observada em animais das raças Charolês e Limousin (Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003; Gadanho, 2014);

(5) uma mutação *nonsense* causada por uma transversão de guanina para timina (G → T) no nucleotídeo 676 do éxon 2, também causando um stop códon no peptídeo N-terminal associado à latência na posição do aminoácido 226 (E226X). Esta mutação, juntamente com a nt419, também foi identificada na raça Maine-Anjou (Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003);

(6) uma mutação *nonsense* causada por uma transversão de guanina para timina (G → T) no nucleotídeo 874 no éxon 3, causando um stop códon no domínio bioativo C-terminal (E291X). Foi relatada em animais da raça Marchigiana (Grobet *et al.*, 1998; Cappuccio *et al.*, 1998; Marchitelli *et al.*, 2003).

Em 1998, Grobet e colaboradores identificaram outra mutação *missense* em animais Limousin na qual ocorre uma substituição de fenilalanina por leucina no aminoácido 94 do éxon 1, devido a uma transversão C → A no nucleotídeo 282 do gene *MSTN*, e a denominaram de F94L. Como esta mutação foi observada na condição homozigótica em animais que não apresentavam qualquer sinal de desenvolvimento muscular excepcional, eles concluíram que ela não interfere na função da proteína. Neste mesmo trabalho, os autores descreveram também uma mutação silenciosa encontrada no éxon 2, denominada de nt414 (transição C → T), e quatro mutações neutras localizadas em regiões intrônicas, sendo três delas no íntron 1 e denominadas de nt374-50 (transição G → A); nt374-51 (transição T → C) e nt374-16 (del1); e uma no íntron 2 chamada de nt748-78 (del1).

Em 2003, Dunner e colaboradores identificaram outras sete mutações no gene *MSTN*, sendo cinco delas em regiões codificadoras e duas em região intrônica. Entre as mutações encontradas nos éxons, duas foram caracterizadas como *missense*, mas que não alteram a matriz de leitura, sendo a primei-

ra mutação *missense* denominada de S105C, relatada na raça Parthenaise e originada de uma transversão C → G no nucleotídeo 314 do éxon 1, na qual ocorre a troca de um aminoácido serina por uma cisteína. E a segunda foi denominada de D182N e observada na raça Maine Anjou, como resultado de uma transição G → A no nucleotídeo 544 do éxon 2, na qual ocorre a troca de um aminoácido ácido aspártico por uma asparagina.

As outras três mutações encontradas nas regiões codificadoras são caracterizadas como silenciosas, sendo duas identificadas no éxon 1 e uma no éxon 2. No éxon 1, a mutação nt267 (transição A → G) foi encontrada nas raças Aubrac, Bazadaise e Salers, e a mutação nt324 (transição C → T) foi observada nas raças Salers, Aubrac, Charolês, Maine Anjou e em um touro da linhagem Inra95. Enquanto no éxon 2, a mutação denominada de nt387 (transição G → A) foi identificada nas raças Ayrshire, Maine Anjou, Salers e Galloway. Além dessas, Dunner *et al.* (2003) descreveram no íntron 2 de raças britânicas duas mutações que não afetam a sequência codificante do gene e as denominaram de nt747 + 7 (transição G → A) e nt747 + 11 (transição A → G).

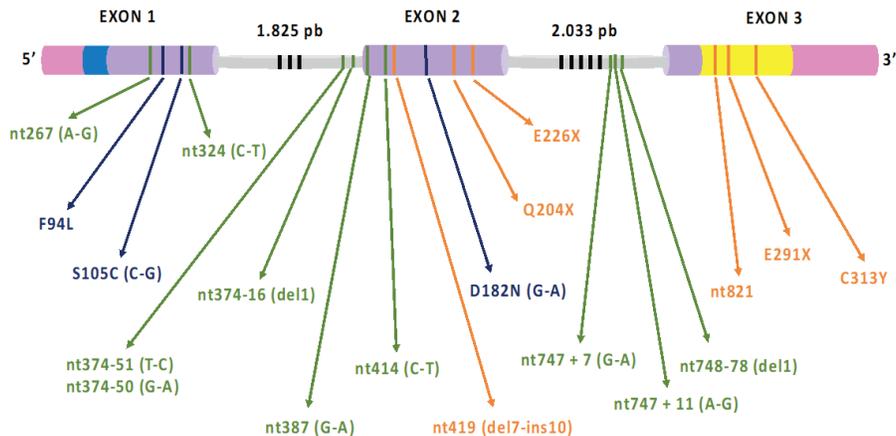


Figura 2. Representação esquemática do gene *MSTN* bovino com a posição das principais mutações identificadas até o momento. As regiões em rosa correspondem às regiões 5' e 3' UTR (*Untranslated Region*), respectivamente. As duas regiões em cinza representam os íntrons. As regiões azul, lilás e amarelo correspondem às sequências do DNA que codificam para o peptídeo líder, o peptídeo N-terminal associado à latência e o domínio carboxi terminal bioativo da proteína, respectivamente. As posições das mutações são mostradas como linhas verdes, azuis e laranjas para mutações silenciosas, não sinônimas e disruptivas, respectivamente. Adaptado de Grobet *et al.* (1998) e Karim *et al.* (2000).

Miogênese e miostatina

O corpo de um animal é, basicamente, formado por três tipos de tecidos musculares, denominados de músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso ou não estriado (Figura 3).

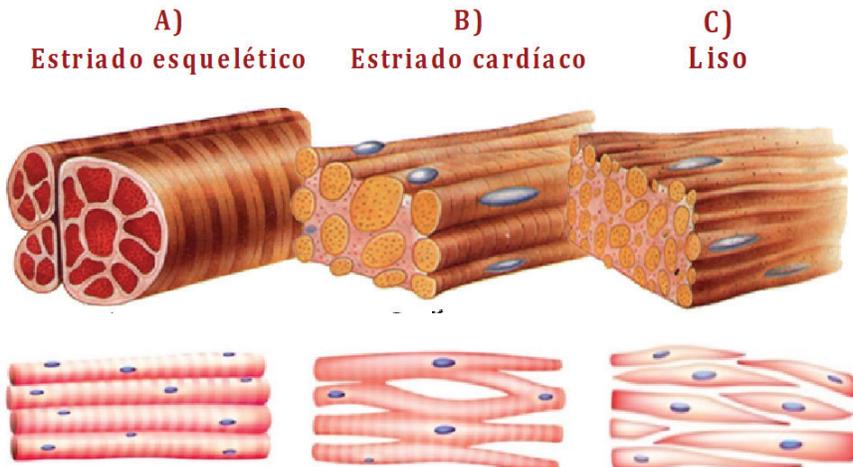


Figura 3. Tipos de tecidos musculares. A) Tecido muscular estriado esquelético: apresenta feixes de células cilíndricas, longas, com vários núcleos periféricos e com estriações transversais no citoplasma; B) Tecido muscular cardíaco: possui estriações, células alongadas, ramificadas, com um ou dois núcleos centrais, que se unem por meio de discos intercalares; C) Tecido muscular liso: não possui estriações e é formado por células fusiformes com um único núcleo central. Adaptado de Junqueira & Carneiro (2017).

Para a bovinocultura de corte, o músculo estriado esquelético é o mais importante dos três em razão de sua quantidade na carcaça e de seu valor econômico (Luchiari Filho, 2000). É o tecido mais abundante do corpo dos mamíferos, constituindo, em média, 40% do peso corporal total e 60% da carcaça dos bovinos, sendo suas principais funções possibilitar a locomoção e os movimentos do corpo, assegurar a atividade postural e servir como principal local de armazenamento de proteínas e glicogênio. Além disso, o tecido muscular esquelético possui uma capacidade única, a plasticidade, que o permite se adaptar a diversas condições, como crescimento e atrofia, mediante condições normais e patológicas (Harridge, 2007).

Nos mamíferos o músculo esquelético é composto por três tipos de fibras musculares, definidas com base nas suas propriedades metabólicas e con-

tráteis em: Tipo I - de contração lenta e oxidativa; Tipo IIA - de contração rápida e intermediária (oxidativa-glicolítica); Tipo IIB de contração rápida e glicolítica. As fibras Tipo I são definidas como fibras vermelhas devido ao grande número de mioglobina e mitocôndrias, pelo sistema de energia utilizado ser aeróbico e por usar oxigênio como principal fonte de energia. Enquanto as Tipo II são definidas como fibras brancas, pelo sistema de energia utilizado ser anaeróbico e usarem fosfocreatina e glicose como fontes de energia. Uma vez cessado o crescimento muscular, as características fisiológicas e metabólicas e o tamanho final deste tecido dependem grandemente da proporção dos tipos de fibras. Adicionalmente, a qualidade da carne bovina produzida também está diretamente relacionada com a composição das fibras musculares que formam o músculo, pois a proporção existente entre os tipos de fibras será determinante no metabolismo post-mortem de transformação do músculo em carne (Smith & Muscat, 2005; Tajbakhsh, 2009; Lopes, 2010).

Visto que a frequência de cada tipo de fibra muscular no músculo esquelético é influenciada pela genética, gênero, nutrição e manejo dos animais, o entendimento de como ocorrem e como podem ser manipulados os fatores que determinam o desenvolvimento, o crescimento e a regeneração deste tecido é de extrema importância em pesquisas que envolvem a produção sustentável de carne bovina de qualidade. Neste sentido, a Figura 4 descreve as principais etapas que ocorrem na formação do tecido muscular esquelético.

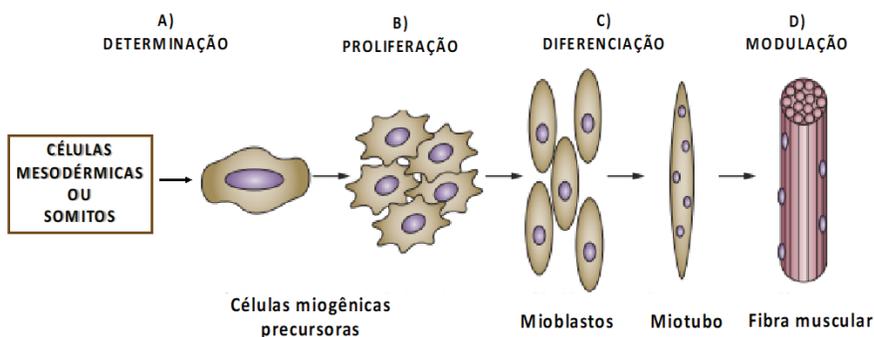


Figura 4. Principais etapas do desenvolvimento do tecido muscular estriado esquelético. A) Determinação: ocorre a mobilização inicial dos somitos para o processo de formação do tecido muscular; B) Proliferação: células musculares precursoras mononucleadas proliferam e diferenciam-se em mioblastos; C) Diferenciação: os mioblastos alinham-se uns com os outros, fundem-se para formarem miotubos multinucleados e os núcleos perdem a capacidade de divisão; D) Modulação: a síntese de proteína miofibrilar é acelerada, dando origem as fibras musculares. Adaptado de Salvatore et al. (2014).

Durante o desenvolvimento embrionário, células primordiais da mesoderme participam da formação da maior parte do tecido muscular, iniciando este processo a partir de um bloco de células mesodérmicas denominadas de somitos. Assim, no primeiro estágio da formação das fibras musculares, chamado de determinação, os somitos, sob a ação de glicoproteínas secretadas pela notocorda e tubo neural, diferenciam-se em células miogênicas precursoras. Posteriormente, estas células unicelulares proliferam e iniciam a fase de diferenciação, onde os mioblastos unem-se entre si formando miotubos multinucleados, localizados no centro de cada célula. Os núcleos, por sua vez, perdem a capacidade de divisão e os miotubos passam por um processo chamado de modulação, no qual a síntese de proteína miofibrilar é acelerada, originando, assim, as fibras musculares primárias (Schultz & McCormick, 1994; Dias Correia & Dias Correia, 2006; Lopes, 2010).

No segundo terço de gestação, as fibras musculares primárias servem de suporte para o alinhamento e fusão de uma segunda população de mioblastos, denominados fetais, que se fundem formando os miotubos secundários, os quais se diferenciam nas fibras secundárias. Em seguida, as fibras secundárias passam por hipertrofia e ligam-se a outros miotubos por meio de uma forte ligação, permitindo uma comunicação célula a célula. A este processo de desenvolvimento e formação dos tecidos musculares é dado o nome de miogênese (Schultz & McCormick, 1994; Dias Correia & Dias Correia, 2006; Lopes, 2010).

Alguns autores subdividem a miogênese em quatro estágios: (a) embrionário ou primário, (b) fetal ou secundário, (c) neonatal e (d) adulto. As miogêneses embrionária e fetal ocorrem na vida pré-natal e são caracterizadas pela multiplicação do número de fibras musculares primárias e secundárias (hiperplasia celular), determinando, assim, a quantidade de fibras que estarão formadas ao nascimento do animal. Portanto, o estágio fetal é crucial para o desenvolvimento do músculo esquelético. Na miogênese neonatal ocorre a especificação dos tipos de fibras musculares. Enquanto a miogênese adulta (pós-natal) é responsável pela homeostase da musculatura esquelética, contribuindo, assim, para o crescimento hipertrófico e para regeneração muscular (Chal & Pourquié, 2017).

Desta forma, o número de fibras musculares que um indivíduo possui é determinado, principalmente, por fatores genéticos, bem como por fatores ambientais que sejam capazes de interferir na miogênese. Assim, os fatores que

mais afetam o número e o tamanho das fibras musculares de uma espécie de produção é a sua raça e os processos de seleção e cruzamentos que objetivam aumentar o desempenho e a produtividade animal (Lopes, 2010).

Durante o processo da miogênese alguns mioblastos não se fundem e permanecem em um estado quiescente (fase G0 do ciclo celular) entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo denominados de células satélites, mioblastos adultos ou de mioblastos indiferenciados. Estas células permanecem quiescentes e são ativadas durante o crescimento muscular e em casos de lesão. Logo, são estas células as responsáveis por conferir a característica de plasticidade ao músculo esquelético (Schultz & McCormick, 1994; Hawke & Garry, 2001).

Cabe ressaltar que o processo de crescimento muscular pós-natal ocorre exclusivamente por hipertrofia, ou seja, somente pelo aumento do número de núcleos e de miofibrilas nas fibras musculares pré-existentes, a partir da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites. Os núcleos derivados das células satélites sintetizam proteínas musculares específicas que aumentam o volume das fibras musculares por meio da formação de novos sarcômeros, em posição externa às miofibrilas pré-existentes (Schultz & McCormick, 1994; Hawke & Garry, 2001).

Além disso, as células satélites também apresentam a capacidade de migração, sendo esta característica dependente da integridade da lâmina basal, que pode se romper em decorrência de um trauma muscular. Caso o rompimento da lâmina basal aconteça, as células satélites migram para a região da lesão para participar do processo de regeneração muscular, sendo este um evento mediado por citocinas liberadas pelas células inflamatórias no local da lesão. Consequentemente, estas células contribuem para o crescimento muscular pós-natal, reparo de fibras musculares danificadas e para manutenção do músculo esquelético adulto (Schultz & McCormick, 1994; Hawke & Garry, 2001).

Os processos de miogênese, crescimento muscular pós-natal e regeneração são controlados pela ação coordenada de diferentes moléculas, como fatores de crescimento e de transcrição, hormônios e citocinas. Dentre os fatores de crescimento reguladores, estão o fator de crescimento de hepatócitos (*Hepatocyte growth factor* - HGF), fatores de crescimento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor* - FGF), fatores de crescimento transformadores- β

(TGF- β), fatores de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor* - IGF) e fator de necrose tumoral α (*Tumor necrosis factor- α* - TNF α) (Karalaki *et al.*, 2009). Portanto, para que ocorra o desenvolvimento do músculo esquelético, conforme as etapas descritas na Figura 4, é necessário a expressão de genes músculo-específicos e a atividade de algumas proteínas que regulam a miogênese positiva e negativamente.

A regulação positiva é realizada, principalmente, por genes regulatórios miogênicos que codificam um conjunto de fatores de transcrição (*Myogenic Regulator Factor* - MRF) que são essenciais para o desenvolvimento muscular, como Myf-5 (*Myogenic factor 5*), MyoD (*Myogenic determination factor D*), MRF4 (*Myogenic Regulator Factors 4*) e miogenina (Myog). Estes fatores controlam as etapas da formação muscular, atuando como ativadores de transcrição, ligando-se a sítios específicos de DNA, conhecidos como E-box (5'- CANNTG - 3'), presentes na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Silva & Carvalho, 2007; Lopes, 2010).

Cada MRF apresenta a capacidade de induzir o processo de miogênese em células não musculares, tais como os fibroblastos, resultando na formação de células miogênicas. Estudos sobre a função dos MRFs revelaram uma hierarquia genética em que MyoD e Myf5 são mais homólogos entre si, são expressos em mioblastos antes da diferenciação e são necessários para a determinação ou sobrevivência das células progenitoras musculares. Enquanto a miogenina e o MRF4 são mais homólogos entre si do que os outros e são expressos no processo de diferenciação (Megeney & Rudnicki, 1995). Esta hierarquia é demonstrada pela total ausência de tecido muscular em camundongos duplo *Knockout MyoD:Myf5* e pela observação de que, nestes animais, as células progenitoras musculares permanecem multipotentes e contribuem para o desenvolvimento de tecidos não musculares do tronco e dos membros (Rudnicki *et al.*, 1993; Kablar *et al.*, 1998).

Os mioblastos que saem do ciclo celular, que expressam Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão de miogenina e MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares, quando os mioblastos se proliferam e se fundem para dar origem aos miotubos (Megeney & Rudnicki, 1995). Embriões deficientes em miogenina morrem no período perinatal devido à deficiência na diferenciação dos miócitos, evidenciada pela quase total ausência de fibras musculares nesses mutantes (Hasty

et al., 1993; Nabeshima *et al.*, 1993). Similarmente, camundongos deficientes em MRF4 demonstram uma série de fenótipos consistentes com seu papel na diferenciação dos miócitos durante a miogênese (Patapoutian *et al.*, 1995; Rawls *et al.*, 1995; Yoon *et al.*, 1997).

A regulação negativa da miogênese é feita por fatores de crescimento séricos e peptídicos, como TGF- β e FGF, sendo que a miostatina (MSTN), que é um membro da superfamília TGF- β , regula negativamente a miogênese por meio da inibição da proliferação (Thomas *et al.*, 2000) e da diferenciação de mioblastos (Langley *et al.*, 2002). A regulação negativa destes processos miogênicos leva à hiperplasia e hipertrofia muscular, fazendo com que um animal possua ao nascimento o dobro de fibras musculares de um animal normal (Lopes, 2010).

A proteína MSTN madura inibe a proliferação dos mioblastos, mantendo-os nas fases G0/G1 e G2 do ciclo celular, diminuindo, assim, a progressão dos mioblastos para a fase S, na qual ocorre a síntese de DNA (Dias Correia & Dias Correia, 2006). Este efeito está associado ao aumento da expressão do inibidor da quinase dependente da ciclina p21 (regulação positiva), à diminuição dos níveis e da atividade da quinase-2 dependente da ciclina (Cdk2) (regulação negativa) e à hipofosforilação da proteína Rb (pRb) (Thomas *et al.*, 2000). Enquanto a inibição do processo de diferenciação de mioblastos é dependente da concentração de MSTN no meio e está associada à diminuição da expressão dos genes regulatórios miogênicos que codificam os fatores de transcrição MyoD, Myf5, miogenina e p21 (Langley *et al.*, 2002).

Um modelo para a ação da MSTN em mamíferos sugere que, na ausência de outros reguladores miogênicos, esta proteína inibe a hiperplasia do mioblasto ao estimular a sua retirada do ciclo celular e atrasa a etapa de diferenciação induzindo a quiescência celular. Estudos recentes sugerem ainda que a quiescência celular induzida por MSTN é reversível e está associada à expressão reduzida dos fatores reguladores miogênicos Pax-3, Myf-5 e MyoD (Amthor *et al.*, 2006). Portanto, é impreciso descrever as ações da MSTN como apenas inibitórias. Na verdade, esta proteína inicia a primeira etapa no processo de diferenciação, a retirada do ciclo celular e evita a apoptose das células quiescentes. Seus efeitos negativos na hipertrofia das miofibras são devidos em parte à inibição da ativação, proliferação e/ou renovação das células satélites, porque a fusão destas células com as miofibras existentes é amplamente responsável pelo crescimento muscular pós-natal (Figeac *et al.*, 2007).

Como outros membros da superfamília TGF- β , a MSTN é sintetizada como uma proteína precursora de 375 aminoácidos (Figura 5). Esta proteína inativa contém um núcleo N-terminal (NH₂) de aminoácidos hidrofóbicos, que atua como uma sequência sinal, de 24 aminoácidos (peptídeo sinal - PS), um domínio pró-peptídeo e um domínio carboxi-terminal (C-terminal - COOH) com nove aminoácidos de cisteína conservados que são usados para homodimerização e formação da estrutura de “nó de cisteína”, sendo esta uma característica marcante dos membros da superfamília TGF- β (McPherron *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 2015).

Para a produção da forma ativa da miostatina são realizadas duas clivagens enzimáticas separadas, a primeira para remover o PS N-terminal e a segunda para clivar o domínio do pró-peptídeo no sítio conservado RSRR (R, arginina; S, serina - aminoácidos de 264 a 267), resultando, assim, em um peptídeo N-terminal associado à latência (LAP) de 36/40 kDa e um peptídeo C-terminal de 12,5/26 kDa, que é a forma madura e biologicamente ativa da proteína. Uma vez ativado, o domínio C-terminal da MSTN é capaz de se ligar a receptores e ativar o sinal de transdução em cascata na célula alvo, induzindo sua função biológica (McPherron *et al.*, 1997; Lee & McPherron, 2001; Joulia-Ekasa & Cabello, 2006; Sharma *et al.*, 2015).

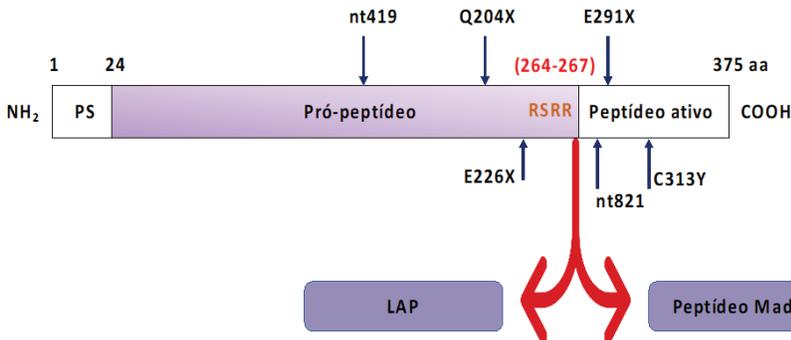


Figura 5. Estrutura da proteína precursora da miostatina. Os três domínios representados neste esquema são: peptídeo sinal (PS), pró-peptídeo e peptídeo ativo. RSRR é o sítio de processamento proteolítico. A seta vermelha representa a clivagem enzimática que ocorre no sítio RSRR, dando origem ao peptídeo N-terminal associado à latência (LAP) e ao peptídeo C-terminal maduro. As setas pretas indicam as posições relativas das seis mutações disruptivas que ocorrem naturalmente no gene *MSTN*, que inativam a proteína e são responsáveis pelo aumento do crescimento muscular observado em algumas raças bovinas. Adaptado de Joulia-Ekaza & Cabello (2006) e Sharma *et al.* (2015).

A importância do processamento proteolítico da proteína *MSTN* é bastante clara, pois uma mutação no sítio de processamento RSRR, que altera este sítio para os aminoácidos GLDG (G, glicina; L, leucina; D, aspartato) leva à hipertrofia proeminente do músculo esquelético em camundongos transgênicos que expressam *MSTN* sem seu local de clivagem normal (dnMS). De acordo com Zhu *et al.* (2000), camundongos transgênicos exibiram um aumento na massa muscular esquelética como resultado de hipertrofia muscular generalizada, sendo que não foi observado aumento na hiperplasia, sugerindo, nesse caso, que o efeito hipertrófico da miostatina foi independente de seu efeito hiperplásico. A massa muscular média de camundongos dnMS machos aumentou 17%, 35% e 23% para gastrocnêmio, tríceps braquial e quadríceps, respectivamente, em relação aos indivíduos controles da mesma ninhada. A massa muscular individual das fêmeas dnMS também foi maior, apresentando 16% para gastrocnêmio, 21% para tríceps e 28% para quadríceps.

Em comparação com camundongos dnMS, camundongos totalmente nulos para miostatina mostraram massas musculares que eram quase o dobro do músculo normal (McPherron *et al.*, 1997). Além disso, esse aumento acentuado da massa muscular foi associado tanto à hipertrofia quanto à hiperplasia (McPherron *et al.*, 1997). A diferença na massa muscular observada em camundongos dnMS e miostatina nula provavelmente resulta da dominância incompleta de dnMS, de modo que a dimerização e a clivagem da miostatina normal não é totalmente bloqueada em camundongos dnMS. A expressão do transgene dnMS produziu uma diminuição de 23% a 40% na miostatina processada, e esse grau de redução foi paralelo ao aumento da massa muscular. Assim, níveis mais baixos de inibição da miostatina podem afetar a hipertrofia, enquanto níveis mais altos de inibição da miostatina podem ser necessários para alterar a hiperplasia (Zhu *et al.*, 2000).

Um dos modos de regulação pós-transcricional de genes é por meio da ação de microRNAs (miRNAs), que são pequenas moléculas de RNA não codificantes (20-25 nucleotídeos), altamente conservadas, que regulam a expressão gênica através da ligação com sequências de complementaridades imperfeitas de RNA mensageiro (mRNA) (He & Hannon, 2004). Está se tornando cada vez mais evidente que a regulação de miRNAs de mRNAs representa uma maneira eficaz de interferir na função gênica agindo no nível de tradução de proteínas. Isso ocorre quando o miRNA tem como alvo a região

3' UTR de transcritos por pareamento imperfeito de bases e funções para inibir a tradução. Em alguns casos, a degradação de mRNA alvo também é um mecanismo ou uma consequência da supressão mediada por miRNA (Stefani & Slack, 2008). Os miRNAs demonstraram desempenhar papéis críticos no desenvolvimento do músculo esquelético, bem como na regulação da proliferação e diferenciação das células musculares (Sayed & Abdellatif, 2011). Ao regular a expressão gênica, os miRNAs podem desempenhar um papel na modulação da hipertrofia do músculo esquelético.

Clop *et al.* (2006) relataram pela primeira vez o envolvimento de miRNAs na regulação da miostatina em ovelhas Texel, que expressavam baixos níveis de *MSTN* concomitante com um fenótipo de hipertrofia muscular. Os autores relataram um polimorfismo de nucleotídeo único (transição G para A) na região 3' UTR do gene *MSTN*, que cria um sítio alvo para os miRNAs músculo-específico miR1 e miR206, resultando na inibição da miostatina e no aumento da musculatura dos animais Texel. Após esta descoberta inicial, surgiram relatos adicionais na literatura destacando a regulação da *MSTN* por miRNAs, incluindo miR-27a, miR-27b, miR-208a, miR-208b e miR-499 (Allen & Loh, 2011; Chen *et al.*, 2013; Miretti *et al.*, 2013; McFarlane *et al.*, 2014).

Adipogênese e miostatina

Sabe-se que a proteína *MSTN* é expressa, predominantemente, durante a embriogênese no tecido muscular esquelético; em níveis variados nos músculos de indivíduos adultos e, no tecido adiposo em níveis significativamente mais baixos (McPherron & Lee, 2002). Além disso, alguns trabalhos mostram que a *MSTN* também pode ser detectada nas glândulas mamárias (Ji *et al.*, 1998), no tecido cardíaco (Sharma *et al.*, 1999), baço, linfócitos (Lyons *et al.*, 2010), placenta (Mitchell *et al.*, 2006) e no tecido muscular da glândula uterina (Kim *et al.*, 2001).

Enquanto a influência da *MSTN* no músculo está razoavelmente bem estabelecida, seus efeitos no tecido adiposo e em outros tecidos permanecem ainda obscuros. Cabe ressaltar que o músculo esquelético e o tecido adiposo se desenvolvem a partir das mesmas células-tronco mesenquimais e que evidências já foram obtidas demonstrando que o gene *MSTN* pode regular a adipogênese nas fases de determinação e diferenciação, nas quais células-tronco multipotentes se tornam adipoblastos e pré-adipócitos se convertem

em adipócitos maduros, respectivamente (Algire *et al.*, 2013). Entretanto, a função do gene *MSTN* na adipogênese é controversa, pois em pré-adipócitos ele pode inibir a adipogênese, enquanto em células-tronco pluripotentes pode promovê-la (Deng *et al.*, 2017).

Em seu estudo inicial, McPherron *et al.* (1997) não observaram qualquer influência da proteína *MSTN* no tecido adiposo de camundongos portadores de uma mutação direcionada no gene *MSTN* (*knockout* – KO ou nulos para miostatina = *MSTN*^{-/-}) de 16 semanas. Os camundongos KO apresentaram um aumento generalizado na massa muscular esquelética, levando a um aumento de 25% a 30% no peso corporal total dos três aos seis meses de idade e com os músculos individuais pesando quase o dobro dos músculos dos camundongos do tipo selvagem. Em concordância com estes resultados, nenhuma alteração foi observada por Whittemore *et al.* (2003) na massa adiposa de camundongos adultos quando a *MSTN* foi inibida por meio de um anticorpo bloqueador.

No entanto, McPherron e Lee (2002) quando compararam camundongos tipo selvagem (*MSTN*^{+/+}) com camundongos *MSTN*^{-/-} de dois a 10 meses de idade verificaram que, ao contrário dos camundongos *MSTN*^{+/+}, os *MSTN*^{-/-} não continuaram a ganhar peso além dos seis meses de idade, de modo que por volta dos nove aos 10 meses de idade, os pesos corporais totais de camundongos *MSTN*^{+/+} foram comparáveis aos dos camundongos *MSTN*^{-/-}. A fim de determinar se a normalização dos pesos corporais entre estes dois genótipos foi resultado de uma normalização dos pesos musculares individuais, os autores compararam os pesos dos músculos tríceps, peitoral, quadríceps, gastrocnêmio, plantar e tibial anterior dos dois grupos experimentais. Para todos os músculos avaliados, as diferenças em pesos foram evidentes mesmo na idade mais jovem (dois meses) e foram mantidas em animais mais velhos. Além disso, em todas as idades examinadas, os camundongos heterozigotos *MSTN*^{+/-} apresentaram pesos musculares intermediários entre os camundongos homozigotos *MSTN*^{+/+} e os *MSTN*^{-/-}, sugerindo que o efeito da miostatina na massa muscular é dependente da dose (McPherron & Lee, 2002).

Diante destes resultados, McPherron e Lee (2002) investigaram a possibilidade de que o aumento no peso corporal em camundongos homozigotos *MSTN*^{+/+} mais velhos foi devido a uma maior taxa de acúmulo de gordura. Embora as análises dos pesos das camadas de gordura individuais não tenham re-

velado diferenças entre os camundongos do tipo selvagem e os nulos para miostatina aos dois meses de idade, por volta dos nove aos 10 meses a massa de gordura corporal em alguns animais aumentou até nove vezes em comparação com os camundongos de dois meses de idade. Em contraste, todos os camundongos *MSTN*^{-/-} examinados entre nove a 10 meses permaneceram magros com relativamente pouco ganho de peso na gordura durante o intervalo de sete a oito meses. A massa de gordura corporal total média foi reduzida em 70% em camundongos *MSTN*^{-/-} com oito meses de idade. Os níveis de leptina sérica foram positivamente correlacionados às quantidades de gordura corporal total em animais individuais e, portanto, também foram significativamente reduzidos em camundongos sem miostatina. Desta forma, as diferenças no ganho de peso corporal total ao longo do tempo parecem resultar de diferenças no acúmulo de gordura (McPherron & Lee, 2002).

Corroborando estes resultados, Lin *et al.* (2002) relataram que, em 12 semanas, o peso da massa de gordura, o conteúdo de lipídios totais e a secreção de leptina de camundongos KO foram significativamente reduzidos, enquanto o conteúdo de *MSTN* total foi significativamente aumentado em relação aos valores obtidos para camundongos do tipo selvagem, embora os pesos corporais tenham sido semelhantes nos dois grupos experimentais. Como consequência, os autores concluíram que deleções no gene *MSTN* também afetam a massa do tecido adiposo, reduzindo o acúmulo de gordura de camundongos com deficiência de proteína *MSTN* à medida que sua idade aumenta.

Guo *et al.* (2009) também demonstraram que camundongos KO exibiram drástico aumento na massa muscular, redução significativa da massa gorda e aumentos na utilização da glicose e da sensibilidade à insulina, contudo, nenhuma mudança na taxa de oxidação de lipídios totais foi observada por estes autores. De acordo com Morissette *et al.* (2009), camundongos idosos nulos para *MSTN* também apresentaram o percentual de gordura corporal menor quando comparados com camundongos selvagens. Diminuição do acúmulo de gordura e aumento da massa muscular também foram observados em ratos KO (Gu *et al.*, 2016) e em suínos KO em comparação com animais do tipo selvagem (Qian *et al.*, 2015).

No entanto, níveis elevados de miostatina foram relatados em camundongos e humanos que sofriam de obesidade (Allen *et al.*, 2008; Hittel *et al.*, 2009). Hittel *et al.* (2009) demonstraram um aumento de 2,9 vezes na expressão da

proteína MSTN no músculo esquelético de mulheres extremamente obesas e com resistência a insulina, quando comparadas com mulheres não obesas e saudáveis, resultando em elevada quantidade de miostatina circulante. Além de regular o crescimento muscular, afetar o metabolismo da glicose e da gordura, estar associada ao desenvolvimento de obesidade, de resistência à insulina e de diabetes tipo 2, altos níveis de miostatina também estão relacionados à perda de massa muscular observada durante o câncer (Aversa *et al.*, 2012), em infecção pelo HIV (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998), doença hepática (Garcia *et al.*, 2010), doença pulmonar obstrutiva crônica (Ju & Chen, 2012) e durante o envelhecimento (McKay *et al.*, 2012).

Estes relatos mostram que progressos consideráveis na compreensão das funções da miostatina foram feitos desde a sua descoberta em 1997 e, conforme aumenta o desenvolvimento das pesquisas, fica cada vez mais claro que, além de seu papel convencional no músculo, esta proteína também desempenha um papel crítico no metabolismo animal como um todo.

Características físicas e fisiológicas de bovinos com musculatura dupla

Uma característica importante na identificação de um animal com MD pode ser observada logo após o seu nascimento, pois bezerros recém-nascidos com este fenótipo apresentam a língua bastante aumentada. Em alguns casos, a língua ocupa completamente a boca, fazendo com que haja dificuldade ou até mesmo impossibilidade do bezerro se alimentar. Esta condição é chamada de macroglossia e, geralmente, desaparece após algumas semanas de vida (Goyache *et al.*, 1996).

Bovinos que exibem MD em grau extremo apresentam todos os músculos do corpo aumentados, embora a parte traseira seja a região mais evidente observada na sua aparência, especialmente na região do quarto traseiro, onde os músculos são protuberantes com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele. Segundo Oliver e Cartwright (1968), citado por Teixeira *et al.* (2006), o contorno geral da anca ou garupa bovina foi descrito pela primeira vez por Dechambre em 1910, que evidenciou nos animais MD uma garupa com aparência inclinada em relação a garupa considerada normal. O au-

mento dos músculos da garupa resulta em sulcos subcutâneos, que podem ser observados em cada lado das vértebras sacrais, sendo que os músculos desta região também se mostram bem definidos. A cauda destes animais é mais ligada ao corpo e seu início é mais proeminente e bem definido (Arthur, 1995; Goyache *et al.*, 1996).

Quando observada lateralmente, a região mediana do corpo é, notadamente, diferente da mesma região dos indivíduos normais. Animais com a síndrome MD são mais longos da escápula à garupa e apresentam o abdômen menor e retraído. A região da escápula também é aumentada, embora não tão expressivamente como a região posterior. O pescoço parece ser menor e mais grosso, arqueado acima da clavícula, devido ao aumento dos músculos desta região (Oliver & Cartwright, 1968; Teixeira *et al.*, 2006). Devido a estas características, apresentam alto rendimento de carcaça, que está intimamente relacionado à redução no tamanho da maioria dos órgãos vitais, como coração, pulmões e rins. Como consequência, esses animais podem ser mais susceptíveis a claudicação (doença vascular que causa manqueira nos animais), doenças respiratórias, urolitíase (cálculo renal) e estresse nutricional, resultando em menor robustez. Dessa forma, sua capacidade de ingestão de ração é reduzida, necessitando de uma dieta com maior densidade de nutrientes, de proteínas e rica em energia (Fiems, 2012).

Animais hipertróficos apresentam também reduzida quantidade de gordura, tanto subcutânea quanto intramuscular; menor proporção de ácidos graxos saturados (*Saturated Fatty Acids* - SFA) e de monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids* - MUFA); maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFA); elevada porcentagem de fibras brancas (Tipo II); menor teor de hemoglobina e mioglobina; menor quantidade de mitocôndrias; menor densidade capilar; diminuição da capacidade de retenção de água; bem como uma reduzida quantidade de colágeno e de tecido conjuntivo, fazendo com que produzam uma carne mais tenra e mais pálida do que bovinos considerados normais (Oliván *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Chelh *et al.*, 2009; Sevane *et al.*, 2014; Fiems, 2012).

Ademais, bovinos MD possuem baixa capacidade de dissipação do calor, sendo que durante estresse calórico a temperatura retal aumenta mais rapidamente e há produção anormal ou maior de calor. Por apresentarem capacidade respiratória reduzida, são mais susceptíveis a hipóxia alveolar (troca

gasosa inadequada na membrana capilar-alveolar), hipoxemia (baixa concentração de oxigênio no sangue) e broncopneumonia grave (Gustin *et al.*, 1987; Cambier *et al.*, 2000), fazendo com que necessitem de cuidados extras em relação às práticas de bem estar animal (Fiems, 2012). Além destes problemas, animais hipertróficos mostram sinais de fadiga mais rápido do que os normais após exercícios severos, podendo provocar morte súbita. Esta exaustão pode ser decorrente de acidose metabólica responsável pela redução da circulação do sangue, devido ao volume de sangue e a contagem de hematócritos serem menores, levando à deficiência no transporte de oxigênio, por um lado, e redução da atividade metabólica aeróbica do músculo do animal MD, por outro (Teixeira *et al.*, 2006). Como a densidade capilar é menor nos animais com hipertrofia muscular, o suporte de nutrientes em ossos e cascos também pode ser prejudicado (Fiems, 2012).

Com exceção de evidências sobre susceptibilidade a claudicação e a distúrbios respiratórios, não há indicação clara de que os animais MD tenham a função imunológica reduzida. Entretanto, sabe-se que reduções na gordura corporal total estão correlacionadas com imunidade prejudicada. Além disso, a expressão de *MSTN* foi detectada no baço de camundongos, sugerindo que esta proteína pode influenciar o desenvolvimento de células imunes em mamíferos e desempenhar um papel importante na modulação da função do sistema imunológico durante condições de estresse (Fiems, 2012).

Comparados a bovinos normais, animais com MD também apresentam os ossos mais finos, podendo causar uma alta frequência de fraturas; redução no desenvolvimento do osso do quadril; aumento do peso do bezerro; dificuldade de parto aumentada (distocia); aumento de mortalidade perinatal em vacas; aumento do intervalo entre partos; redução da fertilidade; diminuição do fluxo sanguíneo uterino e umbilical; aumento de abortos e de natimortos; redução da viabilidade do bezerro; diminuição na quantidade de folículos em desenvolvimento nos ovários; e, diminuição da qualidade do sêmen (Oliver & Cartwright, 1968; Oliván *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006; Fiems, 2012). Em ambos os sexos, a genitália externa apresenta características infantilizadas. Nos machos, os testículos, além de menores, possuem menor volume de sêmen e ficam mais próximos da parede abdominal (Kieffer & Cartwright, 1980; Michaux & Hanset, 1981). Em fêmeas, outra desvantagem que surge é a redução da produção leiteira (Hanset, 1991).

A síndrome MD também pode ser um fator predisponente para doenças congênitas como artrogripose (malformação das articulações), distonia muscular congênita I e II (movimentos involuntários que provocam contrações musculares alteradas, modificando a postura, causando dor e dificultando a mobilidade do animal), síndrome da cauda torta, nanismo, hamartoma (tumor benigno) e gestação prolongada. Frequentemente, são realizados testes genéticos para avaliar a presença das mutações que são responsáveis por estes distúrbios em touros da raça Belgian Blue, visando a redução de perdas econômicas (Fiems, 2012).

Apesar de muitas limitações, características como: maior rendimento de carcaça; produção, em média, de 20% mais carne por animal; menor peso ósseo; melhor conversão alimentar, apesar da ingestão voluntária de ração ser reduzida; carne mais clara, mais magra e mais macia, com teor de colágeno reduzido, elevado grau de umidade e de proteína; teor reduzido de gordura total; maior relação de PUFA:SFA; maior conversão de ácidos graxos ômega-3; e, alta proporção de cortes de carne com melhor valor de mercado, são muito positivas no aspecto econômico, desde que sejam levadas em consideração, principalmente, alimentação, manejo e condições de abate adequadas. Do ponto de vista dos cortes da carcaça, muitos produtores consideram estes animais ideais, uma vez que a forma do corpo corresponde a conformação que os caracterizam como animal tipo “corte” (Oliván *et al.*, 2004; Sañudo *et al.*, 2004; Biagini & Lazzaroni, 2005; Teixeira *et al.*, 2006; Sevane *et al.*, 2014).

Diante deste cenário, alguns produtores têm relevado os custos com tais problemas, levando à seleção sistemática de animais hipertróficos ou o seu uso em programas de cruzamentos (Karim *et al.*, 2000). Entretanto, na prática nem sempre é fácil equilibrar os gastos com manejos pré e pós abate com os lucros que poderão ser obtidos com a produção de bovinos MD que apresentem bom desempenho, sejam saudáveis e produzam carne de boa qualidade. A Figura 6 resume o impacto dessa síndrome em algumas características de importância econômica para a bovinocultura de corte.

A expressão das características conferidas pelo fenótipo MD é extremamente variável e dependente da herança genética. Em um rebanho, poucos, ou mesmo nenhum animal, apresentarão todas as características observadas nesta síndrome. Além disso, algumas características se expressarão em intensidades mais severas e outras mais discretas, existindo a possibilidade de

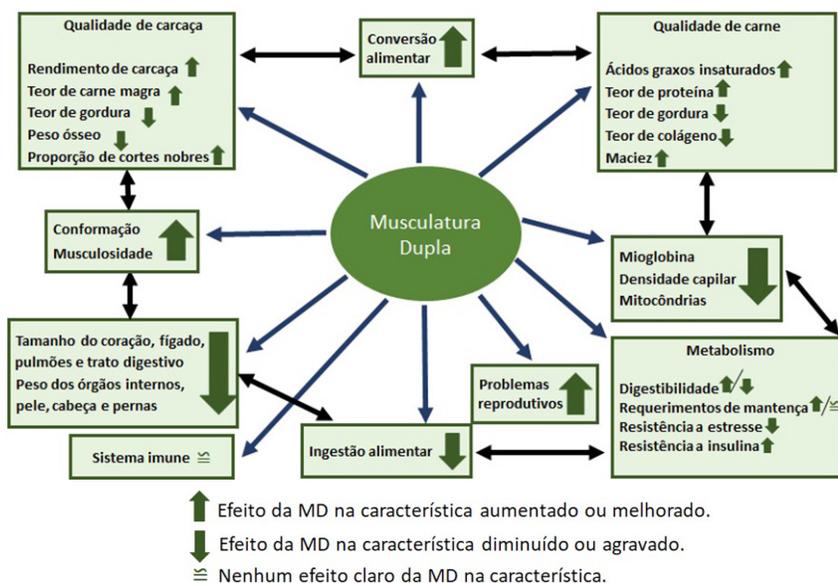


Figura 6. Impacto da síndrome da musculatura dupla em algumas características de importância econômica em bovinos de corte. Adaptado de Fiems (2012).

que a expressão das características principais seja diferente para diferentes raças. Segundo Teixeira *et al.* (2006) todos estes pontos devem ser considerados quando um rebanho é avaliado fenotipicamente.

Utilizando as características principais e mais evidentes da MD vários autores elaboraram critérios fenotípicos para classificar os animais com base em inspeção visual. Em 1962, Neuvy e Vissac sugeriram a avaliação de 10 características para descrever a síndrome MD, com valores crescentes em função da intensidade com que se apresentavam, sendo 0 para intensidade baixa, 1 para intermediária e 2 para alta. Os fenótipos considerados por estes autores e os períodos mais adequados que eles devem ser avaliados foram: macroglossia, hipertrofia da escápula, hipertrofia muscular da coxa, presença de sulcos cutâneos e retração do ventre, de três meses a um ano; compacidade geral, aprumos, ossos mais finos, inclinação da garupa e cauda, em qualquer período da vida (Teixeira *et al.*, 2006).

Em 1965, Charlet e Poly consideraram para avaliação visual as características de macroglossia, hipertrofia dos músculos da escápula e dos músculos da coxa; o corpo mais largo em relação a altura; redução do abdômen; in-

clinação da garupa; cauda com inserção mais alta, ressaltada pela convexidade da nádega (cauda em cajado); presença de sulcos entre os músculos; posição das pernas; e, pernas dianteiras com ossos mais finos. Os animais analisados por estes critérios recebiam, conforme a sua aparência, escores onde 0 = normal, 1 = intermediário e 2 = hipertrofia muscular. Esses valores eram somados e, com base no valor total, o animal classificado de zero a seis era considerado normal, de sete a 12 era intermediário ou heterozigoto e de 13 a 20 era hipertrófico (Teixeira *et al.*, 2006).

Três anos depois, Oliver e Cartwright (1968) adotaram um sistema de classificação baseado na avaliação geral, determinando como escore 1 os animais que não mostravam fenótipos para a síndrome MD; 2 eram aqueles que apresentavam fenótipos muito discretos; 3 eram os animais que mostravam características mais evidentes; e, 4 aqueles com fenótipos extremos de hipertrofia muscular. Esses autores acreditavam que os indivíduos classificados como 1 e 4 incluíam todos os homozigotos normal e MD, respectivamente, e, talvez, alguns heterozigotos. Enquanto aqueles classificados como 2 e 3 seriam, em sua maioria, os heterozigotos e, talvez, alguns poucos homozigotos com variação no grau de expressão (Teixeira *et al.*, 2006).

Em 1972, Valls Ortiz e colaboradores utilizaram o sistema de avaliação visual proposto por Neuvy e Vissac (1962) para classificar animais da raça Charolês. Eles somaram o valor obtido para cada uma das 10 características avaliadas e determinaram que até seis o animal devia ser considerado normal, de seis a nove ele apresentava um fenótipo intermediário e maior que nove o indivíduo era considerado hipertrófico (Teixeira *et al.*, 2006).

Apesar do esforço de diferentes pesquisadores para desenvolver um sistema de inspeção visual acurado nenhum deles é eficaz e objetivo, sendo este tipo de avaliação apenas uma tentativa de identificar os animais heterozigotos. Além disso, em nenhuma das tentativas de classificação descritas acima foram considerados os manejos nutricional e sanitário, que podem influenciar consideravelmente na definição dos escores (Goyache *et al.*, 1996).

A partir da década de 1980, o desenvolvimento e a popularização das técnicas de biologia molecular permitiram a análise direta do DNA em toda a sua extensão. Atualmente, por meio de diferentes técnicas de biologia molecular é possível estudar genes ou regiões do genoma responsáveis pela

expressão de características fenotípicas de interesse zootécnico em animais de produção. Dessa forma, a identificação de indivíduos portadores de alelos mutados no gene *MSTN* pode ser feita por meio de testes de DNA, tornando, assim, mais eficiente o processo de seleção dos animais que serão os pais da próxima geração. A utilização de metodologias de biologia molecular para a identificação de mutações e genotipagem de rebanhos surgiu como um complemento às metodologias tradicionalmente empregadas no melhoramento genético animal.

Associação de mutações no gene *MSTN* com fenótipos de interesse

Vantagens e desvantagens da produção de bovinos de corte com a síndrome MD são relatadas em muitos trabalhos científicos, nos quais as mutações encontradas no gene *MSTN* são associadas com características fenotípicas de interesse econômico. Neste contexto, são apresentados a seguir resultados de pesquisa que foram obtidos com algumas raças de bovinos de corte criadas em diferentes sistemas de produção.

Allais *et al.* (2010) avaliaram as frequências das mutações disruptivas Q204X e nt821 nas raças Charolês, Limousin e Blonde d'Aquitaine e o efeito de uma única cópia do alelo inativo em características de carcaça, musculares e de qualidade de carne. Para tanto, foram analisados 1.114 animais Charolês, 1.254 Limousin e 981 Blonde d'Aquitaine, abatidos de 2004 a 2006, participantes de testes de progênie e filhos de 48, 36 e 30 touros, respectivamente. Os genótipos para as duas mutações foram determinados para todos os bezerros, 78% das mães e todos os reprodutores.

Foram registrados peso ao nascer, ganho médio diário durante a engorda, idade, peso vivo ao final da engorda, peso de carcaça quente, rendimento de carcaça, escores de musculatura e de gordura. Além destas características registradas rotineiramente, outras medições foram coletadas especificamente para este estudo, como: gordura interna (pélvica e renal); diminuição da temperatura da carcaça durante o resfriamento; área de olho de lombo (AOL) e pH, medidos na sexta costela; conteúdo de lipídios; de colágeno e área média da seção das fibras musculares, medidos na sétima costela; razão

da AOL para a área média da seção da fibra, calculada como uma estimativa aproximada da hiperplasia no músculo *Longissimus thoracis*; e qualidade da carne avaliada por meio de painel sensorial e da força de cisalhamento Warner-Bratzler (Allais *et al.*, 2010).

De acordo com os autores, como não foram observados animais com duas cópias do alelo mutado, tanto para Q204X quanto para nt821, em nenhuma das raças avaliadas, uma estimativa imparcial da frequência dos alelos mutados foi calculada a partir das frequências observadas nas matrizes heterozigotas, dado que elas formavam uma amostra representativa de cada raça. Como os touros são selecionados por empresas de inseminação artificial de acordo com seus objetivos de seleção eles podem não ser representativos de toda a população. Assim, a frequência do alelo Q204X inativo foi estimada em 6,50% na raça Charolês e em menos de 1% nas raças Limousin (0,70%) e Blonde d'Aquitaine (0,65%). Na raça Limousin, a frequência do alelo inativo nt821 foi de 2,20% e na raça Charolês foi de 0,05%, sendo encontrado apenas em uma matriz e um bezerro. Na raça Blonde d'Aquitaine, as frequências dos alelos nt821 e Q204X inativos foi de 0,65%. A proporção de touros heterozigotos para o alelo Q204X inativo na amostra Charolês (27,0%) foi maior do que a proporção de mães heterozigotas, levando a uma frequência de bezerras heterozigotos de 17,0% (191 animais) entre a progênie de teste. Nenhum touro heterozigoto das raças Blonde d'Aquitaine e Limousin foi encontrado para este alelo e, o alelo inativo nt821 foi observado em apenas um único touro heterozigoto da raça Limousin (2,80%) (Allais *et al.*, 2010).

Estudos anteriores mostraram que animais Limousin com MD também são portadores da mutação F94L, na qual ocorre uma transversão de citosina para adenina no éxon 1 do gene *MSTN* ocasionando a substituição de um aminoácido fenilalanina por leucina (Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003). Esta mutação não foi investigada por Allais *et al.* (2010), pois ela não está presente nas raças Charolês e Blonde d'Aquitaine. Em 1998, Grobet e colaboradores, observando animais que não apresentavam desenvolvimento muscular acentuado, mas que eram homozigotos para o alelo mutado F94L, concluíram que esta variante não interfere na atividade da proteína *MSTN*. No entanto, resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa mostraram efeito significativo desta mutação em características de interesse econômico em animais cruzados Limousin X Wagyu (Alexander *et al.*, 2009) e Limousin X Jersey

(Esmailizadeh *et al.*, 2008; Lines *et al.*, 2009). De acordo com Esmailizadeh *et al.* (2008), esta variante apresenta efeitos menos expressivos em animais homocigotos para o alelo F94L, que exibem um fenótipo intermediário quando comparados com animais portadores de mutações disruptivas.

Mesmo que Allais *et al.* (2010) não tenham investigado a associação entre características de qualidade de carcaça e carne e os genótipos F94L, a presença de uma cópia de um dos alelos inativos da miostatina (Q204X ou nt821) mostrou aumentar o valor da carne de animais Limousin, apesar da baixa frequência alélica observada. Estes autores, conduziram as análises estatísticas por raça e observaram superioridade das características de carcaça de bezerros portando uma cópia do alelo inativo (Q204X ou nt821) sobre animais Charolês e Limousin não portadores destes alelos, mas as diferenças observadas não foram significativas para a raça Blonde d'Aquitaine. Animais jovens heterocigotos da raça Charolês, portadores da mutação Q204X, apresentaram maior rendimento de carcaça; maior AOL; carcaça com menor teor de gordura, tanto interna quanto intramuscular; menor conteúdo de colágeno; maior número de fibras musculares no músculo *Longissimus thoracis*; e, carne mais clara, mais macia e com menor intensidade de sabor, do que os animais homocigotos normais.

Bovinos heterocigotos também foram ligeiramente mais pesados ao nascimento do que os homocigotos normais, o que é consistente com os resultados relatados em outros estudos (Casas *et al.*, 1998, 1999, 2004; Short *et al.*, 2002; Wiener *et al.*, 2009). 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). No entanto, na raça Piemontês, Short *et al.* (2002) apontaram que 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 quando bezerros com estes genótipos nasceram de vacas.

Ainda com relação a raça Piemontês, Casas *et al.* (1999) avaliaram a dificuldade de parto e os pesos obtidos em diferentes idades em animais homocigotos para a mutação C313Y. Neste estudo, touros Angus (A), Hereford (H), Piemontês (P), F1 Piemontês X Angus (PA) e F1 Piemontês X Hereford (PH) foram acasalados com mães F1 (PA ou PH) para produzir descendentes com 25%, 50% e 75% de herança piemontesa. Dessa forma, bezerros nascidos em 1995 (n = 82), 1996 (n = 75) e 1997 (n = 144) foram avaliados quanto aos

pesos ao nascimento (PN, kg), desmame ajustado (P200, kg) e ao sobreano (P365, kg) e para dificuldade de parto expressa como uma proporção de parto assistido. Além disso, o número de cópias do alelo mutado para C313Y foi avaliado em cada bezerro (0 = +/+; 1 = mh/+; 2 = mh/mh).

Estes autores observaram que conforme a proporção de sangue Piemontês e o número de cópias do alelo mutado aumentam nos cruzamentos a dificuldade de parto ou a necessidade de parto assistido e o peso ao nascimento também aumentam ($P = 0,01$, dificuldade de parto; $P = 0,0001$, PN). Bezerros com zero ou com uma cópia do alelo C313Y e 50% de herança piemontesa apresentaram proporções de 4% e 8%, respectivamente, de partos assistidos. Enquanto os bezerros com 50% e 75% de herança piemontesa e com duas cópias do alelo mutado apresentaram 23% e 27% mais dificuldade de parto, respectivamente. Para cada quilograma de aumento no peso ao nascer, houve um aumento de 0,7% na dificuldade de parto (Casas *et al.*, 1999).

Os animais heterozigotos (mh/+) foram $3,2 \pm 0,8$ kg mais pesados ao nascimento do que os homozigotos +/+ e apresentaram PN semelhante aos dos animais homozigotos mh/mh. A diferença observada entre os dois grupos de homozigotos foi de $5,2 \pm 1,1$ kg. Entretanto, a proporção de herança piemontesa e a quantidade de cópias do alelo mutado não influenciaram as características relacionadas ao peso à desmama e ao sobreano ($P > 0,05$). Bezerros mh/+ foram mais pesados no desmame do que os +/+ ou a média de ambos os grupos homozigotos, sendo as estimativas dessas diferenças de $9,1 \pm 4,0$ kg e $8,8 \pm 3,2$ kg, respectivamente. Para P365, os animais +/+ e os heterozigotos foram mais pesados do que os mh/mh, apresentando uma diferença de $24,5 \pm 8,0$ kg entre os grupos de bezerros mh/+ e mh/mh. Animais +/+ também foram mais pesados do que os mh/mh, sendo a diferença observada entre eles de $20,0 \pm 8,0$ kg (Casas *et al.*, 1999).

A partir destes resultados, 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. Assim, para a utilização de animais MD em pastagens é necessário manejar corretamente o rebanho com o intuito de produzir bezerros somente com uma cópia do alelo mutado, evitando, assim, a produção de animais com hipertrofia muscular extrema. Este manejo 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.

A diminuição do esqueleto e, principalmente, o reduzido desenvolvimento do osso do quadril também podem afetar o desempenho reprodutivo de animais com hipertrofia muscular. Arthur *et al.* (1988) verificaram que a incidência de distocia foi maior entre vacas com MD do que entre vacas normais, 19% e 6%, respectivamente. A altura, largura e a área da abertura pélvica foram significativamente menores ($P < 0,05$) nas vacas MD do que nas vacas normais, indicando que a maior incidência de distocia e mortalidade perinatal em bovinos com hipertrofia muscular pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, à menor área de abertura pélvica em animais portadores da síndrome da musculatura dupla.

A composição racial média das vacas na população MD no início deste estudo era de, aproximadamente, 47% Angus, 14% Charolês, 14% Galloway, 14% Hereford e 11% de outras raças. Bovinos com pelo menos 50% de herança genética Hereford foram usados como o grupo normal (N). Cruzamentos recíprocos entre os animais MD e N foram feitos em três estações reprodutivas, com acasalamentos MD X MD (touro x vaca), MD X N, N X MD e N X N. Todos os touros MD apresentavam desenvolvimento muscular extremo e todas as fêmeas MD eram progênes de touros fenotipicamente MD e de vacas do rebanho MD. Um total de 348 acasalamentos resultou em 247 partos nos quatro tipos de acasalamento. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Short *et al.* (2002), que também relataram uma diminuição linear da área pélvica em animais Piemontês com MD (Arthur *et al.*, 1988).

Em 2004, Casas e colaboradores investigaram a associação da mutação nt821 com mortalidade precoce de bezerros, características de crescimento e composição de carcaça em uma população F2. Os animais avaliados foram obtidos a partir de cruzamentos de vacas F1 com touros Charolês ou F1 Belgian Blue x raça britânica, podendo ser Hereford ou Angus. As vacas F1 foram provenientes de acasalamentos de vacas Hereford, Angus e MARC III (1/4 Hereford, 1/4 Angus, 1/4 Pinzgauer e 1/4 Red Poll) em touros Hereford, Angus, Tuli, Boran, Brahman ou Belgian Blue, sendo esta última raça a fonte do alelo mutado nt821. A mortalidade precoce de bezerros foi examinada apenas em uma subpopulação F2 ($n = 154$), derivada dos touros F1 acasalados com vacas F1 de touros Belgian Blue, com o intuito de avaliar animais com zero, uma ou com duas

cópias do alelo mutado. Os autores observaram que o número total de descendentes não diferiu da proporção esperada de 1: 2: 1 (homozigoto para o alelo normal: heterozigoto: homozigoto para o alelo mutado), entretanto, uma comparação entre bezerros que morreram antes do desmame e os que ficaram vivos até o abate mostrou uma distribuição desigual entre os genótipos ($P < 0,01$). Os bezerros com duas cópias do alelo nt821 mutado apresentaram maior probabilidade ($P < 0,01$) de morrer antes do desmame (Casas *et al.*, 2004).

As características de crescimento pós-desmame e de carcaça foram avaliadas em 1.370 animais e incluíram pesos ao nascimento, à desmama, ao abate, ganho médio diário pós-desmame, peso de carcaça quente, espessura de gordura, área de olho de lombo, escore de marmoreio, classificação por rendimento do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*Yield grade* USDA - quanto mais baixo o valor numérico da classe de rendimento, que vai de 1 a 5, maior será o rendimento esperado da carcaça em termos de cortes prontos para comércio no varejo), estimativa de gordura renal, pélvica e cardíaca, rendimento e peso de produto de varejo, rendimento e peso de gordura, rendimento e peso de ossos e porcentagem de carcaças classificadas como *Choice* (*Quality grade* USDA - classes de qualidade da carne, da melhor para a pior: *Prime, Choice, Select, Standard, Commercial, Utility, Cutter* e *Canner*). Os autores observaram que o efeito da miostatina foi significativo para todas as características analisadas ($P < 0,05$) (Casas *et al.*, 2004).

Na subpopulação F2 gerada por touros Charolês ($n = 645$) foram avaliados apenas animais com nenhuma ou com uma cópia do alelo mutado, já que a mutação nt821 não segrega nesta raça. Apesar da ausência de animais com duas cópias, o efeito desta mutação foi detectável para a maioria das características. Animais heterozigotos, carregando uma cópia do alelo mutado, foram mais pesados ao nascer e ao desmame e apresentaram maior peso de carcaça quente. Além disso, estes animais tinham maior área de olho de lombo, menor classe de rendimento do USDA, maior rendimento e peso do produto de varejo e maior rendimento e peso ósseo (Casas *et al.*, 2004).

Animais que não possuíam nenhuma cópia do alelo mutado apresentaram maior quantidade de gordura total do que aqueles que herdaram uma cópia, exibindo, assim, maiores valores para espessura de gordura; rendimento e peso de gordura; estimativa de gordura renal, pélvica e cardíaca; bem como maiores pontuações para marmoreio ($P < 0,05$). Estes animais também apre-

sentaram maior proporção de carcaças classificadas como *Choice* ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os animais com nenhuma ou com uma cópia do alelo mutado para ganho de peso médio diário pós-desmama e peso vivo (Casas *et al.*, 2004).

Enquanto na população gerada por touros F1 Belgian Blue x raça britânica ($n = 725$), os animais com duas cópias do alelo mutado foram mais pesados ao nascimento, menor classe de rendimento do USDA, maior rendimento e peso do produto de varejo, maior rendimento e peso ósseo, mais magros e apresentaram uma proporção maior de massa muscular do que os animais com nenhuma ou com apenas uma cópia do alelo nt821. Animais heterozigotos foram mais pesados ao desmame e para peso vivo, embora tivessem peso de carcaça quente e área de olho de lombo semelhantes aos animais que herdaram duas cópias do alelo mutado e ganho médio diário de peso pós-desmame semelhante aos que não herdaram nenhuma cópia (Casas *et al.*, 2004).

Da mesma forma que na subpopulação gerada por touros Charolês, animais homozigotos com os dois alelos normais desta população apresentaram maior quantidade de gordura do que os animais dos outros dois grupos. Eles tiveram maiores valores para espessura de gordura; marmoreio; quantidade de gordura estimada de rins, pélvica e de coração; e maiores rendimento e peso de gordura do que os animais que herdaram uma ou duas cópias do alelo mutado. Além disso, uma maior porcentagem de carcaças foi classificada entre estes animais como *Choice* ($P < 0,05$) (Casas *et al.*, 2004).

Bovinos com MD não apenas apresentam maior rendimento de carcaça, como também apresentam maior rendimento dos cortes nobres, ou seja, dos cortes que são mais bem remunerados pelas indústrias e pelos consumidores. Isso foi demonstrado comparando touros Belgian Blue com MD com touros que apresentavam genótipo normal, nos quais os rendimentos foram, em média, 70% e 64%, respectivamente, resultando em um peso de carcaça fria de 420 kg e 384 kg, respectivamente. Devido ao maior teor de carne magra na carcaça (76% vs. 65%), a carne total chegou a 319 kg e 250 kg, respectivamente, sendo 28% a mais para animais com MD. Desse rendimento total de carne, 171 kg e 123 kg foram de cortes para assar, filé e bifês mais caros, enquanto 148 kg e 127 kg foram cortes mais baratos usados para cozidos, ensopados ou hambúrgueres, sendo o rendimento de 39% e 17% a mais para animais MD dentro de cada classe de cortes no varejo, respectivamente (Fiems, 2012).

Wheeler *et al.* (2001), visando determinar as contribuições relativas da herança piemontesa (0, 25%, 50% ou 75%) e da miostatina na maciez dos músculos *Longissimus thoracis* (LD), glúteo médio (GM), semimembranoso (SM) e bíceps femoral (BF) direcionaram acasalamentos para produzir animais com zero (+/+), uma (mh/+) ou duas cópias (mh/mh) do alelo inativo para a mutação C313Y. Dessa forma, durante um período de quatro anos, 395 novilhos e novilhas da raça Piemontês foram abatidos com idade entre 14 a 17 meses. Por meio de um painel sensorial, oito pessoas treinadas avaliaram aos 14 dias *post-mortem* maciez, facilidade de fragmentação, quantidade de tecido conjuntivo, suculência e intensidade do sabor da carne de bifes retirados dos músculos. Em um primeiro momento, os dados foram analisados para os efeitos do músculo (LD, GM, SM e BF) e do grupo (oito combinações de genótipo de miostatina e porcentagem de herança piemontesa = [+/+] / 0%, [+/+] / 25%, [+/+] / 50%, [mh/] / 25%, [mh/] / 50%, [mh/] / 75%, [mh/mh] / 50% e [mh/mh] / 75%). Entretanto, como a porcentagem de herança piemontesa não foi significativa ($P > 0,05$) para as características avaliadas, os dados foram reanalisados considerando apenas os efeitos do músculo e do genótipo (+/+, mh/+ e mh/mh).

Valores para maciez, facilidade de fragmentação e quantidade de tecido conjuntivo foram maiores para os genótipos mh/+ e mh/mh em relação a +/+ nos quatro músculos. Entretanto, no BF o genótipo mh/mh apresentou maior maciez, facilidade de fragmentação e quantidade de tecido conjuntivo do que o genótipo mh/+. As avaliações de suculência apresentaram valores menores para o genótipo mh/mh quando comparado com o genótipo mh/+ em todos os músculos, tendo sido menores para mh/mh do que para +/+ para os músculos LD, SM e BF. Os valores de intensidade do sabor da carne foram menores para mh/mh do que para +/+ em todos músculos avaliados. As classificações musculares para maciez dentro do genótipo de miostatina foram LD > GM > SM > BF, LD > GM > SM > BF, LD > GM > BF > SM, para os genótipos +/+, mh/+ e mh/mh, respectivamente. Segundo os autores, os touros Piemontês mh/mh podem ser usados como touros terminais para produzir progênie mh/+ com valor de carcaça melhorado devido à maciez melhorada nos quatro músculos estudados (Wheeler *et al.*, 2001).

Considerando também a qualidade da carne, Gariépy *et al.* (1999) avaliaram bezerras nascidas de mães F1 britânicas (Hereford X Red Angus) e continentais (Simental X Maine Anjou), sem MD, que foram inseminadas com touros

sem MD da raça Charolês (grupo controle) e com touros com MD das raças Piemontês (portador da mutação C313Y) e Belgian Blue (portador da mutação nt821). Após a desmama, todos os bezerros machos e fêmeas foram confinados e receberam a mesma dieta e manejo até o abate, que foi determinado por ultrassonografia quando atingiram, aproximadamente, 10 mm de espessura de gordura. Após o abate, as carcaças foram refrigeradas de acordo com procedimentos comerciais padrão, classificadas e maturadas por sete dias antes das amostras de carne (*short loin*) serem retiradas para avaliação. Foram avaliadas as seguintes características no bife *Porterhouse*: rendimento de carne magra, de gordura e de ossos; quantidade de gordura intramuscular, de proteína e de lipídios; colesterol na carne; e ácidos graxos. Medidas de qualidade de carne, como pH, cor, perdas por descongelamento e gotejamento, colágeno total e solúvel, força de cisalhamento e avaliação sensorial de maciez, sabor e suculência foram feitas na porção anterior do músculo *Longissimus lumborum*.

Como resultados, os animais filhos de pais Belgian Blue e Piemontês apresentaram menor quantidade de gordura intramuscular, maior quantidade de proteína e maior rendimento de carne magra do que os filhos de touros Charolês. Diferenças observadas na porcentagem de ossos não foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$). As concentrações de colesterol, pH final, perdas no descongelamento e cozimento, força de cisalhamento, maciez e sabor não foram afetadas pelo pai, mãe ou sexo do bezerro. No entanto, a carne dos bezerros machos apresentou maior perda por gotejamento e a cor da carne dos bezerros machos nascidos de mães britânicas foi ligeiramente mais saturada do que a dos bezerros nascidos de mães continentais (Gariépy *et al.*, 1999).

Interações significativas no conteúdo de colágeno total e solúvel, envolvendo características parentais juntamente com o efeito do sexo da progênie, não induziram diferenças na textura em termos de força de cisalhamento e maciez, mas a carne dos bezerros machos oriundos de mães continentais cruzadas com touros Belgian Blue apresentou menor teor de colágeno e maior suculência. Portanto, o efeito da MD como característica paterna na qualidade geral da carne das progênies foi mínimo e dependente da origem da mãe e do sexo da prole. Assim, para a produção comercial, a decisão de incluir ou não a característica de hipertrofia muscular em cruzamentos terminais deve ser baseada em critérios como rendimento de carcaça e preferência do consumidor por carne mais magra (Gariépy *et al.*, 1999).

Na raça Senepol, não havia até 2014 relatos na literatura sobre a ocorrência de musculatura dupla e, conseqüentemente, não havia descrição de mutações no gene *MSTN* que possam estar associadas com esta síndrome. Porém, como na prática são observados animais que apresentam hipertrofia muscular, Xavier (2014) desenvolveu na Embrapa Gado de Corte um trabalho de prospecção de polimorfismos no gene *MSTN*. Neste trabalho, o sequenciamento do gene *MSTN* revelou 11 polimorfismos, sendo um polimorfismo de base única (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) detectado no éxon 2 (nt414), uma deleção de 11 pares de bases no éxon 3 (nt821) e nove SNPs na região 3' UTR (*Untranslated Region*). De acordo com dados da literatura, a mutação nt821 inativa a proteína miostatina, apresenta efeito maior quando comparada com outros polimorfismos descritos e está associada com o fenótipo MD em diversas raças bovinas (McPherron & Lee, 1997; Grobet *et al.*, 1998; Dunner *et al.*, 2003; Marchitelli *et al.*, 2003). Como consequência do trabalho de Xavier (2014), desde 2018 testes genéticos para a mutação nt821 são realizados no Brasil na raça Senepol, permitindo a identificação precoce de animais portadores da variante mutante.

Costa-Urquiza (2017) analisou informações fenotípicas e os genótipos para a mutação nt821 de animais participantes de Provas de Avaliação de Desempenho a pasto da raça Senepol (PADS) realizadas nos anos de 2011 a 2015. Foram mensuradas características fenotípicas como peso inicial ajustado para 330 dias (PESO330), ganho de peso médio diário (GMD), conformação frigorífica (NCF), peso final (PESO550), perímetro escrotal (PE550), espessura de gordura subcutânea (EGS550), espessura de gordura na picanha (EGP550), área de olho de lombo (AOL550) e marmoreio (MARM550) ajustados para 550 dias. Dos 346 touros jovens Senepol genotipados, 70 (20%) apresentaram o genótipo heterozigoto (+/del) e 276 (80%) apresentaram o genótipo homozigoto (+/+) sem a presença da deleção nt821. Não foram encontrados animais homozigotos (del/del) com fenótipo extremo para musculatura dupla, já que estes animais são descartados dos rebanhos após o desmame. Os indivíduos heterozigotos (+/del) apresentaram maior AOL ajustada para 550 dias quando comparados com os homozigotos sem a mutação (+/+), apresentando aproximadamente 8% a mais de carne neste músculo. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) para PESO330, PESO550 e GMD entre os dois genótipos estudados.

Além disso, Costa-Urquiza (2017) também não observou diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos heterozigoto (+/del) e homozigoto (+/+) para as características relacionadas com deposição de gordura na carcaça (MARM550, EGS550 e EGP550) ($P > 0,05$), embora os indivíduos heterozigotos tenham apresentado menor espessura de gordura para EGS550 e EGP550 (2,01 cm e 2,08 cm, respectivamente) quando comparados com os homozigotos (2,28 cm e 2,17 cm, respectivamente). Estes resultados são condizentes com os encontrados na raça Asturiana de los Valles por Aldai *et al.* (2006), que relataram cobertura de gordura semelhante para animais heterozigotos e homozigotos normais. Com relação ao perímetro escrotal (PE), a presença do alelo mutado nt821 nos animais Senepol heterozigotos foi desfavorável, uma vez que, os animais homozigotos normais apresentaram, aproximadamente, 1 cm a mais de PE do que os animais com genótipo heterozigoto.

Ainda com relação a raça Senepol, Menezes *et al.* (2022) analisaram a associação de DEPs (Diferença Esperada na Progenie) e de características fenotípicas relacionadas à qualidade de carcaça com a presença da mutação nt821 em 2.044 animais puros. Os animais, 586 machos e 1458 fêmeas, foram participantes de provas comerciais de desempenho realizadas entre 2011 e 2020 e foram genotipados por meio do chip GGP Bovine 50k da NEOGEN®. As DEPs para área de olho de lombo (AOLg - kg), espessura de gordura subcutânea (EGSg - mm) e porcentagem de gordura intramuscular (MARMg - %) foram obtidas da Avaliação Genômica do Senepol realizada pelo Programa Embrapa Geneplus e pela Associação Brasileira de Criadores de Bovinos Senepol (ABCB Senepol) (Geneplus Senepol, 2021). Já, os fenótipos área de olho de lombo (AOL - cm²), espessura de gordura subcutânea (EGS - mm) e porcentagem de gordura intramuscular (MARM - %) foram obtidos por ultrassonografia na região entre a 12^a e 13^a costelas no músculo *Longissimus dorsi*.

O efeito de uma cópia da mutação nt821 foi significativo para todas as variáveis ($P < 0,05$), tanto para fenótipos quanto para as DEPs. Os indivíduos heterozigotos apresentaram maior AOL (73,05 cm²) quando comparados aos animais homozigotos sem a mutação (69,20 cm²), o que tem sido relacionado ao maior rendimento de cortes comerciais e peso de carcaça (SILVA *et al.*, 2012). Os resultados obtidos por Casas *et al.* (2004) e Allais *et al.* (2010) para bovinos mestiços e raças de corte francesas, respectivamente, foram seme-

lhantes a este estudo. No Brasil, indivíduos homozigotos para a mutação nt821 são descartados da reprodução, conforme recomendação da ABCB Senepol. No entanto, heterozigotos são aceitos, podendo representar uma oportunidade para melhorar os sistemas nacionais de produção com foco no aumento da produtividade da carne, já que metade de suas progênes será portadora da mutação nt821 (Menezes *et al.*, 2022).

Em relação à deposição de gordura na carcaça, os efeitos de uma cópia da mutação nt821 são antagônicos aos encontrados para AOL. Os animais heterozigotos apresentaram menor EGS (5,02 mm) e menor porcentagem de MARM (2,42%), quando comparados aos animais homozigotos sem a mutação (5,45 mm e 2,70%, respectivamente). Semelhante a AOL, os estudos realizados por Casas *et al.* (2004) e Allais *et al.* (2010) corroboram estes resultados. Para atender mercados que desejam carne magra, o uso de animais portadores da mutação nt821 pode ser desejável. Entretanto, a demanda predominante no Brasil é por carcaças com cobertura de gordura adequada, para proteger contra o resfriamento rápido e o encurtamento das fibras musculares pelo frio, o que, conseqüentemente, diminui a maciez da carne. Além disso, há uma tendência de priorizar cortes com nível adequado de marmoreio, o que impacta diretamente na suculência e no sabor da carne (Menezes *et al.*, 2022).

Atualmente, está em andamento na Embrapa Gado de Corte um trabalho de prospecção de polimorfismos no gene *MSTN* na raça Bonsmara, visando o desenvolvimento de um teste de DNA que possibilite a identificação precoce de animais portadores dos alelos mutados. Além disso, também serão avaliados os efeitos que polimorfismos neste gene causam em animais Bonsmara, especialmente àqueles relacionados à facilidade de parto (partos distócicos, peso e perímetro torácico do bezerro ao nascer), peso a desmama, peso ao sobreano e precocidade sexual (circunferência escrotal e idade ao primeiro parto). Com base nos resultados obtidos, os produtores desta raça poderão tornar mais eficiente o processo de seleção dos touros que serão os pais das próximas gerações, facilitando a tarefa de eliminar ou de introduzir controladamente os alelos de interesse nos rebanhos.

Considerações finais

Conforme descrito anteriormente, bovinos com a síndrome da musculatura dupla podem apresentar algumas vantagens para os produtores, indústrias da carne e consumidores, como por exemplo, alta proporção de cortes de carne com melhor valor de mercado, melhor rendimento de carcaça, melhor conversão alimentar, menores teores de gordura interna, subcutânea e intramuscular, menor proporção de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados, reduzida quantidade de colágeno e de tecido conjuntivo, resultando, assim, em uma carne mais macia e saudável.

Entretanto, estes bovinos também apresentam diversos problemas físicos, reprodutivos e fisiológicos, tais como redução de fertilidade; genitália externa subdesenvolvida; menor volume de sêmen; alta incidência de distocia; aumento de abortos e de natimortos; baixa viabilidade do bezerro; estresse nutricional; baixa capacidade de dissipação do calor; capacidade respiratória reduzida; susceptibilidade a doenças respiratórias; menores volumes de sangue, de contagem de hematócritos, de teor de hemoglobina e de mioglobina; ossos mais finos com maior frequência de fraturas; elevada porcentagem de fibras brancas; carne mais pálida; entre outros. Estas características evidenciam a necessidade de cuidados extras na produção de animais MD para garantir o bem estar animal, como sombra durante o pastejo para reduzir o estresse por calor, nutrição adequada para reduzir o estresse nutricional ou o uso eletivo de cesariana para reduzir a perda de bezerras.

Devido a esta grande quantidade de efeitos adversos, bovinos MD não são desejados pela maioria dos produtores, fazendo com que várias associações de criadores tratem esta condição como um problema que precisa ser eliminado dos rebanhos. Para isso, há a necessidade de identificar com precisão os animais portadores de mutações no gene *MSTN*, responsável por codificar a proteína miostatina, por meio da utilização de técnicas de biologia molecular, complementando, assim, as metodologias tradicionalmente empregadas nos processos de seleção e acasalamento.

Os testes de DNA permitem distinguir os genótipos de maneira inequívoca, identificando os animais homozigotos normais, os heterozigotos e os homozigotos portadores de dois alelos mutados; determinar as frequências alélicas

e genóticas em raças nas quais os alelos mutados estejam segregando; e, estimar a real superioridade das características de interesse econômico dos animais heterozigotos em relação aos animais homozigotos normais. Estes resultados podem ser usados para auxiliar os produtores nas tomadas de decisões sobre as estratégias de acasalamentos mais adequadas, visando alcançar os objetivos de seleção de cada criador.

Referências

- ALDAI, N.; MURRAY, B. E.; OLIVAN, M.; MARTÍNEZ, A.; TROY, D. J.; OSORO, K.; NÁJERA, A. I. The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physicochemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. **Meat Science**, v. 72, n. 3, p. 486-495, 2006.
- ALEXANDER, L. J.; KUEHN, L. A.; SMITH, T. P. L.; MATUKUMALLI, L. K.; MOTE, B.; KOLTES, J. E.; REECY, J.; GEARY, T. W.; RULE, D. C.; MacNEIL, M. D. A Limousin specific myostatin allele affects longissimus muscle area and fatty acid profiles in a Wagyu-Limousin F2 population. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 1576-1581, 2009.
- ALGIRE, C.; MEDRIKOVA, D.; HERZIG, S. White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, n.5, p. 896-904, 2013.
- ALLAIS, S.; LEVÉZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; HOCQUETTE, J. F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; JOURNAUX, L.; BONNOT, A.; 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. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 446-454, 2010.
- ALLEN, D. L.; LOH, A. S. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 300, n. 1, p. C124-137, 2011.
- ALLEN, D. L.; CLEARY, A. S.; SPEAKER, K. J.; LINDSAY, S. F.; UYENISHI, J.; REED, J. M.; MADDEN, M. C.; MEHAN, R. S. Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 294, n. 5, p. E918-927, 2008.
- AMTHOR, H.; OTTO, A.; MACHARIA, R.; MCKINNELL, I.; PATEL, K. Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. **Developmental Dynamics**, v. 235, p. 672-680, 2006.
- ARTHUR, P. F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M. A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscléd and normal cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 29, n. 2, p.163-167, 1988.
- ARTHUR, P. F. Double muscling in cattle: A review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, p. 1493-1515, 1995.
- AVERSA, Z.; BONETTO, A.; PENNA, F.; COSTELLI, P.; DI RIENZO, G.; LACITIGNOLA, A.; BACCINO, F. M.; ZIPARO, V.; MERCANTINI, P.; FANELLI, F. R.; MUSCARITOLI, M. Changes

in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 4, p. 1350-1356, 2012.

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

BIAGINI, D.; LAZZARONI, C. Carcass dissection and commercial meat yield in Piemontese and Belgian Blue double-muscled young bulls. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 3, p. 199-204, 2005.

BOMAN, I. A.; KLEMETSDA, G.; BLICHFELDT, T.; NAFSTAD, O.; VAGE, D. I. A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v. 40, n. 4, p. 418-422, 2009.

CAMBIER, C.; CLERBAUX, T.; DETRY, B.; BEERENS, D.; FRANS, A.; GUSTIN, P. Blood oxygen binding in double-muscled calves and dairy calves with conventional muscle conformation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 3, p. 299-304, 2000.

CAPPUCCIO, L.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A. A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. **Animal Genetics**, p. 29-51, 1998.

CASAS, E.; BENNETT, G. L.; SMITH, T. P.; CUNDIFF, L. V. Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 10, p. 2913-2918, 2004.

CASAS, E.; KEELE, J. W.; FAHRENKRUG, S. C.; SMITH, T. P.; CUNDIFF, L. V.; STONE, R. T. Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreds segregating an inactive myostatin allele. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 7, p. 1686-1692, 1999.

CASAS, E.; KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; SONSTEGARD, T. S.; SMITH, T. P. L.; KNAPPE, S. M.; STONE, R. T. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 468-473, 1998.

CHAL, J.; POURQUIE, O. Making muscle: skeletal Myogenesis in vivo and in vitro. **Development**, v. 144, n. 12, p. 2104-2122, 2017.

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

CHELH, I.; RODRIGUEZ, J.; BONNIEU, A.; CASSAR-MALEK, I.; COTTIN, P.; GABILLARD, J. C.; LEIBOITCH, S.; HADJ SASSI, A.; SEILIEZ, I.; PICARD, B. La myostatine: Un régulateur négatif de la masse musculaire chez les vertébrés. **Inra Productions Animales**, v. 22, n. 5, p. 397-408, 2009.

CHEN, X.; HUANG, Z.; CHEN, D.; YANG, T.; LIU, G. MicroRNA-27a is induced by leucine and contributes to leucine-induced proliferation promotion in C2C12 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14076-14084, 2013.

CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBÉ, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSÉN, J. M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. A mutation creating a potential

illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 813-818, 2006.

COSTA-URQUIZA, A. S. **Avaliação e aplicação de métodos de genotipagem para estudo da síndrome da musculatura dupla em bovinos da raça Senepol**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

CULLEY, G. **Observations on Livestock**. 4th Edn. (G. Woodfall: London), 1807.

DALL'OLIO, S.; FONTANESI, L.; NANNI COSTA, L.; TASSINARI, M.; MINIERI, L.; FALASCHINI, A. Analysis of horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Article ID 542945, 11 p., 2010.

DAOPIN, S.; PIEZ, K. A.; OGAWA, Y.; DAVIES, D. R. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. **Science**, v. 17, n. 257, p. 369-373, 1992.

DENG, B.; ZHANG, F.; WEN, J.; YE, S.; WANG, L.; YANG, Y.; GONG, P.; JIANG, S. The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. **Nutrition and Metabolism**, v. 14, p. 29, 2017.

DIAS CORREIA, J. H. R.; DIAS CORREIA, A. A. Regulação da Miogénese, **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 2, p. 9-30, 2006.

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

DUNNER, S.; MIRANDA, M. E.; AMIGUES, Y.; CANON, J.; GEORGES, M.; HANSET, R.; WILLIAMS, J.; MÉNISSIER, F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 35, p. 103-118, 2003.

EMBRAPA GENEPLUS PROGRAM FOR SENEPOL BREED (GENEPLUS SENEPOL). **The Brazilian Senepol Genomic Evaluation – 2021**. Available at: <https://geneplus.com.br/sumario-senepol-2021/>.

ESMAILIZADEH, A. K.; BOTTEMA, C. D. K.; SELICK, G. S.; VERBYLA, A. P.; MORRIS, C. A.; CULLEN, N. G.; PITCHFORD, W. S. Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. **Journal of Animal Science**, v. 86, p.1038–1046, 2008.

FIEMS, L. O. Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat. **Animals**, v. 2, p. 472-506, 2012.

FIGEAC, N.; DACZEWSKA, M.; MARCELLE, C.; JAGLA, K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. **Developmental Dynamics**, v. 236, p. 3332-3342, 2007.

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

GARCIA, P. S.; CABBABE, A.; KAMBADUR, R.; NICHOLAS, G.; CSETE, M. Brief-reports: elevated myostatin levels in patients with liver disease: a potential contributor to skeletal muscle wasting. **Anesthesia and Analgesia**, v. 111, p. 707-709, 2010.

- GARIÉPY, C.; SEOANE, J. R.; CLOTEAU, C.; MARTIN, J. F.; ROY, G. L. The use of double-muscled cattle breeds in terminal crosses: meat quality. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 79, n. 3, 1999.
- GONZALEZ-CADAVID, N. F.; TAYLOR, W. E.; YARASHESKI, K.; SINHA-HIKIM, I.; MA, K.; EZZAT, S.; SHEN, R.; LALANI, R.; ASA, S.; MAMITA, M.; NAIR, G.; ARVER, S.; BHASIN, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14938–14943, 1998.
- GOYACHE, F.; VILLA, A.; DUNNER, S.; GUTIERREZ, J. P.; ALONSO, L.; VALLEJO, M.; CAÑÓN, 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**, n. 68, p. 45-61, 1996.
- GRIFFITH, D. L.; KECK, P. C.; SAMPATH, T. K.; RUEGER, D. C.; CARLSON, W. D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 878-883, 1996.
- GROBET, L.; MARTIN, D.; PONCELET, D.; PIROTTIN, B.; BROUWERS, J.; RIQUET, A.; SCHOEBERLEIN, S.; DUNNER, F.; MENISSIER, J.; MASSABANDA, R.; FRIES, R.; HANSET, M. G. A deletion in bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71, 1997.
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MÉNISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 210-213, 1998.
- GU, H.; CAO, Y.; QIU, B.; ZHOU, Z.; DENG, R.; CHEN, Z.; LI, R.; LI, X.; WEI, Q.; XIA, X.; YONG, W. Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 1, p. 115-122, 2016.
- GUO, T.; JOU, W.; CHANTURIYA, T.; PORTAS, J.; GAVRILOVA, O.; McPHERRON, A. C. Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity. **PLoS One**, v. 4, n. 3: e4937, 2009.
- GUSTIN, P.; LOMBA, F.; BAKIMA, J.; LEKEUX, P.; VAN DE WOESTIJNE, K. P. Partitioning of pulmonary resistance in calves. **Journal of Applied Physiology**, v. 62, n. 5, p. 1826-1831, 1987.
- HANSET, R. **Breeding for Disease Resistance in Farm Animals**. OWEN, J. B.; editor. Wallingford, Reino Unido: CAB International; 1991. pp. 467-478.
- HANSET, R.; MICHAUX, C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I. Experimental data. **Genetics Selection Evolution**, v. 17, n. 3, p. 359-368, 1985.
- HARRIDGE, S. D. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Experimental Physiology**, v. 92, n. 783-797, 2007.
- HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J. H.; EDMONDSON, D. G.; VENUTI, J. M.; OLSON, E. N.; KLEIN, W. H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v. 364, n. 6437, p. 501-506, 1993.

- HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal Applied Physiology**, v. 9, n. 2, p. 534-51, 2001.
- HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 522-531, 2004.
- HILL, E. W.; GU, J.; EIVERS, S. S.; FONSECA, R. G.; MCGIVNEY, B. A.; GOVINDARAJAN, P.; ORR, N.; KATZ, L. M.; MACHUGH, D. E. A sequence polymorphism in *MSTN* predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. **PLoS One**, v. 5, n. 1: e8645, 2010a.
- HILL, E. W.; MCGIVNEY, B. A.; GU, J.; WHISTON, R.; MACHUGH, D. E. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (*MSTN*) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. **BMC Genomics**, v. 11, n. 11, p. 552, 2010b.
- HITTEL, D. S.; BERGGREN, J. R.; SHEARER, J.; BOYLE, K.; HOUMARD, J. A. Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 30-38, 2009.
- JI, S.; LOSINSKI, R. L.; CORNELIUS, S. G.; FRANK, G. R.; WILLIS, G. M.; GERRARD, D. E.; DEPREUX, F. F. S.; SPURLOCK, M. E. Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 4, p. R1265-1273, 1998.
- JOULIA-EKAZA, D.; CABELLO, G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physio pathological aspects. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 13, p. 2401-2414, 2006. Erratum in: *Experimental Cell Research*, v. 312, n. 17, p. 3458. Dominique, Joulia-Ekaza [corrected to Joulia-Ekaza, Dominique]; Gérard, Cabello [corrected to Cabello, Gérard], 2006.
- JU, C. R.; CHEN, R. C. Serum myostatin levels and skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 102-108, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13ª Ed. Guanabara Koogan. 2017, 568p.
- KABLAR, B.; ASAKURA, A.; KRASTEL, K.; YING, C.; MAY, L. L.; GOLDHAMER, D. J.; RUDNICKI, M. A. MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, n. 6, p. 1079-1091, 1998.
- KAISER. Über die sogenannten doppellendigen. **Rinderrassenerhebung Landwirtschaftliche Jahrbuch**, v. 17, p. 387-403, 1888.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T. P. L.; BASS, J. J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v. 7, p. 910-915, 1997.
- KARALAKI, M.; FILI, S.; PHILIPPOU, A.; KOUTSILIERIS, M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. **In Vivo**, v. 23, n. 5, p. 779-796, 2009.
- KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L.; VALENTINI, A.; GEORGES, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay. **Animal Genetics**, v. 31, n. 6, p. 396-399, 2000.
- KIEFFER, N. M.; CARTWRIGHT, T. C. **Double muscling in cattle**. Technical Report N° B-1325. The Texas Agricultural Experimental Station. The Texas A&M University System, College Station, Texas, 1980.

- KIM, H. S.; LIANG, L.; DEAN, R. G.; HAUSMAN, D. B.; HARTZELL, D. L.; BAILE, C. A. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 281, n.4, p. 902-906, 2001.
- LANGLEY, B.; THOMAS, M.; BISHOP, A.; SHARMA, M.; GILMOUR, S.; KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 49831-49840, 2002.
- LEE, S. J.; McPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.
- LIN, J.; ARNOLD, H. B.; DELLA-FERA, M. A.; AZAIN, M. J.; HARTZELL, D. L.; BAILE, C. A. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 701-706, 2002.
- LINES, D. S.; PITCHFORD, W. S.; KRUK, Z. A.; BOTTEMA, C. D. K. Limousin myostatin F94L variant affects semitendinosus tenderness. **Meat Science**, v. 81, p. 126-131, 2009.
- LOPES, L. S. Aspectos fisiológicos e estruturais que influenciam o desenvolvimento do tecido muscular. **PUBVET**, v. 4, n. 18, 2010.
- LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: Luchiari Filho, 2000. 135p.
- LYONS, J. A.; HARING, J. S.; BIGA, P. R. Myostatin Expression, Lymphocyte Population, and Potential Cytokine Production Correlate with Predisposition to High-Fat Diet Induced Obesity in Mice. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12928, 2010.
- MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M. C.; CRISA, A.; NARDONE, A.; MARSAN, P. A.; VALENTINI, A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. **Mammalian Genome**, v. 14, p. 392-395, 2003.
- MARTÍN, L. J. R. **Secuenciación y análisis del gen de la miostatina bovina**. 2003. Tese (Doutorado) - Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Espanha, 2003.
- MASON, A. J. Functional analysis of the cysteine residues of activin A. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 325-332, 1994.
- McFARLANE, C.; VAJJALA, A.; ARIGELA, H.; LOKIREDDY, S.; GE, X.; BONALA, S.; MANICKAM, R.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. Negative autoregulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e87687, 2014.
- McKAY, B. R.; OGBORN, D. I.; BELLAMY, L. M.; TARNOPOLSKY, M. A.; PARISE, G. Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 6, p. 2509-2521, 2012.
- McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 595-601, 2002.
- McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 94, p. 12457-12461, 1997.

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.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. The transforming growth factor β superfamily. **Growth Factors and Cytokines in Health and Disease**, v. 1, p. 357-393, 1996.

MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, n. 9-10, p. 723-732, 1995.

MENEZES, G. R. O.; SOUZA, C. B.; LIMA, A. L. R.; GONDO, A.; SIQUEIRA, F.; EGITO, A. A.; SILVA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, J. A.; TORRES JUNIOR, R. A. A. Effect of one copy of nt821 mutation in myostatin gene on ultrasound carcass traits in Senepol cattle. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production - Programme Book, WCGALP 2022**, Rotterdam/The Netherlands 3-8 July 2022.

MÉNISSIER, F. **General survey of the effect of double muscling on cattle performance**. In: Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production: A Seminar in the CEC Programme of Coordination of Research on Beef Production held in Toulouse, France, June 1-12, 1980. KING, J. W. B.; MÉNISSIER, F. (eds). Series Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science 16. Springer Netherlands, pp. 387-428, 1982.

MIAR, Y.; SALEHI, A.; KOLBEHDARI, D.; ALEYASIN, S. A. Application of myostatin in sheep breeding programs: A review. **Molecular Biology Research Communications**, v. 3, n.1, p. 33-43, 2014.

MICHAUX, C.; HANSET, R. Sexual development of double muscled and conventional bulls - I. Testicular Growth. **Animal Breeding and Genetics**, v. 98, n. 1-4, p. 29-37, 1981.

MIRETTI, S.; MARTIGNANI, E.; ACCORNERO, P.; BARATTA, M. Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in Piedmontese cattle with double-muscled phenotype. **BMC Genomics**, v. 14, n. 194, p. 1-8, 2013.

MITCHELL, M. D.; OSEPCHOOK, C. C.; LEUNG, K. C.; McMAHON, C. D.; BASS, J. J. Myostatin is a human placental product that regulates glucose uptake. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 4, 1434-1437, 2006.

MORISSETTE, M. R.; STRICKER, J. C.; ROSENBERG, M. A.; BURANASOMBATI, C.; LEVITAN, E. B.; MITTLEMAN, M. A.; ROSENZWEIG, A. Effects of Myostatin Deletion in Aging Mice. **Aging Cell**, v. 8, n. 5, p. 573-583, 2009.

MOSHER, D. S.; QUIGNON, P.; BUSTAMANTE, C. D.; SUTTER, N. B.; ELLERSH, C. S. M.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **PLoS Genetics**, v. 3, p. e79, 2007.

NABESHIMA, Y.; HANAOKA, K.; HAYASAKA, M.; ESUML, E.; LI, S.; NONAKA, I.; NABESHIMA, Y. I. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, v. 364, p. 532-535, 1993.

NEUVY, C.; VISSAC, B. **Contribution à etude du phenomene culard**. Union Nationale des livres genealogiques, 52 p., 1962.

OLIVÁN, M.; MARTINEZ, A.; OSORO, K.; SAÑUDO, C.; PANEA, B.; OLLETA, J. L.; CAMPO, M. M.; OLIVER, M. A.; SERRA, X.; GIL, M.; PIEDRAFITA, J. Effect of muscular hypertrophy on physico-chemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. **Meat Science**, v. 68, n. 4, p. 567-575, 2004.

- OLIVER, W. M.; CARTWRIGHT, T. C. **Double Muscling in cattle. A review of expression, genetics and economic implication.** 12^a Ed. Technical Report: Texas A&M University. Department of Animal Science. 1968, 58 p.
- OSTBYE, T. K.; WETTEN, O. F.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; JAKOBSEN, K. S.; YAFE, A.; ETZIONI, S.; MOEN, T.; ANDERSEN, O. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. **Gene**, v. 403, n. 1-2, p. 159-169, 2007.
- PATAPOUTIAN, A.; YOON, J. K.; MINER, J. H.; WANG, S.; STARK, K.; WOLD, B. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. **Development**, v. 121, n. 10, p. 3347-3358, 1995.
- QIAN, L.; TANG, M.; YANG, J.; WANG, Q.; CAI, C.; JIANG, S.; LI, H.; JIANG, K.; GAO, P.; MA, D.; CHEN, Y.; AN, X.; LI, K.; CUI, W. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs. **Scientific Reports**, v. 5, n. 14435, p. 1-13, 2015.
- RAWLS, A.; MORRIS, J. H.; RUDNICKI, M.; BRAUN, T.; ARNOLD, H. H.; KLEIN, W. H.; OLSON, E. N. Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis. **Developmental Biology**, v. 172, n. 1, p. 37-50, 1995.
- RODGERS, B. D.; GARIKIPATI, D. K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 5, p. 513-534, 2008.
- RUDNICKI, M. A.; SCHNEGELSBERG, P. N. J.; STEAD, R. H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H. H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351-1359, 1993.
- SALERNO, M. S.; THOMAS, M.; FORBES, D.; WATSON, T.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. C1031-C1040, 2004.
- SALVATORE, D.; SIMONIDES, W. S.; DENTICE, M.; ZAVACKI, A. M.; LARSEN, P. R. Thyroid hormones and skeletal muscle-new insights and potential implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 206-214, 2014.
- SAÑUDO, C.; MACIE, E. S.; OLLETA, J. L.; VILLARROEL, M.; PANEA, B.; ALBERTÍ, P. The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. **Meat Science**, v. 66, n. 4, p. 925-932, 2004.
- SAYED, D.; ABDELLATIF, M. MicroRNAs in development and disease. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 827-887, 2011.
- SAZANOV, A.; EWALD, D.; BUITKAMP, J.; FRIES, R. A molecular marker for the chicken myostatin gene (GDF8) maps to 7p11. **Animal Genetics**, v. 30, p. 388-389, 1999.
- SCHUELKE, M.; WAGNER, K. R.; STOLZ, L. E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T.; KOMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S. J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2682-2688, 2004.
- SCHULTZ, E.; McCORMICK, K. M. Skeletal Muscle Satellite Cells. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 123, p. 213-257, 1994.

- SEVANE, N.; NUTE, G.; SAÑUDO, C.; CORTES, O.; CAÑÓN, J.; WILLIAMS, J. L.; DUNNER, S. Muscle lipid composition in bulls from 15 European breeds, **Livestock Science**, v. 160, p. 1-11, 2014.
- SHARMA, M.; McFARLANE, C.; KAMBADUR, R.; KUKRETI, H.; BONALA, S.; SRINIVASAN, S. Myostatin: expanding horizons. **IUBMB Life**, v. 67, n. 8, p. 589-600, 2015.
- SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; MATTHEWS, K. G.; SOMERS, W. G.; DEVLIN, G. P.; CONAGLEN, J. V.; FOWKE, P. J.; BASS, J. J. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. **Journal of Cellular Physiology**, v. 180, n.1, p. 1-9, 1999.
- SHORT, R. E.; MacNEIL, M. D.; GROSZ, M. D.; GERRARD, D. E.; GRINGS, E. E. Pleiotropic effects in Hereford, Limousin and Piedmontese F2 crossbred calves of genes controlling muscularity including the Piedmontese myostatin allele. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 1, p. 1-11, 2002.
- SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suppl. especial, p. 21-31, 2007.
- SILVA, S. L.; TAROUCO, J. U.; FERRAZ, J. B. S.; GOMES, R. C.; LEME, P. R.; NAVAJAS, E. A. Prediction of retail beef yield, trim fat and proportion of high-valued cuts in Nellore cattle using ultrasound live measurements. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, p. 2025-2031, 2012.
- SMITH, T. P. L.; LOPEZ-CORRALES, N. L.; KAPPES, S. M.; SONSTEGARD T. S. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. **Mammalian Genome**, v. 8, p.742-744, 1997.
- SMITH, A. G.; MUSCAT, G. E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 2047-2063, 2005.
- SOLINAS-TOLDO, S.; LENGAUER, C.; FRIES, R. Comparative genome map of human and cattle. **Genomics**, v. 27, n. 3, p. 489-496, 1995.
- SONSTEGARD, T. S.; ROHRER, G. A.; SMITH, T. P. L. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. **Animal Genetics**, v. 29, p. 19-22, 1998.
- STEFANI, G.; SLACK, F. J. Small non-coding RNAs in animal development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 219-230, 2008.
- STINCKENS, A.; LUYTEN, T.; BIJTTEBIER J.; VAN DEN MAAGDENBERG, K.; DIELTIENS, D.; JANSSENS, S.; DE SMET, S.; GEORGES, M.; BUYS, N. Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. **Animal Genetics**, v. 39, n. 6, p. 586-596, 2008.
- STINCKENS, A.; BIJTTEBIER, J.; LUYTEN, T.; VAN DEN MAAGDENBERG, K.; HARMEGNIES, N.; DE SMET, S.; GEORGES, M.; BUYS N. Detection of polymorphisms in the myostatin gene in belgian pietrain pigs. **Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 70, p. 37-41, 2005.
- SZABO, G.; DALLMANN, G.; MULLER, G.; PATTHY, L.; SOLLER, M.; VARGA, L. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. **Mammalian Genome**, v. 9, n. 8, p. 671-672, 1998.

- TAJBAKSH, S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. **Journal of Internal Medicine**, v. 266, p. 372-389, 2009.
- TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla. I – Características de desempenho e da carcaça de bovinos. **Archive Latinoamerican Production Animal**, v. 14, n. 1, p.10-16, 2006.
- THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 275, n. 51, 40235-40243, 2000.
- VALLS ORTIZ, J. M.; MÉNISSIER, F.; VISSAC, B. Étude du caractere culard. VI. - Transmission et possibilités d'utilisation en croisement de première génération pour la production de veaux de boucherie. **Annales de Génétique et de Sélection Animale**, v. 4, n. 1, p. 7-28, 1972.
- XAVIER, S. R. **Prospecção de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos da raça Senepol**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.
- XU, C.; WU, G.; ZOHAR, Y.; DU, S. J. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 22, p. 4067-4079, 2003.
- WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; CASAS, E.; CUNDIFF, L. V.; KOOHMARAIE, M. The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 12, p. 3069-3074, 2001.
- WIENER, P.; WOOLLIAMS, J. A.; FRANK-LAWALE, A.; RYAN, M.; RICHARDSON, R. I.; NUTE, G. R.; WOOD, J. D.; HOMER, D.; WILLIAMS, J. L. The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality. **Meat Science**, v. 83, p. 127-134, 2009.
- WHITTEMORE, L. A.; SONG, K.; LI, X.; AGHAJANIAN, J.; DAVIES, M.; GIRGENRATH, S.; HILL, J. J.; JALENAK, M.; KELLEY, P.; KNIGHT, A.; MAYLOR, R.; O'HARA, D.; PEARSON, A.; QUAZI, A.; RYERSON, S.; TAN, X. Y.; TOMKINSON, K. N.; VELDMAN, G. M.; WIDOM, A.; WRIGHT, J. F.; WUDYKA, S.; ZHAO, L.; WOLFMAN, N. M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 965-971, 2003.
- WRIEDT, C. Die Vererbung des Doppellender-Characters bei Rindern. **Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre**, v. 51, p. 482-486, 1929.
- YOON, J. K.; OLSON, E. N.; ARNOLD, H. H.; WOLD, B. J. Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus. **Developmental Biology**, v. 188, n. 2, p. 349-362, 1997.
- ZHU, X.; HADHAZY, M.; WEHLING, M.; TIDBALL, J. G.; McNALLY, E. M. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. **FEBS Letters**, v. 474, n. 1, p. 71-75, 2000.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

