

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

TESE

**Polimorfismos em Genes Candidatos Relacionados ao
Metabolismo de Lipídios e sua Associação com Características de
Qualidade do Leite em Caprinos**

Leonardo Ferreira

2017



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

**POLIMORFISMOS EM GENES CANDIDATOS RELACIONADOS AO
METABOLISMO DE LIPÍDIOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DO LEITE EM CAPRINOS**

LEONARDO FERREIRA

Sob a orientação da professora
Dra. Maria Amélia Menck Soares

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em produção de ruminantes.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2017

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

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

F383p Ferreira, Leonardo, 1988-
 Polimorfismos em Genes Candidatos Relacionados ao
 Metabolismo de Lipídios e sua Associação com
 Características de Qualidade do Leite em Caprinos /
 Leonardo Ferreira. - 2017.
 65 f. : il.

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

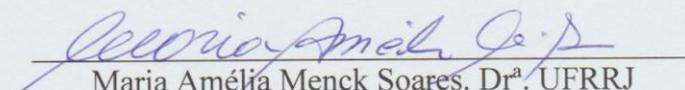
 1. Polimorfismos. 2. Valor genético. 3. Expressão
 gênica. 4. Marcadores moleculares. I. Menck Soares,
 Maria Amélia, 1963-, orient. II Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Zootecnia
 III. Título.

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

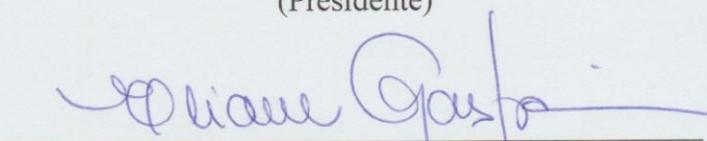
LEONARDO FERREIRA

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

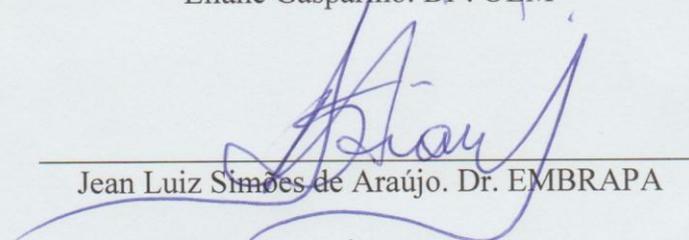
TESE APROVADA EM 15/12/2017



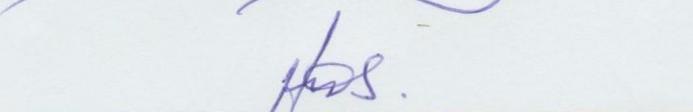
Maria Amélia Menck Soares. Dr^a. UFRRJ
(Presidente)



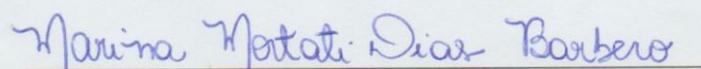
Eliane Gasparino. Dr^a. UEM



Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. EMBRAPA



Heriberto Dias da Silva. Dr. UFRRJ



Marina Mortati Dias Barbeiro. Dr^a. UFRRJ

*“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)*

*Aos meus pais
Vinicius Ferreira
Maria Marciene Balbino Ferreria*

Dedico.

Agradecimentos

A todos os professores e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de utilização das suas dependências, salas de aula e laboratórios e pelo ensino gratuito, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal e pelo incentivo a buscar mais conhecimentos.

À Universidade Federal de Viçosa e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela infra-estrutura que possibilitou a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro pelo financiamento deste projeto, bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste projeto.

À minha orientadora, Professora Dr^a. Maria Amélia Menck Soares, pelos conhecimentos a mim passados, e por me auxiliar na realização deste projeto, de grande importância em minha vida. Obrigado pela amizade, paciência, compreensão e por sua brilhante orientação.

Ao Dr. Jean Araujo, à professora Dr^a. Ana Lúcia Puerro de Melo e ao professor Dr. Marcelo Teixeira Rodrigues. Todos essenciais para que fosse possível a realização deste trabalho. Obrigado por todo o apoio técnico, tempo e pelo conhecimento passado.

Aos meus pais, Márcia e Vinicius e à minha irmã Ligia, que me auxiliaram nos momentos difíceis, sempre com bons conselhos. Obrigado por todo o apoio e compreensão.

Aos amigos que colaboraram para o desenvolvimento deste projeto, Adriana Bagatoli, Odair Rossafa e Ramon Rego.

Ao nosso técnico de laboratório Francisco e à todos que colaboraram em algum momento para o desenvolvimento deste projeto.

A todos os meus amigos, de hoje e sempre, que fizeram parte da minha vida e que me motivaram a continuar em busca desta conquista. Obrigado pelos momentos de descontração e pela amizade.

E por fim, agradeço à Deus, por ter me dado esta oportunidade e me dar forças nessa caminhada, em quem também busquei conforto em horas difíceis.

RESUMO

LEONARDO, Ferreira. **Polimorfismo em Genes Candidatos Relacionados ao Metabolismo de Lipídios e sua Associação com Características de Qualidade do Leite em Caprinos**. 2017. 64p Tese (Doutorado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Departamento de Genética, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

No Brasil, como parte da produção de leite caprino é voltada para a fabricação de derivados lácteos, a avaliação de parâmetros de qualidade, como os teores de proteína e de gordura, são fundamentais. Geralmente, programas de melhoramento que visam um aumento na qualidade do leite se valem apenas de mensurações de fenótipo, porém, esse processo pode ser aprimorado com a utilização de marcadores moleculares. Tendo em vista a busca por novos marcadores deste tipo em caprinos da raças Saanem e Alpina, com o presente trabalho objetivou-se identificar polimorfismos nos genes *UCP2*, *LPL*, *SCD* e *PPARG* e avaliar sua associação com o valor genético destes animais para características de produção e qualidade do leite. Também objetivou-se avaliar se, em caprinos da raça Alpina, polimorfismos descritos nos genes *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4* resultam em alterações na sua expressão em células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite e se essa expressão varia no decorrer lactação. Para realizar a busca por polimorfismos, fragmentos dos genes *UCP2*, *LPL*, *SCD* e *PPARG* foram amplificados pela técnica de PCR e submetidos a eletroforese, sequenciamento e PCR-RFLP. Posteriormente, aproximadamente 180 animais foram genotipados para polimorfismos encontrados nos genes *UCP2* e *PPARG* e os valores genéticos destes animais foram estimados a partir de dados de produção e composição do leite, através do modelo unicaracterística. A associação dos genótipos com os valores genéticos foi então avaliada através de análise de variância seguida por teste de Tukey a 5%. Para avaliar se polimorfismos nos genes *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4* alteram sua expressão em células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite e se essa expressão varia no decorrer da lactação, foram realizadas coletas destas tipos celulares em 50 animais da raça Alpina aos 35 dias pós-parto, em 20 destes animais, também foram realizadas coletas aos 10, 50 e 140 dias pós-parto. Como ocorreu a degradação do RNA nestas amostras, não foi possível realizar as análises de expressão gênica neste material, com isso, optamos por utilizar os *primers* para avaliar a expressão destes genes em amostras de cDNA de músculo *Longissimus lumborum* provenientes de um outro experimento desta mesma equipe. Neste experimento, também avaliou-se se a expressão destes genes apresenta correlação com as características de peso ao abate, peso da carcaça e força de cisalhamento. Essa correlação foi avaliada através do teste de correlação Pearson seguido pelo teste T. Foram identificados polimorfismos nos genes *PPARG*, *UCP2* e *LPL*. O polimorfismo identificado no gene *PPARG* apresentou associação com o valor genético dos animais para as características de produção total de leite, de gordura, de proteína, de extrato seco e de lactose. No gene *UCP2*, dois polimorfismos, -3708G/A e -2569G/A, apresentam associação com o valor genético dos animais para porcentagem de gordura, de proteína e de extrato seco. No músculo *longissimus lumborum*, a expressão do gene *PPARG* apresentou correlação positiva com a expressão do gene *GPAT4*. A partir destes resultados pode-se concluir que, foram identificados potenciais marcadores moleculares para produção e qualidade do leite, que a metodologia utilizada para coleta e armazenamento de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite não é adequada para posterior análise de expressão gênica e que o gene *GPAT4* é um provável gene alvo do PPAR- γ músculo *longissimus lumborum* de caprino.

PALAVRAS-CHAVE: expressão gênica, marcadores moleculares, valor genético.

ABSTRACT

Ferreira, Leonardo. **Polymorphism in Candidates Genes Related to Lipid Metabolism and its Association with Milk Quality Characteristics in Goats**. 2017. 64 p. Thesis (Dsc in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Departamento de Genética, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

In Brazil, as part of the goat milk produced is destined to the dairy industry, the evaluation of quality parameters, such as protein and fat content, is of great importance. Generally, breeding programs that aim an increase in milk quality, are based only on phenotype measurements, however, this process can be improved with the use of molecular markers. To search for new markers of this type in Saanem and Alpine goats, with this study we aimed to evaluate the association of polymorphisms in the *UCP2*, *LPL*, *SCD* and *PPARG* genes with dairy goats genetic value for milk production and quality characteristics. We also aimed to evaluate if polymorphisms described in the *PPARG*, *UCP2* and *GPAT4* genes results in alterations in its expression in milk mammary gland epithelial cells and if this expression changes during lactation. To search for polymorphisms, fragments of the *UCP2*, *LPL*, *SCD* and *PPARG* genes were amplified by the PCR technique and submitted to electrophoresis, sequencing and PCR-RFLP. After the identification and characterization of the polymorphisms, approximately 180 animals were genotyped for the polymorphisms found in the *UCP2* and *PPARG* genes and the genetic values of these animals were estimated from milk production and composition data using the univariate model. The evaluation of the association of these polymorphisms with the genetic value of the animals was performed through analysis of variance followed by Tukey test with significance level of 5%. In order to evaluate whether polymorphisms in the *PPARG*, *UCP2* and *GPAT4* genes affect its expression in milk mammary gland epithelial cells and if its expression varies during lactation, collections of these cell types were performed in 50 Alpine animals at 35 days post-partum, and in 20 of these animals, samples were also collected at 10, 50 and 140 days post-partum. As RNA degradation occurred in these samples, it was not possible to perform the gene expression analyzes in this material, so we chose to use this *primers* to evaluate the expression of these genes in cDNA samples of *Longissimus lumborum* muscle from another experiment of this same team. In this experiment, it was also evaluated whether the expression of these genes correlates with the slaughter weight, carcass weight and shear force characteristics. This correlation was assessed using the Pearson correlation test followed by the T-test. Polymorphisms were identified in the *PPARG*, *UCP2* and *LPL* genes. The polymorphism identified in the *PPARG* gene was associated with the genetic value of the animals for total milk production, fat production, protein production, dry extract production and lactose production. In the *UCP2* gene, two polymorphisms, -3708G/A and -2569G/A, are associated with the genetic value of the animals for percentages of fat, protein and dry extract. In the *Longissimus lumborum* muscle, the expression of the *PPARG* gene showed a positive correlation with the expression of the *GPAT4* gene. From these results, it can be concluded that, potential molecular markers for milk production and quality were identified, that the methodology used for collection and storage of milk mammary gland epithelial cells is not suitable for subsequent gene expression analysis and that the *GPAT4* gene is a probable PPAR- γ target gene in the caprine *longissimus lumborum* muscle.

KEYWORDS: gene expression, genetic merit, molecular marker.

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

- ACAT - Acil-CoA:colesterol aciltransferase
- AGPAT - Acilglicerol fosfato acetiltransferase
- C/EBP - *CCAAT-enhancer-binding protein*
- CD36 - *Cluster* de diferenciação 36
- cDNA - DNA complementar
- Células MAC-T - Células alveolares mamárias bovinas
- CTAB - Brometo hexadeciltrimetilamnio
- DEPC - Dietilpirocarbonato
- DGAT - Diacilglicerol acetiltransferase
- EDTA - cido etilenodiamino tetra-acético
- EEF1A2 - *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2*
- FC - Força de cisalhamento
- GPAT4 - Glicerol-3-Phosphate Aciltransferase 4
- G-quadruplex - Quadruplex de guanidina
- HMBS - *Hydroxymethylbilane synthase*
- LPL - Lipoproteína lipase
- MBDK - *Madin-darby bovine kidney*
- NEM - N-ethylenomaleimide
- ORF - Matriz Aberta de leitura
- PA - Peso ao abate
- PC - Peso da carçaça
- PPARG - Receptores ativado por proliferadores de peroxissomos gama
- PPRE - elementos responsivos aos PPARs
- qPCR - PCR quantitativo
- QTL - *Quantitative trait loci*
- ROS - Espécies reativas de oxignio
- RXR - Receptor X retinóide
- SCD - Stearoil CoA desnaturase
- SER - *sterol regulatory elements*
- SIDG - Secreção de insulina dependente de glicose
- SP-1 - *specific protein-1*
- SSCP - Polimorfismo de conformação de filamento nico

TBP - TATA-box *binding protein*

UCP2 - Proteína desacopladora de membrana 2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Expressão do PPARG em 14 tipos diferentes de tecidos bovinos.....	6
Figura 2. Gel representativo das diferenças de migração encontradas no fragmento amplificado pelo par de primers PPARG, que amplifica a região promotora e parte do éxon 1 do gene <i>PPARG</i>	25
Figura 3. Alinhamento das sequências da região do fragmento PPARG onde está localizado o polimorfismo -282delGAG, região promotora do gene <i>PPARG</i>	26
Figura 4. Análise in silico para avaliar a formação de G-quadruplexes entre as o alelos do polimorfismo -282delGAG.....	28
Figura 5. Alinhamento das sequências da região do fragmento PPARG onde está localizado o polimorfismo -206G/T, região promotora do gene <i>PPARG</i>	29
Figura 6. Predição das estruturas secundárias com o menor ΔG formadas pelas moléculas de DNA de fita simples do fragmento PPARG para cada um dos alelos da mutação -206G/T. ..	30
Figura 7. Gel representativo das diferenças de migração associadas ao polimorfismo -3708G/A encontradas no fragmento amplificado pelo par de primers UCP2-PR, que amplifica a região promotora e parte do éxon 1 do gene <i>UCP2</i>	32
Figura 8. Alinhamento das sequências da região do fragmento UCP2-PR onde está localizado o polimorfismo -3708G/A, região promotora do gene <i>UCP2</i>	33
Figura 9. Alinhamento das sequências da região do fragmento UCP2-PR onde está localizado o polimorfismo -3615A/G, região promotora do gene <i>UCP2</i>	35
Figura 10. Alinhamento das sequências de DNA e do peptídeo da região do fragmento UCP2-2 em que está localizado o polimorfismo -2569G/A, região 5'UTR do gene <i>UCP2</i>	36
Figura 11. Predição das estruturas secundárias com o menor ΔG formadas pelas moléculas de DNA de fita simples do fragmento UCP2-2 para cada um dos alelos da mutação -2569G/A.	37
Figura 12. Gel representativo do padrão de bandas observado para cada um dos genótipos do polimorfismo -2569 G/A após a digestão do fragmento UCP2-2 com a enzima <i>HaeIII</i>	38
Figura 13. Alinhamento das sequências da região do fragmento LPL-PR onde está localizado o polimorfismo -170C/T, região 5' UTR do gene <i>LPL</i>	41
Figura 14. Imagem dos géis de amostras de RNA de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite isoladas com o uso do PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA).	43
Figura 15. Imagem dos géis de amostras de RNA isoladas a partir de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite congeladas e armazenadas por aproximadamente 1 ano (células congeladas)..	44

Figura 16. Curvas de dissociação dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real para análise de expressão gênica em músculo Longissimus lumborum e média do valor de Ct obtido para cada um dos genes avaliados.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com os genes candidatos utilizados no presente trabalho e com o resumo da função da proteína sintetizada por cada um deles.	4
Tabela 2. Observações utilizadas para o cálculo dos valores genéticos dos animais para cada característica avaliada.....	16
Tabela 3. Número de amostras utilizadas em cada uma das análises realizadas.....	17
Tabela 4. Primers utilizados nas reações de PCR convencional.	18
Tabela 5. Sequência de bases, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento dos primers utilizados nas análises de qPCR.	23
Tabela 6. Associação dos genótipos do polimorfismo encontrado no fragmento <i>PPARG</i> com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.	26
Tabela 7. Associação dos genótipos do polimorfismo -3708G/A com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.	34
Tabela 8. Associação dos genótipos encontrados para no fragmento <i>UCP2-2</i> com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.	39
Tabela 9. Tabela com a eficiência de cada um dos pares de primers utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	45
Tabela 10. Tabela do ranking do melhor gene de referência gerado pelo algoritmo RefFinder a partir das análises realizadas pelos programas Delta CT, BestKeeper, Normfinder, Genorm.	46
Tabela 11. Correlação de Pearson entre a expressão dos genes $1/(2^{-\Delta C_t})$ <i>PPARG</i> , <i>UCP2</i> e <i>GPAT4</i> entre si e com as variáveis peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC).	48
Tabela 12. Médias e desvio padrão da expressão gênica $1/(2^{-\Delta C_t})$ entre os diferentes grupos, para cada uma das características avaliadas, FC, PA e PC.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A abordagem do gene candidato	3
2.2 Fator de proliferação de peroxissomos γ (PPAR- γ)	4
2.2.1 Polimorfismos no gene <i>PPARG</i> e a produção animal	7
2.3 Proteína desacopladora de membrana 2 (UCP2).....	8
2.3.1 Polimorfismos no gene <i>UCP2</i> e a produção animal.....	10
2.4 Lipoproteína lipase (LPL)	11
2.4.1 Polimorfismos no gene <i>LPL</i> e a produção animal.....	11
2.5 Stearoyl CoA desaturase (delta-9-desaturase).....	12
2.5.1 Polimorfismos no Gene <i>SCD</i> e a produção animal	13
2.6 Glicerol-3fosfato acetil transferase 4 (<i>GPAT4</i>).....	13
2.6.1 Polimorfismos no gene <i>GPAT4</i> e a produção animal.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Estimativa do valor genético	16
3.2 Análises com DNA genômico	17
3.2.1 Delineamento experimental.....	17
3.2.2 Amostra de animais e coleta de material biológico.....	17
3.2.3 Desenho de <i>primers</i>	17
3.2.4 Isolamento de DNA genômico	19
3.2.5 Reação em cadeia da polimerase a partir de DNA genômico (PCR)	19
3.2.6. Eletroforese e Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP).....	19
3.2.7 Sequenciamento de DNA	19
3.2.8 Análises <i>in silico</i>	20
3.2.9 Análise estatística	20
3.3 Análises de expressão gênica	21
3.3.1 Expressão gênica em células da glândula mamária.....	21
3.3.2 Expressão gênica no tecido muscular	22
3.3.3 Desenho de <i>primers</i>	22
3.3.4 PCR em tempo real.....	22
3.3.5 Teste de eficiência	23
3.3.6 Estabilidade de expressão dos genes de referência	23
3.3.7 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Polimorfismos no <i>locus PPARG</i>	25
4.2 Polimorfismos no <i>locus UCP2</i>	32
4.3 Polimorfismos no <i>locus LPL</i>	40
4.4 Polimorfismos no <i>locus SCD</i>	41
4.5 O Isolamento de RNA a partir das células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite	42
4.6 Expressão gênica no músculo <i>Longissimus lumborum</i>	45
4.6.1 Eficiência do <i>primers</i> utilizados	45
4.6.2 Avaliação da especificidade das reações e Ct médio	46
4.6.3 Genes de referência	46
4.6.4 Correlação da expressão gênica com as características fenotípicas avaliadas	48

4.6.5 Expressão gênica entre os grupos formados para cada uma das características avaliadas (FC, PA e PC).....	48
5 CONCLUSÕES	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, como parte da produção de leite de caprinos é voltada para a produção de derivados lácteos (PERDIGÃO; OLIVEIRA; CORDEIRO, 2016), a avaliação de parâmetros de qualidade como os teores de proteína e de gordura são fundamentais (PIRISI; LAURET; DUBEUF, 2007). Altos teores destes constituintes levam ao maior rendimento na produção de derivados lácteos como queijos, manteigas e creme de leite, sendo de grande interesse para a indústria, que visa manter o padrão de qualidade e aumentar a produção (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008). Se por um lado, a melhoria destas características interessa aos laticínios, por outro, é de interesse do produtor, o qual pode ser melhor remunerado pelo leite de melhor qualidade (PIRISI; LAURET; DUBEUF, 2007). Devido a isto, o aumento dos teores de gordura e de proteína do leite estão entre os objetivos de programas de melhoramento genético de animais leiteiros.

Os teores de proteína e de gordura são determinados por uma grande variedade de genes, entre eles, pode-se citar alguns genes conhecidos por sua utilização em programas de seleção assistida por marcadores em diversas espécies como: α_{S1} -Caseína, β -Caseína, Diacilglicerol acetil transferase-1 e β -Lactoglobulina, (MOIOLI; D'ANDREA; PILLA, 2007). Na França, por exemplo, a seleção de caprinos com alelos de maior produção para o gene da α_{S1} -caseína, por aproximadamente 20 anos, levou ao aumento no conteúdo de proteína (principalmente de caseína) e de gordura no leite, o que se refletiu positivamente na indústria de derivados (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008).

Além de genes que atuam diretamente na produção de componentes do leite, como os supracitados, existem outros *loci* que afetam a produção de maneira indireta. Uma das maneiras de encontrar estes *loci* é através da abordagem do gene candidato, que baseia-se na busca por polimorfismos em genes que, devido ao seu papel fisiológico, localização ou expressão diferencial, podem ter influência sobre uma característica alvo. Assim, ao invés de buscar mutações aleatoriamente no genoma inteiro, pode-se focar na busca por mutações em genes com potencial envolvimento na determinação da característica estudada (MOIOLI; D'ANDREA; PILLA, 2007).

Neste contexto, devido ao seu papel fisiológico, algumas proteínas podem estar envolvidas na síntese de gordura do leite. Entre elas, o Fator de Proliferação de Peroxissomos gama (PPAR- γ , do inglês: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gama*), fator de transcrição que ativa vias lipogênicas na glândula mamária (BIONAZ et al., 2013); a Proteína Desacopladora de Membrana 2 (UCP2, do inglês: *Uncoupling Protein 2*), envolvida na regulação do metabolismo celular (DIANO; HORVATH, 2012); a Lipoproteína Lipase (LPL) importante para a captação de ácidos graxos da corrente sanguínea (ZHAO et al., 2014); a Esteroil-CoA Desnaturase (SCD, do inglês: *Stearyl-CoA Desaturase*) envolvida na síntese de lipídios pela glândula mamária (BIONAZ; LOOR, 2008); e a Glicerol-3fosfato acetil transferase 4 (GPAT4), envolvida na síntese de triglicerídeos do leite (BEIGNEUX et al., 2006). Os genes que codificam estas proteínas são amplamente expressos pelo organismo, e mutações que ocorram neles podem alterar tanto sua expressão como a funcionalidade da proteína madura. Nestes casos, é possível que também ocorram alterações no metabolismo energético de tecidos e órgãos nos quais eles são expressos, mudanças estas que poderão se refletir na produção e qualidade do leite.

Para alguns desses genes, como *UCP2*, *LPL*, *SCD* e *GPAT4* já foram descritas mutações associadas com características de qualidade do leite em caprinos. No gene *LPL*, BADAQUI et al. (2007) avaliaram regiões codificantes em busca de polimorfismos, os autores encontraram diversos polimorfismos e demonstraram que o polimorfismo G50C apresenta associação com a porcentagem de gordura no leite. Em relação ao gene *UCP2*,

FERREIRA (2013) encontrou duas mutações na região 5' regulatória, neste caso, nenhuma das mutações apresentou associação com as características de produção e qualidade avaliadas. Porém, o número de animais utilizado no estudo foi pequeno, apenas 40 animais. Para o gene *SCD*, ZIDI et al. (2010) reportaram mutações que apresentam associação com o perfil de ácidos graxos do leite, entre elas uma *indel* de 3 pares de base na região 3' UTR. No gene *GPAT4*, BAGATOLI (2015) descreve associação de um polimorfismo com o valor genético dos animais para porcentagem de gordura. Já para o gene *PPARG*, não foram encontrados trabalhos que descrevam a existência polimorfismos em caprinos.

Assim, tendo em vista a busca por novos marcadores moleculares para a produção e qualidade do leite em caprinos, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a associação de polimorfismos nos genes *UCP2*, *LPL*, *SCD* e *PPARG* com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite. Objetivamos ainda, avaliar se, em células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite, a expressão dos genes *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4* varia entre os diferentes genótipos já descritos, e se variam também no decorrer lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A abordagem do gene candidato

As características quantitativas são controladas por diversos genes, juntamente com eles, por fatores ambientais. O resultado dessa interação é o fenótipo do animal. Embora o melhoramento de animais destinados à produção leiteira seja realizado principalmente através da mensuração do fenótipo, esse processo pode ser melhorado com a utilização de marcadores moleculares (WILLIAMS, 2005). Existem dois tipos de marcadores moleculares para serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores: marcadores diretos, mutações causativas ou variações funcionais diretamente responsáveis pela variação no fenótipo; e marcadores indiretos, mutações não causativas que estão em desequilíbrio de ligação com alguma mutação causativa. Para identificar estes marcadores pode-se realizar uma busca direta em genes candidatos, ou então, fazer uma varredura ampla no genoma (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

A estratégia de varredura ampla por marcadores, aposta na grande quantidade de mutações não funcionais existentes e procura por polimorfismos aleatoriamente. Com isto, espera-se que parte destas mutações encontradas estejam ligadas à mutações causativas, e assim, associadas à característica de interesse (ZHU; ZHAO, 2007). Já a abordagem do gene candidato, pressupõe que grande parte da variação fenotípica de uma característica quantitativa ocorre devido a polimorfismos funcionais em determinado gene e concentra a busca por polimorfismos em genes com grande potencial para afetar a característica alvo. Por isto, os genes candidatos são, geralmente, genes com função biológica conhecida, que de maneira direta ou indireta tenham grande contribuição na determinação da característica investigada (ROTHSCHILD; SOLLER, 1997). Por isto, esta abordagem pode ser bem eficiente em localizar marcadores que estejam estritamente ligados a mutações causativas ou então que ocasionalmente representem variações funcionais no genoma, embora estas últimas sejam difíceis de serem comprovadas. Além disso, uma vantagem da busca por marcadores em genes candidatos é que esta abordagem também é capaz de detectar mutações que apresentam pequena contribuição para característica em questão (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

Como a escolha de um gene candidato depende de informações a respeito da função biológica de genes, a ausência de conhecimento sobre os mecanismos biológicos determinantes de uma característica fenotípica é um fator limitante na escolha. Para contornar tais limitações, foram desenvolvidas algumas metodologias que podem ser utilizadas para selecionar esses genes candidatos. Nos casos em que a função biológica do gene é conhecida, ela pode ser levada em consideração. Nos casos em que a função dele ainda é pouco conhecida, uma abordagem utilizada é a identificação de genes que tem variação na expressão em diferentes estágios biológicos do organismo ou em linhagens genéticas contrastantes. Outra abordagem é a escolha de genes baseada na sua localização no genoma. Genes que estão localizados em QTLs (QTLs, do inglês: *Quantitative trait loci*) que conhecidamente afetam a característica alvo, têm maior probabilidade de conter marcadores diretos ou indiretos que estão associados a ela. Também pode ser utilizada uma comparação entre genomas diferentes. Nesta abordagem, vale-se do fato de que a função de alguns genes é conservada em diferentes espécies. Assim, pode-se utilizar genes que são conhecidos por alterar a característica alvo em outras espécies, como em organismos modelo, que possuem um número muito maior de informações, e extrapolar esta função para a espécie em estudo. Um exemplo desta abordagem, é a utilização de modelos animais para identificar genes responsáveis por doenças genéticas em humanos (ZHU; ZHAO, 2007).

Atualmente, ainda é impossível determinar todos os genes e mutações que influenciam as características quantitativas. Porém, a utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento já é uma realidade. Por isto, se faz necessária a identificação de mais marcadores associados às características de interesse e a abordagem do gene candidato é uma potente ferramenta que pode ser utilizada na busca destes marcadores. Neste trabalho, optamos por buscar polimorfismos em alguns genes candidatos associados ao metabolismo energético e avaliar a associação destes polimorfismos com o valor genético dos animais para as características de produção e qualidade do leite. Os genes candidatos que serão utilizados, bem como a função resumida da proteína codificada por cada um dos genes, pode ser encontrada na Tabela 1. Mais informações sobre cada um deles poderão ser encontradas no decorrer desta revisão de literatura.

Tabela 1. Tabela com os genes candidatos utilizados no presente trabalho e com o resumo da função da proteína sintetizada por cada um deles.

Gene	Função
<i>PPARG</i>	Fator de transcrição que ativa vias lipogênicas intracelulares.
<i>UCP2</i>	Reduz o gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial interna sem que ocorra a produção de ATP, o que altera a razão ATP/ADP intracelular e a produção de espécies reativas de oxigênio.
<i>LPL</i>	Hidrolisa triglicerídeos a ácidos graxos livres e glicerol no lúmen dos vasos capilares o que permite a entrada dos ácidos graxos na célula.
<i>SCD</i>	Catalisa a insaturação de ácidos graxos, principalmente de ácidos graxos com cadeias de 16 e 18 carbonos, passo importante para a síntese de triglicerídeos.
<i>GPAT4</i>	Catalisa a primeira reação de formação de triglicerídeos, a ligação do glicerol-3-fosfato com o de acil-CoA.

2.2 Fator de proliferação de peroxissomos γ (PPAR- γ)

Os PPARs foram inicialmente descritos em rãs do gênero *Xenopus* como novos membros da família de receptores nucleares capazes de induzir a proliferação de peroxissomos. O PPAR- α foi o primeiro PPAR a ser descrito em mamíferos, sua descoberta veio a partir do trabalho de ISSEMANN; GREEN, (1990), quando esses pesquisadores, na busca de fármacos que visassem reduzir os níveis sanguíneos de triglicerídeos e de colesterol, procuravam por alvos moleculares que ativassem a proliferação de peroxissomos no fígado. Pouco tempo depois da descoberta do PPAR- α foram descritos as outras duas isoformas o PPAR- γ e o PPAR- β/δ (DREYER et al., 1992; KLIEWER et al., 1994).

Conforme revisado por PETERS; SHAH; GONZALEZ, (2012), os PPARs funcionam como fatores de transcrição dependentes de ligantes e utilizam elementos responsivos no DNA para desempenhar suas funções. Eles são intermediários dos efeitos de pequenas moléculas lipofílicas, como ácidos graxos de cadeia longa, em genes denominados genes alvo de PPAR. De maneira simplificada, após a ligação com algum de seus ligantes, ocorre uma dimerização do PPAR com o receptor X retinóide (RXR), esse dímero protéico então migra para o núcleo celular. No núcleo, o complexo pode recrutar co-fatores que recrutarão moléculas ativadoras, ou repressoras, da transcrição gênica (PETERS; SHAH; GONZALEZ (2012).

Os genes alvo dos PPARs apresentam na sua região promotora sequências específicas de ligação desses receptores nucleares, denominados elementos responsivos aos PPARs (PPREs, do inglês: *Peroxisome proliferator response elements*). Essas sequências são constituídas por duas repetições de seis nucleotídeos, geralmente AGGTCA, separadas por um ou dois nucleotídeos. Dependendo do número de nucleotídeos que separam essas sequências, 1 ou 2, os PPREs são classificados como DR1 ou DR2, respectivamente (DESVERGNE;

MICHALIK; WAHLI, 2006; FUCCI et al., 2012; HUANG; CHANDRA; RASTINEJAD, 2010).

Pouco tempo após a descoberta do PPAR- α , pesquisadores identificaram outros dois PPARs, um dos quais é o PPAR- γ (DREYER et al., 1992; KLIEWER et al., 1994). Em diversas espécies, principalmente de não-ruminantes, um número cada vez maior de evidências indica que este fator de transcrição participa de uma enorme gama de processos celulares. Por exemplo, o PPAR- γ é apontado como o principal fator responsável pela diferenciação de adipócitos (TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994) e é importante na regulação do metabolismo nos adipócitos maduros (LEHRKE; LAZAR, 2005). Atua também sobre o metabolismo de lipídios e de glicose, principalmente por funcionar como um sensibilizador das células à insulina (HE et al., 2003; HEVENER et al., 2003; MATSUSUE et al., 2003). Nas células do sistema imunológico ele é um regulador importante do metabolismo energético celular e do processo inflamatório (LI; PASCUAL; GLASS, 2000; WELCH et al., 2003; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003). Também é apontado como uma proteína importante na supressão de alguns tipos de células cancerígenas (GROMMES; LANDRETH; HENEKA, 2004).

Em humanos, assim como em bovinos, o PPAR- γ apresenta-se em duas isoformas diferentes, ambas tecido específico. O PPAR- γ 2 difere do PPAR- γ 1 pela adição de 30 aminoácidos na região N-terminal (SUNDEVOLD; GRINDFLEK; LIEN, 2001; ZHU et al., 1995). Em humanos, o PPAR- γ 1 é expresso abundantemente no tecido adiposo e no intestino grosso, em menor proporção nos rins e em níveis menores no fígado, músculo esquelético e intestino delgado. Já o PPAR- γ 2 é quase que exclusivamente expresso no tecido adiposo e em proporções menores do que o PPAR- γ 1 (AUBOEUF et al., 1997; FAJAS et al., 1997).

Em ruminantes, BIONAZ et al., (2013) avaliou a distribuição da expressão do gene que codifica o PPAR- γ (*PPARG*) entre diversos tecidos de bovinos através da técnica de PCR em tempo real. A partir dos dados obtidos por estes autores, é possível observar que, da mesma maneira que em não ruminantes, em bovinos, o gene *PPARG* é expresso em maiores proporções no tecido adiposo. Também é expresso em abundância no rúmen, células da linhagem *Madin-darby bovine kidney* (células MBDK), e na placenta. Sua expressão é moderadamente baixa no intestino delgado, músculo *longissimus lumborum* de gado de corte, pulmões e glândula mamária. Sua expressão é baixa no fígado, rins, músculo semitendinoso de gado leiteiro, células alveolares mamárias bovinas (MAC-T) e em leucócitos polimorfonucleares (Figura 1).

Durante o parto a expressão do *PPARG* na glândula mamária de vacas leiteiras é bastante baixa. Apesar da pequena quantidade, no início da lactação a expressão aumenta de maneira abrupta durante os primeiros 15 dias pós-parto. Depois disso, ela permanece elevada até os 240 dias de lactação. Por este motivo, embora expresso em pequena quantidade, esse aumento da expressão que ocorre com o início da lactação é indicativo da participação deste receptor nuclear na síntese do leite (BIONAZ; LOOR, 2008).

Ao contrário do que ocorre com a expressão na glândula mamária. No tecido adiposo, após o início da lactação a expressão do *PPARG* diminuí de maneira moderada até os 56 dias pós-parto. Um dos prováveis motivos desta diminuição é que o PPAR- γ não é importante apenas para a síntese de triglicerídeos, mas também para a diferenciação de adipócitos (TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994). Logo, essa diminuição da expressão é esperada, uma vez que durante este período o tecido adiposo perde grande quantidade de triglicerídeos e adipócitos. É interessante notar que quanto maior o valor genético para a produção de leite, mais acentuada e maior será a redução da expressão do *PPARG* no tecido adiposo. O que condiz com a premissa de que animais com maior mérito genético para a produção de leite apresentam maiores taxas lipolíticas (KHAN et al., 2013).

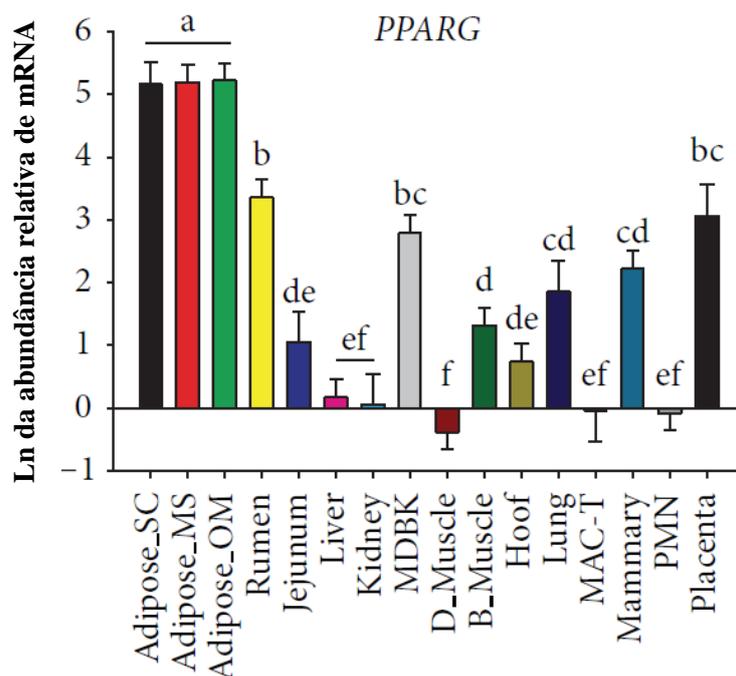


Figura 1. Expressão do *PPARG* em 14 tipos diferentes de tecidos bovinos. Tecido adiposo sub-cutâneo, mesentérico e omental (*Adipose_SC*, *_MS*, *_OM*), rúmen (*rumen*), jejuno (*Jejunum*), fígado (*liver*), rim (*kidney*), *darby bovine kidney cells* (MDBK), músculo *longissimus* (*B_muscle*), músculo semitendinoso (*D_muscle*), Corium do casco (*hoof*), pulmão (*lung*), *bovine mammary alveolar cells* (MAC-T), glândula mamária (*mammary*), *blood polymorphonuclear leukocytes* (PMN), placenta (BIONAZ et al., 2013).

Atualmente muitos trabalhos demonstram o papel fundamental do PPAR- γ na adipogênese. TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, (1994) descobriram que a ativação do PPAR- γ por si só já é capaz de promover a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. Posteriormente, descobriu-se que camundongos *knockout* para o gene *PPARG* (*PPARG*^{-/-}) não são viáveis, pois morrem na fase embrionária (BARAK et al., 1999). Por este motivo, ROSEN et al. (1999) produziram quimeras de animais selvagens (*PPARG*^{+/+}) com animais *knockout* e observaram que todos os adipócitos presentes nestes animais apresentavam genótipo selvagem, o que evidencia o papel essencial deste fator de transcrição para o desenvolvimento destas células.

Em ruminantes, tanto em ovinos (SORET et al., 1999) como em bovinos (GARCÍA-ROJAS et al., 2010), agonistas endógenos e sintéticos do PPAR- γ induzem a diferenciação de adipócitos em cultura celular. O que demonstra que nessas espécies esses fatores de transcrição também têm papel fundamental na adipogênese. Esses resultados são reforçados pelo trabalho de LIM et al. (2011) a partir do qual, pode-se concluir que o *PPARG* é um gene candidato para o marmoreio de carne em bovinos de corte.

A função do PPAR- γ na glândula mamária talvez seja a mais estudada em ruminantes. Algumas evidências, principalmente relacionadas à expressão do *PPARG* e da rede de genes controlada por este fator de transcrição, apontam que a síntese de gordura neste órgão parece ser controlada, pelo menos em parte, por este receptor nuclear. Por exemplo, o tratamento de células MAC-T com rosiglitazona, potente agonista sintético do PPAR- γ , estimula a transcrição de genes alvo do PPAR- γ relacionados à importação de ácidos graxos (*CD36*), à síntese de ácidos graxos (*ACACA*, *FASN*, *SREBF1*) e à síntese de triglicerídeos (*LPIN1* e

SCD) (KADEGOWDA et al., 2009). Somado a isso, ocorre o aumento na expressão deste gene entre o período seco e o período de lactação (BIONAZ; LOOR, 2008). Outro trabalho, este em caprinos, mostrou que a superexpressão do *PPARG* leva ao aumento no acúmulo de lipídios em células epiteliais da glândula mamária de caprinos. Acredita-se que parte deste acúmulo ocorreu devido ao aumento da expressão que o PPAR- γ provoca no gene da perilina 2 (*PLIN2*) (KANG et al., 2015).

Ainda neste contexto, em células MAC-T, a ativação do PPAR- γ leva ao aumento na expressão do *SREBF1*. Este gene codifica o ligante do elemento regulatório de esteróis 1 (SREBF 1, do inglês: *Sterol regulatory element binding factor 1*), um fator de transcrição que também regula a expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pela síntese de ácidos graxos e de triglicerídeos (BIONAZ; LOOR, 2008). Alguns autores apontam esta proteína como o principal fator responsável pela produção de ácidos graxos na glândula mamária (BAUMAN; HARVATINE; LOCK, 2011; LI et al., 2014). Um dos fatores que pesam neste sentido é a redução da sua expressão e da sua atividade que ocorre quando as células são expostas a *trans10, c12-CLA*, um dos ácidos graxos responsáveis pela síndrome de depressão na produção de gordura do leite (BAUMGARD et al., 2002). De maneira geral, em células MAC-T a expressão deste gene é estimulada pelo PPAR- γ (BIONAZ; LOOR, 2008) enquanto que em cultura de células epiteliais da glândula mamária de vacas leiteiras o *SREBF1* têm efeito inibitório sobre a expressão do *PPARG* (LI et al., 2014). Ainda há dissidências na literatura à respeito de qual desses fatores têm papel mais importante na síntese do leite, encontradas principalmente em dois trabalhos: BAUMAN; HARVATINE; LOCK (2011) e BIONAZ et al. (2013). Aparentemente os dois fatores têm grande contribuição e estudos futuros podem detalhar o papel de cada um deles e ajudar a entender seus efeitos regulatórios na glândula mamária.

Tendo em vista que o PPAR- γ controla a expressão de uma série de genes alvo em diversos tecidos e órgãos, este fator de transcrição é fundamental no controle do metabolismo de animais lactantes. Neste ponto, identificar polimorfismos funcionais neste gene pode auxiliar na seleção de animais com maior potencial para a produção de leite e de seus constituintes.

2.2.1 Polimorfismos no gene *PPARG* e a produção animal.

Em ruminantes são poucos os trabalhos que buscaram polimorfismos no gene *PPARG* e avaliaram sua associação com características fenotípicas economicamente importantes. Em bovinos de três raças chinesas diferentes, Qinchuan, Nanyang e Jiaxian, HUA et al. (2011), ao avaliar o éxon 1 deste gene encontraram 4 SNPs, denominados pelos autores como 110G>C, -27C>T, +20A>G, +1344G>T. Três destas mutações, que estão localizadas no éxon 1, -110G>C, -27C>T e +20A>G, encontram-se em desequilíbrio de ligação e estão associadas ao tamanho dos animais. Ainda com raças chinesas de bovinos, FAN et al. (2011) descobriu que o polimorfismo 42895C>T apresenta associação com maciez da carne e que o polimorfismo 72472G>T apresenta associação com cobertura de gordura. Em outro trabalho, OH et al. (2012) também encontraram associação do polimorfismo 72472G>T, com a quantidade de ácidos graxos saturados e monoinsaturados da carne.

LEE et al. (2016) descreveram 38 SNPs no gene *PPARG* de bovinos de raças coreanas e avaliaram sua associação com características de qualidade de carcaça e com o perfil de ácidos graxos do músculo *longissimus*. Esses autores observaram que, dois destes SNPs, g.1159-71208A>G, localizado no íntron 1 e g.42555-29812G>A, localizado no íntron 4, apresentam associação com teor de ácidos graxos monoinsaturados na carne. Sendo que os genótipos AA, do polimorfismo do íntron 1, e GG, do polimorfismo do íntron 4, favorecem a presença de ácidos graxos monoinsaturados. Além disto, estes autores também descobriram

que o genótipo GG para o SNP g.72362G>T, localizado no éxon 7, esta associado com maior quantidade de gordura intramuscular. Nenhum trabalho que descreva polimorfismos no gene *PPARG* de caprinos foi encontrado na revisão de literatura realizada.

2.3 Proteína desacopladora de membrana 2 (UCP2)

São nas mitocôndrias que o processo de respiração celular ocorre. Estas organelas possuem dois compartimentos que são limitados por duas membranas, a membrana mitocondrial interna e a membrana mitocondrial externa. A membrana externa envolve toda a organela e é permeável a íons e a pequenas moléculas de até 5000 Da. A membrana interna é a que envolve a matriz mitocondrial, e o transporte de íons e metabólitos através dela é controlado para manter o gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP. O compartimento que fica entre estas duas membranas é o espaço intermembranário. Localizadas nas cristas da membrana mitocondrial interna, as proteínas da cadeia transportadora de elétrons transportam prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranário, o que cria um gradiente eletroquímico nesta membrana. Estes prótons retornam para a matriz mitocondrial através da enzima ATP sintetase, que utiliza esta força eletromotriz para produzir ATP. Embora o processo de fosforilação oxidativa seja geralmente acoplado à produção de ATP, essa relação não é sempre perfeita pois pode ocorrer o vazamento de prótons para matriz mitocondrial através de outras proteínas transportadoras de membrana (ALBERTS et al., 2002).

As proteínas desacopladoras de membrana, são transportadores de membrana bastante peculiares. Essas proteínas transportam prótons do espaço intermembranário para a matriz mitocondrial e produzem calor ao invés de ATP. Com isso, o gradiente eletroquímico da membrana e a produção de ATP são alterados, pois parte da energia é perdida na forma de calor (KRAUSS; ZHANG; LOWELL, 2005). Desta maneira, as proteínas desacopladoras de membrana podem controlar o grau de atrelamento entre o transporte de elétrons para o espaço intermembranário e a produção de ATP (ROUSSET et al., 2004).

A primeira proteína desta família a ser descoberta foi a UCP1, presente nas mitocôndrias do tecido adiposo marrom de mamíferos, ela é responsável pela característica termogênica que este tecido apresenta. Posteriormente a ela, outras UCPs foram descritas e atualmente, em mamíferos, são conhecidas cinco proteínas pertencentes a esta família: A UCP1 que está presente no tecido adiposo marrom; a UCP2, amplamente expressa pelo organismo; a UCP3 expressa majoritariamente no músculo estriado esquelético e as UCPs 4 e 5 expressas no sistema nervoso central. Dentre elas, maior atenção têm sido dada às UCPs 1, 2 e 3 pois existem evidências que apontam papel importante destas proteínas no metabolismo energético (BUSIELLO; SAVARESE; LOMBARDI, 2015).

Enquanto a UCP1 esta diretamente envolvida com a regulação da termogênese, a UCP2 aparenta ter um importante papel na diminuição da produção de espécies reativas e oxigênio (ROS) (GARLID; JABUREK; JEZEK, 1998). Produzidas principalmente nas mitocôndrias, essas moléculas citotóxicas provocam danos em diversos componentes celulares, e quando em excesso podem levar até à apoptose.

Nas mitocôndrias, as enzimas da cadeia transportadora de elétrons são os maiores contribuintes desta produção. Isto ocorre, pois a passagem de elétron do Ubiquinol (Ubiquinona reduzida, Qh2) para o complexo III e a passagem de elétrons do complexo I para o Ubiquinol envolvem o radical semiquinona ($Q\cdot$) como intermediário, o que pode, com uma pequena probabilidade, passar elétrons para O_2 produzindo $O_2\cdot^-$, radical bastante reativo que pode levar a formação de um radical ainda mais reativo $OH\cdot$. Na mitocôndria ativa, de 0,1 a 4% do oxigênio consumido pela respiração pode formar ROS, quantidade suficiente para causar efeitos letais na célula. Fatores que retardam o fluxo de elétrons pela cadeia

respiratória, aumentam a formação desses superóxidos, provavelmente por aumentar a meia vida do O_2^- gerado no ciclo da Ubiquinona. Por este motivo, um gradiente excessivo de prótons na membrana aumenta a produção de ROS pelas mitocôndrias (NELSON; COX, 2008). Em determinados momentos, por vazarem prótons para a matriz mitocondrial e assim reduzir o gradiente da membrana, a ativação da UCP2 pode mitigar a produção de ROS sem cessar a produção de ATP ao mesmo tempo em que aumenta a respiração celular (BRAND; ESTEVES, 2005).

O gene que codifica a *UCP2* é amplamente expresso no organismo e foi detectado em quase todos os tecidos (RUPPRECHT et al., 2012). Apesar da *UCP2* estar localizada na mitocôndria, o gene que a codifica é um gene autossômico, e em caprinos, está localizado no cromossomo 15. A estrutura do código genético da *UCP2* foi revisada por LEDESMA; DE LACOPA; RIAL (2002). O gene *UCP2* possui oito éxons. Destes oito, os dois primeiros codificam a região 5' UTR, enquanto que os últimos seis codificam a proteína. Conforme revisado por DONADELLI et al. (2014), na região promotora do gene *UCP2* ocorre a presença de sítios de ligação para diversos fatores de transcrição entre eles: *specific protein-1* (SP-1), *sterol regulatory elements* (SRE), *thyroid hormone response elements* (TER) e o E-box (*Helix-loop-helix protein binding sites*). Existe ainda no gene *UCP2* uma particularidade. Além da matriz aberta de leitura (ORF; do inglês, *open reading frame*) que codifica a *UCP2*, na região 5'UTR deste gene, existe uma pequena ORF que codifica um pequeno peptídeo de 36 aminoácidos, essencial na regulação do processo de tradução (PECQUEUR et al., 2001). Apesar da tradução deste peptídeo ainda não ter sido comprovada, sabe-se que esta pequena região tem efeito inibitório sobre a tradução da *UCP2*. Estudos com mutagênese sítio dirigida realizados por HURTAUD et al. (2006), demonstraram que a região 3' desta pequena ORF é o principal contribuinte deste papel inibitório. Em um outro trabalho os autores também demonstraram que a expressão do gene *UCP2* é estimulada pela glutamina e que a parte traducional deste controle é realizada através desta ORF (HURTAUD et al., 2007).

Devido à importância da UCP1 na manutenção da temperatura corporal, quando a *UCP2* foi descoberta, também acreditou-se que esta proteína estaria envolvida na regulação da termogênese basal (FLEURY et al., 1997). Porém, camundongos *knockout* para o gene *UCP2* quando expostos ao frio (5°C por até 24 h) apresentam redução na temperatura corporal similar à de camundongos que apresentam o gene íntegro (ARSENIJEVIC et al., 2000). Além disso, em estudos com estes modelos animais também não foram encontradas diferenças na termogênese adaptativa dos animais ao frio (4°C) nem foram observadas diferenças em relação à massa corporal.

A *UCP2* é bastante instável e apresenta meia-vida de 30 min, bem diferente da meia-vida da *UCP1* que é de 30 h. A curta meia vida da *UCP2* é pequena até mesmo em comparação com outros carreadores de membrana mitocondriais, que geralmente apresentam meia-vida média de 10 h. Por isto, acredita-se que a *UCP2* possa ser um regulador de respostas biológicas rápidas no organismo, o que fica evidente ao analisar seu papel sobre a secreção de insulina dependente de glicose (SIDG) (DONADELLI et al., 2014).

Células β -pancreáticas são as produtoras de insulina do organismo e monitoram a glicemia através da razão ATP/ADP intracelular. A glicose transportada para o interior da célula é oxidada e leva ao aumento do gradiente eletroquímico da membrana interna e da razão ATP/ADP intracelular. Em resposta a isto, ocorre o fechamento de canais de potássio sensíveis a ATP, a despolarização da membrana celular, a abertura de canais de cálcio, a entrada de cálcio na célula e por fim a exocitose dos grânulos de insulina. Desta maneira, nos casos em que a glicemia está elevada, ocorre a maior produção de ATP, a razão ATP/ADP aumenta e ocorre a secreção de insulina. Nos casos em que esta razão diminui a secreção de

insulina é inibida (RUTTER, 2001). Desta maneira, por provocar o vazamento de prótons e reduzir a produção de ATP, a UCP2 pode interferir na sensibilidade das células β -pancreáticas à glicose e como consequência reduzir a liberação de insulina. (AFFOURTIT; BRAND, 2008). Neste sentido, foi observado que ilhotas pancreáticas de camundongos *knockout* para o gene *UCP2*, têm maiores níveis de ATP e aumento na secreção de insulina dependente de glicose quando comparados a animais selvagens (PI; COLLINS, 2010; ZHANG et al., 2001).

Outro efeito importante da UCP2 no organismo pode ser observado no tecido adiposo. O tecido adiposo branco tem papel fundamental na fisiologia dos mamíferos. A visão clássica é de que esse tecido é responsável pela reserva de “combustível”, podendo ser utilizado em períodos de balanço energético negativo (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). A capacidade endócrina deste tecido foi descoberta através da leptina (ZHANG et al., 1994), um hormônio secretado, principalmente, a partir de adipócitos, com ações no sistema nervoso central e em órgãos periféricos. A leptina não é, contudo, a única proteína secretada pelo tecido adiposo branco. A adiponectina é uma proteína de aproximadamente 30K-Da com características de uma molécula sinalizadora também encontrada em adipócitos do tecido adiposo branco. Esta adipocitocina é de extrema importância para o organismo, pois aumenta a sensibilidade de diversos tecidos à insulina (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996).

A regulação da expressão da adiponectina envolve a Proteína Homóloga a *C/EBP* (CHOP-10), que atua como inibidor da transcrição do gene da adiponectina por inibir a ligação do fator de transcrição da *C/EBP* (*CCAAT-enhancer-binding protein*) neste gene. Na presença de níveis elevados de ROS os níveis de CHOP-10 também aumentam o que reduz a produção de adiponectina nos adipócitos. Desta maneira, a produção de adiponectina pelo tecido adiposo pode ser regulada também pela atividade da UCP2 através da diminuição na produção de ROS, o que favorece a produção desta adipocitocina e dirige o organismo a um quadro de sensibilização aos efeitos da insulina (CHEVILLOTTE et al., 2007).

A ampla expressão da UCP2 e os diversos estudos com animais *knockout* apontam seu papel central sobre diversos processos celulares que vão desde a secreção de insulina até o controle de ROS, e demonstram a sua importância para o bom funcionamento dos processos homeostáticos. Por esses motivos, o gene *UCP2* é um gene candidato interessante e mutações funcionais neste gene podem estar associadas a características de produção e composição do leite em animais leiteiros.

2.3.1 Polimorfismos no gene *UCP2* e a produção animal

Embora os estudos sejam escassos, polimorfismos no gene *UCP2* foram descritos para algumas espécies de ruminantes e apresentam associação com características economicamente importantes. SHERMAN et al. (2008) avaliaram a existência de polimorfismos no gene *UCP2* de bovinos taurinos e encontraram associação de uma transição G/A, no éxon 4, com o rendimento de carne magra. Ainda em trabalho com bovinos, CLEMPSON et al., (2011) avaliaram um SNP G/C na região promotora do gene *UCP2*. Na população avaliada, estes autores encontraram apenas animais com genótipos GG e CG, sendo os heterozigotos apenas 6% da população. Para esta mutação, os animais heterozigotos são maiores quando novilhas, apresentam menor idade à primeira concepção e demoram mais tempo para retomar a ciclicidade. Em bovinos da raça Qinchuan o SNP g.C754G, localizado na região 5'UTR, apresenta associação com espessura de gordura, área de olho do lombo e com gordura intramuscular. Neste caso, o genótipo GG apresentou médias superiores para todas as características (WANG et al., 2016). Em caprinos, FERREIRA, (2013) descreve dois polimorfismos neste gene, um localizado na região promotora e outro no éxon 2. Apesar do pequeno número de animais (apenas 40), foram realizadas análises de associação dos

polimorfismos com o valor genético dos animais para características de qualidade do leite, porém, nenhuma associação foi encontrada.

2.4 Lipoproteína lipase (LPL)

A lipoproteína lipase (LPL) (HAVEL; GORDON, 1960) localiza-se nas células endoteliais dos vasos capilares e atua no lúmen desses vasos. Na presença da apolipoproteína CII, esta enzima captura as lipoproteínas do sangue e hidrolisa seus triglicerídeos em ácidos graxos livres e 2-monoacilglicerol (SCANU, 1966). Após hidrólise, as moléculas de 2-monoacilglicerol e os ácidos graxos entram nas células (CRYER, 1981) e ficam disponíveis para diversas vias metabólicas (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002), como a reesterificação e a beta-oxidação (CRYER, 1981).

De acordo com a sequência disponível no GenBank (NC_030815.1), em caprinos este gene está localizado no cromossomo 8 e possui tamanho de 25342 pb. MEAD; IRVINE; RAMJI (2002) revisaram a estrutura do gene que codifica a LPL (*LPL*) em diversas espécies. De acordo com os autores, o gene é composto por 10 éxons que são separados por nove íntrons. O éxon 1 codifica a extremidade 5' UTR enquanto que o éxon 10, codifica a extremidade 3' UTR. A matriz aberta de leitura deste gene codifica um peptídeo de 478 aminoácidos, com peso molecular de 53,4 KDa e ponto isoelétrico de aproximadamente 8,71. Ainda, nesta sequência, análises *in silico* apontam que existe entre o aminoácido 23 e 24 a ocorrência de um ponto de clivagem do peptídeo sinal. Dessa maneira, é provável que a forma ativa desta enzima apresente 455 aminoácidos (QIN et al., 2012).

Com o intuito de identificar a função desta proteína no organismo, pesquisadores realizaram alguns trabalhos com modelos animais, os quais podem ser encontrados na revisão realizada por GOLDBERG; MERKEL (2001). Camundongos com a deficiência combinada das lipases (*cld/cld*), bem como camundongos homocigotos para deficiência do gene *LPL* de duas linhagens diferentes apresentam quilomicronemia severa, redução no colesterol HDL e os neonatos só sobrevivem por dois ou três dias. O aparente motivo da morte é uma deficiência em algum substrato de energia no fígado e os animais morrem de hipoglicemia. De maneira semelhante aos camundongos, gatos deficientes para o gene *LPL* também apresentam baixa quilomicronemia, baixas taxas de crescimento e menor massa corporal. Porém, os gatos, assim como humanos, conseguem sobreviver até a fase adulta. Um estudo interessante foi realizado por WANG et al., (2011), esses autores produziram uma linhagem de camundongos incapaz de expressar o gene *LPL* no sistema nervoso central. Esses animais apresentaram hiperfagia e redução no gasto de energia. Além disso, os animais também apresentaram quadro de obesidade, mesmo com dietas pouco calóricas. KIM et al., (2001) ao estudarem a superexpressão hepática do gene *LPL* em ratos, verificaram a ocorrência de quadro de resistência a insulina no fígado e também de acúmulo de triglicerídeos neste órgão.

2.4.1 Polimorfismos no gene *LPL* e a produção animal

Por prejudicar o metabolismo lipídico e agravar a resistência à insulina típica do período inicial da lactação, é possível que alterações suaves na expressão deste gene ou na atividade da proteína codificada por ele, possam afetar características comercialmente importantes em ruminantes. Neste sentido, alguns trabalhos avaliaram a ocorrência de associação entre polimorfismos neste gene e essas características. Em bovinos da raça Hanwoo, OH et al. (2013), identificaram associação de três polimorfismos, o c.322G>A, no éxon 2, o c.329A>T, no éxon 3 e o c.1591G>A, no éxon 9, com a quantidade de ácidos graxos monossaturados no músculo *longissimus dorsi*. Em caprinos da raça Murciano Granadina, BADAOUY et al. (2007), encontraram dois polimorfismos, o G50C, que leva a uma alteração de aminoácido na posição 17 do peptídeo sinal, e o polimorfismo C2049T, uma substituição

na região 3' UTR. A partir das análises de associação, esses autores observaram que o polimorfismo G50C afeta o teor de gordura do leite. Em outro trabalho com caprinos de diversas raças, LING et al. (2015), encontraram, por SSCP, três polimorfismos: um no éxon 1, um no éxon 6 e um no éxon 7. Embora os autores não tenham realizado o sequenciamento destas amostras, eles observaram que os três polimorfismos estão associados com a quantidade de gordura intramuscular.

2.5 Stearoyl CoA desaturase (delta-9-desaturase)

A *Stearoil CoA desaturase* (SCD) catalisa a biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados a partir de ácidos graxos saturados. Ela insere uma dupla ligação *cis* entre os carbonos nove e dez de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa, transformando-os em insaturados (HEINEMANN; OZOLS, 2003; MIYAZAKI et al., 2003). Os substratos pelos quais ela apresenta maior afinidade são os palmotoil-CoA e stearoil-CoA, que são convertidos em palmitoleil-CoA e oleil-CoA, respectivamente (ENOCH; CATALÁ; STRITTMATTER, 1976). Os dois produtos dessa reação são os ácidos graxos monoinsaturados mais abundantes em mamíferos e são utilizados como substrato para a síntese de diversas moléculas lipídicas como fosfolipídios, triglicerídeos, ésteres de colesterol e alquildiacilgliceróis (BRADLEY; FISHER; MARATOS-FLIER, 2008; YONEZAWA et al., 2008).

O gene *SCD* em caprinos foi bem caracterizado por BERNARD et al. (2001). Análises de *Northen-blot* realizadas por estes autores demonstram que diferentemente do que ocorre em humanos e camundongos, na glândula mamária de caprinos, bovinos e ovinos, ocorre a presença de apenas uma isoforma do transcrito deste gene. O gene *SCD* caprino apresenta tamanho de aproximadamente 15 Kb, está localizado no braço longo do cromossomo 26 e apresenta cinco íntrons e seis éxons. Seu transcrito possui 5,1 Kb e uma matriz aberta de leitura de 1080 pb, que codifica 359 aminoácidos. Semelhante ao que ocorre em humanos e camundongos, em caprinos, o transcrito deste gene também apresenta uma longa região 3' UTR de aproximadamente 3,8 Kb.

A SCD apresenta peso molecular de 37 KDa e, na célula, fica localizada no retículo endoplasmático. Ela possui quatro domínios transmembranários com as duas extremidades, C-terminal e N-terminal, voltadas para o citosol. A única alça citoplasmática da enzima é a extremidade C-terminal, que contém oito histidinas que formam uma Hi-box, estrutura que realiza a ligação do íon de ferro com o centro catalítico da enzima NAD(P)-citocromo *b5* redutase, processo essencial para que o complexo enzimático seja capaz de introduzir as duplas ligações nas moléculas de ácidos graxos.

Apesar da reação catalisada por esta enzima ser a insaturação de ácidos graxos, hoje em dia sabe-se que ela é essencial na síntese de lipídios em mamíferos. Evidências do seu envolvimento no metabolismo de lipídios surgiram a partir de alguns trabalhos com animais *knockout* para o gene que a codifica (*SCD*). Camundongos *knockout* para este gene (*SCD*^{-/-}) são residentes à obesidade induzida pela alimentação, apresentam menor acúmulo de gordura corporal, maior sensibilidade à insulina e menor ganho de peso induzido pela alimentação (NTAMBI et al., 2002). Além disso, camundongos *SCD*^{-/-} são hipermetabólicos e apresentam aumento na expressão de diversos genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos enquanto que genes importantes para a síntese de lipídios tem sua expressão reprimida (NTAMBI et al., 2002).

Embora por motivos ainda não elucidados, existem fortes evidências que apontam que a atividade da SCD é essencial para que ocorra a síntese de triglicerídeos e de ésteres de colesterol (PATON; NTAMBI, 2009). Conforme revisado por NTAMBI; MIYAZAKI (2004), um dos fatores que comprovam esta teoria vem de estudos com camundongos da linhagem assebia (*ab*^j *ab*^{2j}), animais que apresentam mutações naturais no gene *SCD*, e de

animais $SCD^{-/-}$. Com estes trabalhos pesquisadores observaram que a expressão do gene *SCD* é essencial para a síntese de uma gama de lipídios que incluem triglicerídeos, ésteres de colesterol, alquil diacilgliceróis e ésteres de cera. Animais $SCD^{-/-}$ apresentam deficiência hepática de ésteres de colesterol e de triglicerídeos, mesmo na presença das enzimas Diacilglicerol Acetiltransferase (DGAT) e acil-coa acetiltransferase (ACAT), responsáveis por sua produção. Além disto, estes animais apresentam níveis reduzidos de ácido palmitoleico e de ácido oleico. De acordo com PATON; NTAMBI (2009), uma possível explicação para este fato pode ser que a presença de ácidos graxos monoinsaturados próximos a enzimas como a DGAT, ACAT e as GPAT seja necessária para que elas catalisem a formação de triglicerídeos e de colesterol.

2.5.1 Polimorfismos no Gene *SCD* e a produção animal

Devido a sua relação com a síntese de lipídios, diversos trabalhos têm demonstrado associação de polimorfismos neste gene com o teor de gordura e perfil de ácidos graxos no leite. Em bovinos TANIGUCHI et al. (2004) encontraram três SNPs no éxon 5 do gene *SCD*. Um deles, g.10329C>T, causa uma substituição de uma valina para uma alanina. Alguns trabalhos demonstram que este polimorfismo tem associação com a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados na carne (TANIGUCHI et al., 2004) e no leite (MELE et al., 2007). Outro trabalho, também demonstra associação deste polimorfismo com o valor genético de bovinos para teor de gordura de proteína no leite (KULIG et al., 2016).

Em caprinos, ZHANG et al. (2010), descreveram seis polimorfismos no gene *SCD*. Dois deles estão localizados no íntron 3, um deles no íntron 4 e três deles no éxon 6. Porém, estes autores não realizaram análise de associação destes polimorfismos com nenhuma característica. Ainda em trabalho com caprinos, ZIDI et al. (2010), avaliou o efeito de três polimorfismos, um no éxon 5, (c.732C>T), e dois no éxon 6 (c.*1902_1904delTGT e c.*3504G >A), sobre a composição de ácidos graxos do leite. A partir dos resultados, os autores observaram que os haplótipos formados pelos três polimorfismos apresentaram associação com a característica avaliada. Além disso, estes autores também observaram que, *in silico*, o polimorfismo c.*1902_1904delTGT provoca alterações na conformação da molécula de mRNA .

2.6 Glicerol-3-fosfato acetil transferase 4 (GPAT4)

As glicerol-3-fosfato acetiltransferases (GPATs, do inglês *glycerol-3-phosphate acyltransferase*) são responsáveis por catalisar a reação de conversão do glicerol-3-fosfato e da molécula de acil-Coa em 1-acilglicerol-3-fosfato, o primeiro passo para a síntese de triglicerídeos e de fosfolipídios. Além disto, estas enzimas apresentam a menor atividade específica das enzimas que atuam na síntese de triglicerídeos, o que indica que elas são limitantes para a síntese destas moléculas (COLEMAN; LEE, 2004).

Atualmente foram descritas quatro isoformas de GPATs. A GPAT1 é localizada na membrana mitocondrial externa e sua atividade não sofre inibição pelo N-ethylenomaleimide (NEM). A GPAT2 também se localiza na membrana mitocondrial externa, porém, diferentemente da GPAT1 a sua atividade é inibida por NEM. As outras duas são a GPAT3 e a GPAT4, ambas sensíveis a NEM e localizadas no retículo endoplasmático (TAKEUCHI; REUE, 2009). Conforme revisado por WENDEL; LEWIN; COLEMAN (2009), todas as proteínas desta família apresentam quatro domínios conservados que foram inicialmente caracterizados por análises de bioinformática. De acordo com estes autores, a partir de estudos de mutagênese em aminoácidos conservados nas proteínas homólogas, foi possível identificar alguns resíduos essenciais para a funcionalidade desta proteína. Regiões importantes para o seu funcionamento são o domínio 1, o domínio 3 e o domínio 4.

Devido a alta similaridade na sequência de aminoácidos entre a GPAT4 e a Acil glicerol-3-fosfato aciltransferase 1 (AGPAT1; do inglês, *acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 1*), a GPAT4 foi inicialmente classificada como uma AGPAT, AGPAT 6 (BEIGNEUX et al., 2006). Por este motivo, em muitos trabalhos esta enzima está denominada desta maneira (TAKEUCHI; REUE, 2009), inclusive em um trabalho desta mesma equipe de pesquisa (BAGATOLI, 2015). Para a produção de 1-acilglicerol-3-fosfato, esta enzima pode utilizar como substrato uma gama e ácidos graxos que variam de 12 a 20 carbonos, mas apresenta maior afinidade por ácidos graxos de 16 e 18 carbonos, independentemente do seu grau de saturação. Todas as enzimas desta família catalisam a mesma reação (CHEN et al., 2008; NAGLE et al., 2008), e as diferenças encontradas entre elas consistem, além da sequência, da localização celular e do tecido no qual cada uma desempenha sua função. Trabalhos com camundongos *knockout* (*GPAT4*^{-/-}) demonstram que a GPAT4 é essencial no fígado, tecido adiposo marrom e na glândula mamária (NAGLE et al., 2008; VERGNES et al., 2006).

Em humanos o gene que codifica esta proteína, *GPAT4*, está localizado o cromossomo 8, possui aproximadamente 122 kb e uma ORF de 1368 pb, que contém 13 éxons e 12 íntrons (LI et al., 2003). De acordo com a sequência gênica, a *GPAT4* possui 456 aminoácidos e peso molecular de 52,2 KDa, porém, ela é expressa com 48 KDa devido a clivagem do peptídeo sinal de 38 aminoácidos (BEIGNEUX et al., 2006).

Como é esperado, devido ao seu papel na produção de triglicerídeos, em camundongos, o gene *GPAT4* é altamente expresso em tecidos conhecidos por seu papel lipogênico como o tecido adiposo marrom, testículos e tecido adiposo branco visceral. Apresenta expressão moderada no cérebro, intestino, fígado e rim e pouca expressão no coração e no músculo esquelético (TAKEUCHI; REUE, 2009). Em humanos, sua expressão foi detectada em diversos tecidos como coração, fígado, rim, testículos e músculo esquelético, e diferentemente do que ocorre em camundongos, em humanos, a maior expressão deste gene foi detectada no músculo esquelético (LI et al., 2003).

Os diversos estudos que avaliam camundongos *GPAT4*^{-/-} sugerem que seu papel na síntese dos triglicerídeos é tecido específico, mas que a partir da sua atuação nestes tecidos pode ter consequências sistêmicas sobre o balanço energético (TAKEUCHI; REUE, 2009). Quando comparados a camundongos do tipo selvagem, camundongos *GPAT4*^{-/-} apresentam peso 25% menor e são resistentes à obesidade induzida pela alimentação ou pela linhagem genética (camundongos^{ob/ob}). Essa redução do peso corporal é acompanhada de menor quantidade de gordura no corpo e de uma redução na expressão gênica e nos níveis plasmáticos da leptina (VERGNES et al., 2006). Além disso, também ocorre um aumento no gasto energético, sendo que, a ingestão de alimentos, temperatura corporal, quociente respiratório e termogênese em resposta ao frio, não são alterados (NAGLE et al., 2008; VERGNES et al., 2006). De acordo com TAKEUCHI; REUE (2009), essas alterações podem ocorrer devido a ausência de uma camada sub-dérmica de gordura nos animais *GPAT4*^{-/-} que geralmente auxilia na manutenção da temperatura corporal. Ainda em camundongos, a deficiência da GPAT4 não provoca alterações nos níveis plasmáticos de glicose e de insulina quando os animais são submetidos a dieta rica em gordura ou são modelos geneticamente obesos (camundongos^{ob/ob}). Apesar disto, nestes animais o conteúdo plasmático de triglicerídeos tanto no plasma como no fígado diminui aproximadamente 45% (VERGNES et al., 2006).

A expressão do gene *GAPT4* é estimulada na glândula mamária com o início da lactação e animais *GPAT4*^{-/-} apresentam diversos problemas relacionados à produção de leite. Quando comparada à glândula mamária de animais do tipo selvagem, a glândula mamária de camundongos *GPAT4*^{-/-} possui alvéolos de menor tamanho e em número reduzido, também

apresenta menor quantidade de glóbulos de gordura. Como consequência, estes animais possuem redução de aproximadamente 90% no conteúdo de triacilglicerol e diacilglicerol no leite (BEIGNEUX et al., 2006). Na glândula mamária de bovinos, também observou-se que a expressão deste gene varia no decorrer da lactação e que ela pode estar sob o controle do fator de transcrição PPAR- γ (BIONAZ et al., 2013). Além disso, a expressão deste gene está diretamente correlacionada com o teor de gordura no leite (LITTLEJOHN et al., 2014).

2.6.1 Polimorfismos no gene *GPAT4* e a produção animal

Em bovinos, LITTLEJOHN et al., (2014) encontraram forte associação de 10 SNPs localizados nos éxons 1 e 2 do gene *GPAT4* com a porcentagem de gordura no leite. Em caprinos, foram encontrados quatro polimorfismos no gene *GPAT4*: g.152G>C, 8124G>A, 9263C>G, 16436G>A; localizados na região 5' UTR, íntron 2, íntron 4 e região 3' UTR, respectivamente. Análises de associação demonstraram que o polimorfismo 9263C>G, apresenta influência sobre a composição do leite em caprinos, onde o genótipo GG está associado à maiores teores de gordura e de proteína (HE et al., 2011). Em outro trabalho, BAGATOLI (2015) encontrou associação deste mesmo polimorfismo com o valor genético de caprinos para o teor de gordura no leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estimativa do valor genético

Para estimar o valor genético, os animais foram inicialmente agrupados em 12 grupamentos genéticos (GG), de acordo com a composição racial: 50% Alpina e 50% Saanen (GG1); 51 a 68% Alpina (GG1); 69 a 81% Alpina (GG2); 82 a 93% Alpina (GG3); superior à 93% Alpina (GG4); 50% Alpina: 50% SRD (GG5); 51 a 68% SRD (GG5); 69 a 81% SRD (GG6); superior à 93% SRD (GG7); 50% Saanen : 50% SRD (GG8); 51 a 68% Saanen (GG8); 69 a 81% Saanen (GG9); 82 a 93% Saanen (GG10); superior à 93% Saanen (GG11) e 50% Alpina : 25% Saanen : 25% SRD (GG12). Os animais utilizados neste estudo são exclusivamente das raças Alpina ou Saanen, SRD foi a denominação utilizada nos casos em que não havia a informação do reprodutor utilizado.

Informações de produção e composição do leite foram utilizadas para estimar os valores genéticos para a produção e porcentagem de gordura, proteína, lactose, extrato seco total e contagem de células somáticas. Para organização e preparação dos dados foi utilizado o pacote estatístico SAS® (2002). Para estimar o valor genético dos animais foram descartadas lactações com duração inferiores a 82 dias (10%), superiores a 471 dias (6,7%) e com produções inferiores a 110 Kg (17%). Em relação aos dados de composição, também foram descartadas lactações nas quais foi realizada somente uma análise de composição do leite.

Os valores genéticos foram calculados por meio de um modelo animal contendo os efeitos aleatórios de animal e de ambiente permanente, e os efeitos fixos de ano-estação de parto, grupamento genético (GG1 a GG12), ordem (1 a 6) e tipo de parto (simples, duplo ou triplo), os quais foram utilizados para cada uma das características avaliadas em caso de efeito significativo observado em uma análise de variância prévia. Para a predição dos valores genéticos foi utilizado o aplicativo REMLF90, descrito por MISZTAL (2002), que utiliza a metodologia de máxima verossimilhança restrita (REML) e o algoritmo de Maximização da Esperança (EM). Os números de lactações e de animais utilizados nesta análise, assim como os efeitos fixos considerados para cada característica avaliada, estão apresentados na Tabela 2. Após estimados, os valores genéticos dos animais foram então utilizados para a realização das análises de associação dos genótipos com os valores genéticos.

Tabela 2. Observações utilizadas para o cálculo dos valores genéticos dos animais para cada característica avaliada.

Características	Número de lactações	Número de cabras	Efeitos fixos
Produção de leite até 305 dias	2726	1292	anoest, nc, op
Duração da Lactação	2726	1292	anoest, op
Contagem de células somáticas	1874	1047	anoest, gs, op
Produção de proteína total	1968	1102	anoest, gs, nc, op
Porcentagem de Proteína	2279	1237	anoest, gs, op
Produção de gordura	1968	1102	anoest, gs, nc, op
Porcentagem de gordura	2279	1237	anoest, gs, nc, op
Extrato seco total	1968	1102	anoest, gs, nc, op
Porcentagem de extrato seco	2279	1237	anoest, gs, nc, op
Produção de lactose	1969	1102	anoest, gs, nc, op
Porcentagem de lactose	2279	1237	anoest, gs, nc, op

Efeitos fixos avaliados: (anoest) ano e estação de parto; (gs) grupamento genético; (nc) número de crias; (op) ordem de parto.

3.2 Análises com DNA genômico

3.2.1 Delineamento experimental

Para avaliar se existe associação entre os diferentes genótipos e os valores genéticos dos animais para as características analisadas, o delineamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado. Nele, os genótipos são os efeitos fixos e o valor genético a variável resposta.

3.2.2 Amostra de animais e coleta de material biológico

Para as análises de associação dos genótipos com os valores genéticos, foram utilizadas cabras multíparas das raças Saanem e Alpina, alojadas no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, MG. Todos os procedimentos envolvendo o uso destes animais foram aprovados pela CEUAP/UFV através do protocolo de nº 042/2015. Os animais foram criados em baias coletivas providas de cochos para fornecimento de ração e água à vontade. Todos os animais receberam dieta formulada de acordo com os valores preconizados pelo NRC (2007). A ração foi composta de silagem de milho e concentrado, fornecida duas vezes ao dia (às 7 e às 16 horas) sempre após a ordenha dos animais.

A coleta de sangue para a extração de DNA foi realizada com o uso de tubos *vacutainer* contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 8%. Foram coletados 4,5 mL de sangue periférico a partir da veia jugular dos animais. Após a coleta, os tubos contendo sangue foram armazenados em isopor com gelo e posteriormente transferidos para geladeira, onde permaneceram por 24 h para que ocorresse a separação da camada de leucócitos, os quais foram transferidos para microtubos de 2 mL e armazenados a -20 °C até o momento da extração de DNA.

Tanto os fragmentos amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), como o número de amostras utilizadas em cada uma das análises empregadas para identificar novos polimorfismos ou realizar a genotipagem dos animais, podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Número de amostras utilizadas em cada uma das análises realizadas.

Fragmento	PCR	PCR-RFLP (enzima)	Sequenciamento
PPARG	195	0	5
UCP2-PR	185	0	4
UCP2-2	177	177 (<i>HaeII</i>)	5
LPL	51	51 (<i>Anza</i> TM 57 <i>Bpu1102I</i>)	0
LPL-PR	20	0	4
SCD	79	79 (<i>TspR1</i>)	4
GPAT4	48	50 (<i>NcoI</i>)	0

Fragmento: Fragmento de DNA amplificado pela técnica de PCR, cada fragmento é amplificado por um dos pares de *primers* da Tabela 4.

PCR: Número de amostras utilizadas na análise de (PCR).

PCR-RFLP: Número de amostras submetidas à técnica de PCR seguido por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP).

Sequenciamento: Número de amostras submetidas a sequenciamento.

3.2.3 Desenho de *primers*

As sequências dos *primers* utilizados para amplificação de fragmentos de DNA genômico foram adquiridas de trabalhos já publicados ou foram obtidas com o auxílio do programa *PrimerQuest* a partir da sequência gênica de caprinos (Tabela 4).

Tabela 4. *Primers* utilizados nas reações de PCR convencional.

<i>Primer</i> - de 5' para 3'	Gene	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Região gênica amplificada	Referência
PPARG					
(F) ACGGTTTGCCTCCTTATTC (R) CTCTGTGTCAACCATGGTAAT	<i>PPARG</i>	Aproximadamente 570 pb	58°C	Região promotora e parte do éxon 1	Este Trabalho
UCP2-PR					
(F) CGGAGTAGCGGGAGGAGGG (R) TTGGCGGTGACAGGCCAC	<i>UCP2</i>	672pb	62°C	Parte da região promotora e éxon 1	(FERREIRA, 2013)
UCP2-2					
(F) GGAGCTTTGAGCTGCTTGATG (R) CACAGGGCTGAGGCAGTAGAA	<i>UCP2</i>	670 pb	64°C	Éxon 2 e íntrons 1 e 2 parcial.	(FERREIRA, 2013)
LPL					
(F) CTCGGGCTCAGCGGTTCTAC (R) CAGCCCTCCGTGGGAGAC	<i>LPL</i>	154 pb	60°C	Parte do éxon 1	(BADAQUI et al., 2007)
LPL-PR					
(F) GCTGGGTATTGCCCAAATGTAG (R) CAGCCCTCCGTGGGAGAC	<i>LPL</i>	632 pb	60°C	Região promotora e parte do éxon 1	Este trabalho
SCD					
(F) TGAGGGCTTCCACAATA (R) GCATCATAAAGGCAGAGT	<i>SCD</i>	377 pb	60°C	Parte do éxon 6	(ZHANG et al., 2010)
GPAT4					
(F) ATCTGGCATTTCACACATT (R) CTGACTCCATCTAAGAGCCT	<i>GPAT4</i>	241 pb	53°C	Éxon 4 e parte dos íntrons 3 e 4	He et al., 2011

Par de *primers* que amplifica o fragmento PPARG (PPARG), par de *primers* que amplifica o fragmento UCP2-PR (UCP2-PR), par de *primers* que amplifica o fragmento UCP2-2 (UCP2-2), par de *primers* que amplifica o fragmento LPL (LPL), par de *primers* que amplifica o fragmento LPL-PR (LPL-PR), par de *primers* que amplifica o fragmento SCD (SCD), par de *primers* que amplifica o fragmento GPAT4 (GPAT4).

3.2.4 Isolamento de DNA genômico

O isolamento do DNA genômico foi realizado a partir de 200 µL de leucócitos utilizando o reagente Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB) de acordo com protocolo descrito por LODHI et al. (1994), com as modificações descritas em SOARES et al. (2009). Posteriormente o DNA foi ressuspensionado em cerca de 50 µL de água ultrapura e quantificado em fluorímetro Qubit® 2.0 (Applied Biosystems). As amostras de DNA foram então diluídas a uma concentração de uso de 50 ng/µL e armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

3.2.5 Reação em cadeia da polimerase a partir de DNA genômico (PCR)

Para a amplificação dos fragmentos de interesse foi utilizada a enzima GoTaq® DNA Polymerase® (Promega, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram conduzidas em termociclador (ProFlex PCR System, *Applied Biosystems*) e consistiram de um passo inicial a 94°C por cinco minutos para que ocorresse a desnaturação do DNA genômico, seguido por 35 ciclos que se repetiam da seguinte maneira: 94°C por 30 segundos para a abertura da fita molde de DNA, 53 a 63°C por 35 segundos, dependendo da temperatura de anelamento dos *primers* (Tabela 4), e 72°C por 50 segundos para a extensão do fragmento. A finalização da PCR se deu por um passo a temperatura de 72°C durante cinco minutos.

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% para confirmação da amplificação ou a 12% (48 h a 140 v) para analisar a existência de pequenas diferenças de tamanho entre os produtos de PCR referente às diferentes amostras.

3.2.6. Eletroforese e Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP)

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, os produtos de PCR foram avaliados diretamente por eletroforese ou então submetidos à técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para realizar a genotipagem de polimorfismos na região promotora do genes *UCP2* e *PPARG*, os fragmentos *PPARG* e *UCP2-PR* foram avaliados apenas por eletroforese convencional, o fragmento *UCP2-PR* em gel de poliacrilamida 12% (140v por 48h) e o fragmento *PPARG* em gel de poliacrilamida 5% (140v por 4 horas). Com o intuito de encontrar novos polimorfismos no gene *LPL* o fragmento amplificado pelo par de *primers* *LPL* foi submetido a digestão com a enzima Anza™ 57 *Bpu1102I* (Invitrogen, *Life Technologies*). Para avaliar o polimorfismo 802 A/C, descrito ZHANG et al. (2010) no gene *SCD*, o fragmento amplificado pelo par de *primers* *SCD* foi digerido com a enzima *TspR1* (New England Biolabs). Para avaliar o polimorfismo descrito por FERREIRA (2013) no éxon 2 do gene *UCP2*, o fragmento *UCP2-2* foi digerido com a enzima *HaeIII* (Promega). A genotipagem do polimorfismo descrito por HE et al. (2011) no gene *GPAT4* foi realizada através da digestão do fragmentos amplificado pelo par de *primers* *GPAT4* com a enzima *NcoI*. Todas as reações de digestão foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante em volume de 10µL.

3.2.7 Sequenciamento de DNA

Com o intuito de encontrar novos polimorfismos, além dos já detectados por PCR-RFLP ou por eletroforese, para cada um dos fragmentos de DNA amplificados por PCR (*PPARG*, *UCP2-PR*, *UCP2-2*, *LPL-PR* e *SCD*), ao menos quatro amostras foram submetidas também ao sequenciamento de bases, duas delas de alto valor genético para teor gordura do leite, e duas de baixo valor genético para esta característica. Também foi realizado o sequenciamento dos diferentes alelos descritos por FERREIRA (2013) no gene *UCP2* e dos novos alelos encontrados, neste trabalho, no gene *PPARG*.

Para tanto, as amostras de PCR, obtidas da amplificação destes genes, foram purificadas com o GenElute™ *Gel Extraction Kit* (Sigma Aldrich) e o sequenciamento foi realizado pela técnica de terminação de cadeia (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa - Agrobiologia, Seropédica – RJ). Os eletroferogramas gerados foram editados com o uso do programa *DNA Baser* e as sequências foram comparadas por alinhamento com uso dos programas *BLAST* (ALTSCHUL et al., 1990) e *ClustalW* (MCWILLIAM et al., 2013).

3.2.8 Análises *in silico*

As análises virtuais de RFLP foram realizadas pelos programas *Webcutter* (MAAREK et al., 1997) e *Restriction Mapper* (Disponível em <http://www.restrictionmapper.org/>). Para verificar se as mutações encontradas alteram a sequência de aminoácidos do peptídeo foi utilizado o programa *EMBOSS: Transeq* (MCWILLIAM et al., 2013). Para verificar se as mutações alteram a ligação a fatores de transcrição descritos em mamíferos foi utilizado o programa *JASPAR* (MATHELIER et al., 2016). Para verificar se as mutações avaliadas alteram a estrutura do DNA e do mRNA foi utilizado o programa *M-Fold* (ZUKER, 2003), onde as estruturas avaliadas foram as que apresentaram a menor energia livre (ΔG). Para avaliar as amostras com relação à formação de Quadruplexes de Guanidina foi utilizado o programa *QGRS Mapper* (KIKIN; D'ANTONIO; BAGGA, 2006).

3.2.9 Análise estatística

Para avaliar se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os *loci* avaliados, foi utilizado o software *Hardy-Weinberg equilibrium calculator including analysis for ascertainment bias* (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009), que calcula as frequências alélicas e genotípicas e realiza o teste do Qui-quadrado.

Para realização das análises de associação dos genótipos com os valores genéticos foram utilizados 195 animais para o polimorfismo avaliado no fragmento amplificado pelo par de *primers* PPARG, 185 animais para o polimorfismo -3708G/A, no gene *UCP2*, e 177 animais para o polimorfismo -2569G/A, também no gene *UCP2*.

A associação dos genótipos com os valores genéticos dos animais foi verificada através de análises de variância com a utilização do procedimento GLM do SAS® (2002). Foram considerados os efeitos dos genótipos sobre os valores genéticos das características avaliadas de acordo com o seguinte modelo:

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

Em que Y_{ij} é o valor genético do animal i para cada característica avaliada; μ média geral; G_j é o efeito do genótipo j dos polimorfismos; e_{ij} é o efeito aleatório do resíduo. Nos casos em que a análise de variância apresentou efeito significativo dos genótipo sobre o valor genético foi realizado teste de comparação de médias, teste de Tukey a 5%.

A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo procedimento UNIVARIATE do SAS, que realiza os testes de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises, Anderson-Darling. Foram consideradas dentro da normalidade, variáveis que foram aprovadas em pelo menos três dos quatro testes. Nos casos em que os resíduos não atenderam os preceitos de normalidade, foi realizada transformação logarítmica dos dados. Caso, ainda assim, os resíduos não se encontraram dentro da normalidade, a análise de variância foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis através do procedimento NPAR1WAY do SAS e as médias foram comparas entre si pelo teste de Dunn, através do pacote *dunn.test* (comparações múltiplas), disponível para o programa estatístico R.

3.3 Análises de expressão gênica

3.3.1 Expressão gênica em células da glândula mamária

Para as análises de expressão gênica, foram utilizadas 50 fêmeas, todas da raça Alpina e pertencentes ao rebanho do setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os animais foram criados e alimentados da mesma forma como esta descrito no tópico 3.2.2.

Com o objetivo de avaliar a influência dos genótipos sobre a expressão gênica, foram realizadas coletas de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite aos 35 dias pós-parto para todos os 50 animais. Posteriormente, eles foram genotipados para os polimorfismos nos genes *PPARG* e *UCP2* e *GPAT4*, como descrito anteriormente. Para avaliar se a expressão varia no decorrer da lactação, destes 50 animais, foram selecionados 20, todos de segunda ou terceira ordem de parto. Nestes animais, foram realizadas também coletas de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite aos 10, 50 e 140 dias pós-parto.

Em ambos os casos, as coletas seguiram um delineamento inteiramente casualizado. No primeiro, os genótipos foram utilizados como efeito fixo e a expressão gênica como variável resposta. No segundo, os dias pós-parto foram utilizados como efeito fixo e a expressão gênica como variável resposta.

3.3.1.1 Isolamento de descamação do epitélio da glândula mamária e de gordura

A partir do leite, foram isoladas células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite de acordo com protocolo descrito por SUÁREZ-VEGA et al. (2015). Durante a primeira ordenha do dia foram coletados aproximadamente 150 mL de leite em três tubos tipo *Falcon* de 50 mL, estéreis e livres de pirogênios, contendo EDTA a uma concentração final de 0,05 M. Após a coleta, os tubos foram colocados imediatamente em caixa de isopor com gelo e levados ao laboratório. As amostras foram então centrifugadas a 540g por 10 min à temperatura de 4°C. A camada de gordura foi removida com auxílio de uma espátula, transferida para criotubos de 2 mL e armazenada em nitrogênio líquido para posterior análise do perfil de ácidos graxos do leite. O sobrenadante, proveniente da centrifugação, foi descartado, restando o *pellet* de células. O *pellet* dos três tubos foi então ressuscitado em 10 mL de solução de PBS 1X, EDTA 0,05 M. Esta solução de células foi então transferida para um tubo tipo *Falcon* de 15 mL e submetida à centrifugação a 540g por 10 min à temperatura de 4°C, a camada de gordura que se formou e o sobrenadante foram descartados. Posteriormente repetiu-se esta lavagem mais uma vez e o *pellet* de células foi ressuscitado em 2 mL de PBS 1X, EDTA 0,05 M e transferido para um criotubo de 2 mL. As células foram então utilizadas diretamente para a extração de RNA (células frescas) ou então armazenadas em nitrogênio para posterior realização desta extração (células congeladas).

3.3.1.2 Extração de RNA de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite

Após o descongelamento das amostras em banho de gelo, o RNA total foi extraído a partir de 1 mL de suspensão de células somáticas do leite, com três metodologias diferentes: Com o *kit* PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA), de acordo com as recomendações do fabricante para suspensão de células; com o reagente Trizol™ (Invitrogen, *Life Technologies*), de acordo com as recomendações do fabricante para extração de RNA a partir de suspensão de células e com o reagente Brazol (LGC biotecnologia), também de acordo com as recomendações do fabricante para suspensão de células. Para células congeladas foram

utilizadas as três metodologias, enquanto que para células frescas foi realizada somente a extração com o *kit* PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA).

O mRNA obtido foi quantificado através do equipamento Nanodrop™ (*Thermo Scientific*™) na empresa Embrapa (Embrapa - Agrobiologia, Seropédica – RJ). A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium) e analisado em fotodocumentador L-PIX EX (*Loccus* Biotecnologia).

3.3.2 Expressão gênica no tecido muscular

Como as amostras de RNA provenientes das coletas de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite estavam degradadas, não foi possível a realização das análises subsequentes neste material. Assim, optamos por a testar os *primers*, já sintetizados, em amostras de cDNA de tecido muscular já existentes, provenientes de outro trabalho desta mesma equipe (GARCIA, 2017). Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais no trabalho de GARCIA (2017) foram aprovados pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/COMEP, documento nº 279/2012, referente ao caso nº 23083.008044/2012-52.

Neste estudo, foram utilizadas 10 amostras de músculo *Longissimus lumborum* de cabras mestiças Saanem e Alpina. Para cada uma das características avaliadas, peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC), estas amostras foram divididas em dois grupos. Os grupos foram montados de acordo com o valor das características. Para o PA, um dos grupos é constituído das cinco amostras de maior PA e o outro das cinco amostras de menor PA. Para PC, um grupo consistiu das cinco amostras de maior PC e o outro das cinco amostras de menor PC. Quanto a FC, um grupo consistiu de cinco amostras de maior FC e o outro das cinco amostras de menor FC. Cada uma das 10 amostras utilizadas representa uma replicata biológica, dessa maneira, para cada característica avaliada foram utilizadas cinco replicatas biológicas de alto valor e cinco replicatas biológicas de baixo valor. Os dados fenotípicos de PA, PC e FC também são provenientes do mesmo trabalho de GARCIA (2017).

3.3.3 Desenho de *primers*

As sequências dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real foram adquiridas de trabalhos já publicados ou foram sintetizadas com o auxílio do programa *PrimerQuest* a partir da sequência gênica de caprinos (Tabela 5).

3.3.4 PCR em tempo real

Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente *SYBR GREEN* (*Fast SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems*) e o aparelho Linegene 9600 (*Bioer Technologies*). As reações foram realizadas em triplicatas técnicas, das quais foram selecionadas as duas replicatas mais próximas. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise, em volume de 10 µL. As variações de leitura decorrentes de variação de volume e evaporação foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX. A expressão relativa dos genes *UCP2*, *PPARG* e *GPAT4* foi avaliada através do método $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tanto, o gene que codifica a proteína *Hydroxymethylbilane Synthase (HMBS)* foi utilizado como gene de referência. Tanto as temperaturas de anelamento como a sequência dos *primers* utilizados para as reações de quantificação relativa da expressão gênica estão relacionados na Tabela 5.

As condições das reações consistiram de um passo inicial de 95°C por cinco minutos para a desnaturação das fitas, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para a abertura das fitas e de 60°C por 20 segundos para o anelamento dos *primers* e extensão. A produção da

curva de dissociação foi a partir de um passo adicional que consistiu do aumento gradual da temperatura de 60°C até 95°C.

Tabela 5. Sequência de bases, tamanho do fragmento amplificado e temperatura de anelamento dos *primers* utilizados nas análises de qPCR.

<i>Primers</i> - 5' para 3'	Fragmento	Temperatura de anelamento	Referência
PPARG			
(F) TGACTTTATGGAGCCCAAGTTC (R) GCGGTCTCCACTGAGAATAATG	109 pb	60 °C	Este trabalho
UCP2			
(F) GAAAGGGACATCTCCCAATGT (R) AGGGAGGTCGTCTGTCATTA	118 pb	60 °C	Este trabalho
GPAT4			
(F) GAAATTGGAGCCACAGTTTACC (R) GTAGGTCATCATCCCGTACTTG	96 pb	60 °C	Este trabalho
HMBS			
(F) AGCATGCCTTGGAGAGGAATG (R) CGCTTGACAGACAGTCCAAT	102 pb	60 °C	(ZHANG et al., 2013)
EEF1A2			
(F) CGACTGGCCACCTCATCTACA (R) CCAGGCATACTTGAAGGAGCC	106 pb	60 °C	(ZHANG et al., 2013)

Pares de primers utilizados para avaliar a expressão dos genes *PPARG* (PPARG), *UCP2* (UCP2), *GPAT4* (GPAT4), *HMBS* (HMBS), *EEF1A2* (EEF1A2).

3.3.5 Teste de eficiência

Para saber a eficiência de cada par de *primers* utilizado nas reações de PCR em tempo real, foram realizados testes de eficiência da seguinte maneira: primeiro foi preparado um *pool* com 10µl de cDNA de cada uma das amostras e este *pool* foi diluído em três concentrações, 45ng, 15ng e 5ng (proporção 9:3:1). As três concentrações do *pool* de cDNA foram então utilizadas nas reações de PCR em tempo real com a concentração de 500nM de *primers*, optou-se por esta concentração de *primers* pois ela foi a mesma utilizada no trabalho de GARCIA (2017). A eficiência das reações foi calculada pelo próprio software do aparelho utilizado (Linegene 9600, *Bioer Technologies*) através da produção de uma reta da concentração de cDNA contra o Ct das amostras. De acordo com os resultados obtidos no teste de eficiência optou-se por utilizar a concentração de 15ng de cDNA e 500nM de *primers* para todas as reações.

3.3.6 Estabilidade de expressão dos genes de referência

Para avaliar qual é o melhor gene de referência entre o *HMBS* e o *EEF1A2* foi utilizado o algoritmo RefFinder (XIE et al., 2012). Este software realiza as análises separadamente com quatro metodologias Δ Ct (SILVER et al., 2006), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004), *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004), e indica qual o melhor gene de referência para a condição experimental utilizada. De acordo com o software o melhor gene de referência a ser utilizado é o *EEF1A2*, porém, devido a grande diferença existente entre os valores de Ct do gene *EEF1A2* e os genes alvo avaliados no trabalho, optamos por utilizar como gene de referência o gene *HMBS*.

3.3.7 Análise estatística

Inicialmente foi utilizado o procedimento UNIVARIATE do SAS® para avaliar a normalidade das variáveis. Os dados de expressão gênica (expressos com $2^{-\Delta Ct}$) não

obedeceram as pressuposições de normalidade e foram submetidos a transformação inversa ($1/(2^{-\Delta C_t})$).

Para verificar a existência de correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação de Pearson seguido pelo Teste T à 5% de probabilidade. Para avaliar se ocorrem diferenças na expressão dos genes *PAARG*, *UCP2* e *GPAT4* entre os grupos de maior ou menor FC, PA e PC também foi utilizado o Teste T à 5% de significância através do procedimento TTEST do SAS®. Os grupos foram considerados como efeitos fixos e a expressão dos gênicos (expressa em $1/(2^{-\Delta C_t})$) como variável resposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Polimorfismos no locus *PPARG*

Ao realizar a eletroforese dos fragmentos amplificados pelo par de *primers* *PPARG*, observamos a existência de dois fragmentos de tamanhos distintos: Um de maior tamanho, denominado alelo A, e um de menor tamanho, denominado alelo B, como pode ser observado na Figura 2. Também pode ser observado nas canaletas 6 e 7 desta figura, que quando os alelos estão presentes em heterozigose ocorre o surgimento de uma terceira banda, de tamanho maior do que o fragmento de interesse, provavelmente um artefato inespecífico produzido na reação de PCR, análises de sequenciamento poderão elucidar a natureza desta terceira banda.

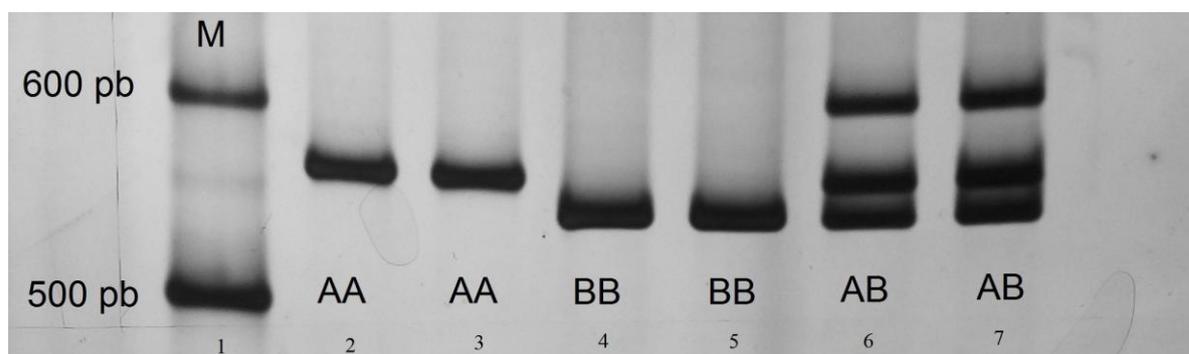


Figura 2. Gel representativo das diferenças de migração encontradas no fragmento amplificado pelo par de *primers* *PPARG*, que amplifica a região promotora e parte do éxon 1 do gene *PPARG*. A partir das diferenças podem ser observados três genótipos: AA (canaletas 2 e 3), AB (canaletas 4 e 5), BB (canaletas 6 e 7). A banda mais alta observada nas canaletas 6 e 7 é um artefato da amplificação. Marcador de peso molecular 100 pb (Ludwig biotecnologia), (M). Gel de poliacrilamida 5% revelado com nitrato de prata.

Na população estudada, o alelo A apresentou frequência igual a 0,74 e o alelo B 0,26. O genótipo AA apresentou frequência de 0,54 e os genótipos AB e BB de 0,39 e 0,07, respectivamente. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, a população avaliada se encontra em equilíbrio para este *locus*, resultado que sugere a inexistência de alguma força de seleção que atue sobre este polimorfismo.

A partir das análises de associação dos genótipos encontrados com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite, pode-se observar que este polimorfismo apresenta associação estatística com as características de produção total de leite, produção de gordura, produção de proteína, produção de extrato seco, produção de lactose e porcentagem de lactose. As médias mais altas estão associadas aos genótipos AA e AB, e as médias mais baixas ao genótipo BB (Tabela 6). Dessa maneira, estes resultados indicam que a seleção de animais para o alelo A, mesmo que em heterozigose, poderá favorecer a produção total de leite bem como a produção total de gordura, proteína, extrato seco e lactose.

Com o intuito de identificar a mutação responsável por esta diferença de migração observada nos géis, foi realizado sequenciamento do fragmento *PPARG* em cinco amostras, três delas portadoras do genótipo AA e duas delas portadoras do genótipo BB. Não foi possível realizar o sequenciamento do fragmento inespecífico que ocorre em animais heterozigotos (Figura 2, canaletas 6 e 7), porém, futuras análises deste tipo poderão auxiliar a entender a natureza desta amplificação.

Tabela 6. Associação dos genótipos do polimorfismo encontrado no fragmento PPARG com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.

Características	Genótipos PPARG (n=195)			P-valor
	AA ⁽¹⁾ (n=105)	AB ⁽¹⁾ (n=77)	BB ⁽¹⁾ (n=13)	
Produção Total	454.8048 ± 39.3475 ^a	453.4396 ± 36.8471 ^a	420.4378 ± 31.6212129 ^b	0.0089
Produção de Gordura	16.7878 ± 1.0158 ^a	16.5703 ± 1.0377 ^a	15.5791 ± 0.8935 ^b	0.0003
Produção de Proteína	14.9193 ± 1.0333 ^a	14.6942 ± 0.9962 ^a	13.6942 ± 0.8981 ^b	0.0002
Produção Extrato Seco	56.4011 ± 3.8420 ^a	55.7618 ± 3.7848 ^a	52.0029 ± 3.5423 ^b	0.0006
Produção de Lactose	4.8317 ± 1.6537 ^a	4.6684 ± 1.6173 ^a	3.0972 ± 1.5859 ^b	0.0018
Porcentagem de Gordura	3.6272 ± 0.1433	3.6082 ± 0.1638	3.6392 ± 0.1673	0.6420
Porcentagem de Proteína	3.1846 ± 0.1395	3.1701 ± 0.1386	3.1797 ± 0.1693	0.7924
Porcentagem de Extrato Seco	12.0609 ± 0.2713	12.0215 ± 0.300	12.0181 ± 0.3083	0.6229
Porcentagem de Lactose¶	4.3423 ± 0.0934 ^A	4.3318 ± 0.1154 ^A	4.2741 ± 0.0699 ^B	0.0162
Duração da Lactação	261.4800 ± 9.2695	260.5516 ± 9.2603	255.1168 ± 10.8458	0.0711
CCS	6.6173 ± 0.0336	6.6158 ± 0.0316	6.6023 ± 0.0307	0.2984

⁽¹⁾ Valores expressos em valor genético da característica somado à média da característica ± desvio padrão do valor genético da característica.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Dunn a 5%.

¶Análise de variância realizada pelo teste de Kruskal Wallis.

Com o sequenciamento das diferentes amostras, foi possível identificar duas mutações. Entre as duas, a mutação que leva a uma diferença de tamanho entre os fragmentos amplificados, consiste de uma deleção de três pares de base, “GAG”, na posição 274 do *amplicon*, posição que corresponde ao nucleotídeo 56726836 da sequência NC_030829.1. Nesta posição desta sequência, a deleção da trinca “GAG” esta na fita *reverse*, mesma fita na qual o gene *PPARG* está localizado, dessa maneira, na fita *forward* a trinca deletada é “CTC”. Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução do gene *PPARG* caprino (*Gene ID*: 100861309) como o nucleotídeo +1, esta mutação está localizada na posição -282, região promotora do gene, e por este motivo foi denominada de -282delGAG (Figura 3). Também pode ser observado no alinhamento, que a sequência de referência apresenta a deleção de apenas uma das bases da trinca “GAG”.

```

NC_030829.1      CAGATACCCTTAGGAAAGTCATCCCCCTGTAAG-AGAACAGGGCTGTCTGTAGGACGTTG
-282delGAG      CAGATACCCTTAGGAAAGTCATCCCCCTGTAAG---AACAGGGCTGTCTGTAGGACGTTG
-282GAG          CAGATACCCTTAGGAAAGTCATCCCCCTGTAAGGAGAACAGGGCTGTCTGTAGGACGTTG
*****

```

Figura 3. Alinhamento das sequências da região do fragmento PPARG onde está localizado o polimorfismo -282delGAG, região promotora do gene *PPARG*. Sequência de referência do gene *UCP2* de caprinos (NC_030829.1). Sequência do alelo -282delGAG (-282delGAG). Sequência do alelo -282GAG (-282GAG). Em negrito, posição em que ocorre o polimorfismo.

A diferença de três pares de base encontrada poderia justificar a diferença de tamanho observada no gel. Porém, os fragmentos de maior tamanho no gel (alelo A) são, na realidade,

os fragmentos com a deleção da sequência “GAG”, enquanto que os fragmentos de menor tamanho (alelo B) não possuem tal deleção. Ou seja, o fragmento de maior tamanho aparece como uma banda mais baixa no gel, enquanto que o fragmento de tamanho menor aparece como uma banda mais alta. Além disso, pelas condições nas quais a eletroforese ocorreu (140 volts por três horas) e por se tratar de um gel de poliacrilamida com concentração de apenas 5% (Figura 2), a distância observada entre os dois fragmentos é relativamente grande para uma diferença de somente 3 pares de base. Como a mutação encontrada não é capaz de explicar as alterações nos padrões migração no gel, foram feitas outras análises com o intuito entender tal incompatibilidade.

Um dos prováveis motivos para que isto tenha ocorrido pode ser a existência de alguma diferença na estrutura secundária dos produtos de PCR. Estudos mostram que fragmentos de mesmo tamanho com sequências diferentes podem apresentar padrões de migração distintos em géis de poliacrilamida (MANIATIS; JEFFREY; VAN DESANDE, 1975; MERTZ; BERG, 1974). Conforme revisado por STELLWAGEN; STELLWAGEN, (2009), em géis deste tipo, algumas moléculas apresentam padrão de migração mais lento do que o esperado para o seu tamanho. Neste sentido, diversos trabalhos com microscopia eletrônica de fluorescência, birrefringência elétrica transiente e experimentos com análises de dicroísmo, demonstram que essas moléculas que migram mais lentamente são, na realidade, moléculas que estão dobradas ou curvadas. Este padrão de migração anormal ocorre pois, apesar de filamentos de DNA dobrados apresentam comprimento menor, eles possuem áreas transversais maiores, o que dificulta sua passagem pelos poros do gel. Além disso, moléculas de DNA curvas também apresentam maior afinidade pela matriz o gel de poliacrilamida, o que dificulta ainda mais sua migração. Futuras análises de eletroforese em géis com capacidade de desfazer esta curvatura da molécula de DNA, como géis de poliacrilamida desnaturantes, podem auxiliar a confirmar o papel deste polimorfismo sobre a alteração observada no padrão de migração.

Uma vez que dobras ou curvas na molécula de DNA dupla fita são dependentes da sequência da molécula, polimorfismos podem provocar alterações na conformação dos produtos de PCR. Neste sentido, alguns trabalhos (D’ALFONSO; RICHIARDI, 1994; KNIGHT et al., 1999) demonstram que até mesmo transversões são capazes de alterar o padrão de migração dos produtos de PCR em géis de poliacrilamida, efeitos semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Outra possibilidade para a ocorrência destes padrões anormais de migração, pode ser a presença de estruturas denominadas quadruplex de guanidina (G-quadruplex). G-quadruplexes são estruturas secundárias existentes no DNA *in vivo* que podem ser estabilizadas *in vitro* ao submeter as sequências de DNA a determinadas concentrações de sais, como em uma reação de PCR. Dependendo da sequência de DNA, a estrutura dos G-quadruplexes, *in vitro*, apresenta maior estabilidade termodinâmica do que moléculas de DNA dupla fita. (RHODES; LIPPS, 2015). A estabilização destas estruturas leva a diferenças no padrão de migração dos fragmentos em géis de poliacrilamida. Embora as avaliações de G-quadruplex encontradas na literatura sejam, na sua maioria, realizadas em fragmentos pequenos de DNA. Já existem relatos de que estas estruturas provocam diferenças no padrão de migração de produtos de PCR de 80 pb de tamanho (ZHENG et al., 2010).

Para testar esta hipótese realizamos avaliações *in silico* para verificar a ocorrência de sequências com potencial para formar G-quadruplexes. Com isso, observamos que no fragmento amplificado pode ocorrer a formação de 2 G-quadruplexes, e o sítio de formação de um deles ocorre no mesmo local da mutação descrita acima. No alelo -282delGAG, o local de formação do G-quadruplex é alterado da posição -285 para a posição -276 do gene caprino. Além disso, neste alelo, o *G-Score*, também foi menor quando a estrutura mudou de posição

(Figura 4). O valor do *G-Score* fornecido pelo *software* mede a probabilidade de ocorrer a formação de um G-quadruplex estável. Quanto maior o *score* maior a probabilidade de formação da estrutura. Para as condições utilizadas nesta análise, os valores podem variar de 0 a 105, sendo que 105 é o valor dado a um G-Quadruplex canônico formado por quatro repetições de seis guaninas, como exemplo: **GGGGGGTGGGGGGTGGGGGGTGGGGGG**. O *G-score* encontrado neste trabalho foi relativamente baixo, 16 para o alelo -282delGAG e 17 para o alelo -282GAG. O motivo para isto ter ocorrido é que a formação de G-quadruplex com estruturas formadas por repetições de apenas duas guaninas não é comum. Apesar disto, estas já foram descritas em outros trabalhos (HUPPERT; BALASUBRAMANIAN, 2005; TODD; JOHNSTON; NEIDLE, 2005). Outro dado que corrobora a possibilidade de formação destas estruturas na sequência estudada é o fato de que as regiões promotoras, como a que está sendo avaliada, geralmente são ricas em G-Quadruplexes (HUPPERT; BALASUBRAMANIAN, 2007). Os dados acima demonstram apenas uma predição, *in silico*, da ocorrência desta estrutura e a probabilidade de ocorrência dela e bastante pequena. Porém, caso ela ocorra no fragmento avaliado, existe uma pequena possibilidade de que ela também provoque as alterações observadas no padrão de migração das amostras.

		-282delGAG	
Posição	Comprimento	QGRS	G-Score
-276	26	<u>GGCTGTCTGTAGGACGTTGGTATGGG</u>	16

		-282GAG	
Posição	Comprimento	QGRS	G-Score
-285	29	<u>GGAGAACAGGGCTGTCTGTAGGACGTTGG</u>	17

Figura 4. Análise *in silico* para avaliar a formação de G-quadruplexes entre as o alelos do polimorfismo -282delGAG. Posição em que ocorre a formação do G-quadruplex (Posição). Comprimento da sequência que formará a estrutura o G-quadruplex (Comprimento). Valor que mede a probabilidade de formação da estrutura (*G-Socre*). As guaninas em negrito são as que irão participar da formação do G-quadruplex. Em vermelho, a sequência GAG que sofre a deleção.

Além de avaliar se este polimorfismo altera a formação da estrutura secundária da dupla fita quanto à formação de G-quadruplex, com o auxílio de algoritmos, também avaliou-se se ele pode provocar alterações na predição da estrutura secundária do DNA quando este está em fita simples, mesmo que a probabilidade de formação destas estruturas seja muito pequena, principalmente em condições intracelulares. Com estes resultados, foi possível observar que em decorrência desta deleção não ocorrem alterações significativas na formação destas estruturas.

Como este polimorfismo está localizado na região promotora, também foram realizadas avaliações *in silico* para verificar se, em decorrência dele, ocorrem alterações em sequências de sítios de ligação para fatores de transcrição. Neste caso, como a quantidade de informação a respeito destes sítios de ligação para estes fatores em ruminantes é muito limitada, as mutações foram avaliadas quanto a presença da sequência de sítios de ligação de fatores de transcrição que já tenham sido descritos em mamíferos. Por este motivo, a probabilidade de que algum destes sítios seja um sítio funcional é muito pequena, porém, caso algum deles seja verdadeiro é possível que em decorrência do polimorfismo analisado possam ocorrer alterações na expressão gênica. Os resultados sugerem que a deleção da trinca GAG

resulta na perda de sítios de ligação para 14 fatores de transcrição. Dentre eles, o de maior importância para as características avaliadas é o FOXO1, importante regulador da sensibilidade à insulina (O-SULLIVAN et al., 2015). Os diferentes alelos desta mutação também foram avaliados quanto a existência de enzimas de restrição que possam diferenciá-los. Porém, das enzimas conhecidas, nenhuma pode ser utilizada para realizar esta caracterização.

Como descrito anteriormente, com o sequenciamento também foi possível observar a existência de uma segunda mutação no fragmento PPARG. Esta mutação consiste de uma transversão G/T na posição 349 deste *amplicon*, posição que corresponde ao nucleotídeo 56726759 da sequência NC_030829.1. Nesta posição desta sequência, a transversão G/T esta na fita *reverse*, mesma fita na qual o gene *PPARG* está localizado, dessa maneira, na fita *forward* a transversão é C/A. Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução do gene *PPARG* caprino (*Gene ID*: 100861309) como o nucleotídeo +1, este polimorfismo está localizado na posição -206, região promotora do gene, e por este motivo foi denominado de -206G/T (Figura 5). Neste caso, os fragmentos classificados como A para o padrão de bandas no gel apresentam uma base G (alelo -206G) enquanto que os fragmentos classificados como B possuem uma base T (alelo -206T). Na Figura 5 também pode ser observado que na posição do polimorfismo a sequência de referência apresenta uma Guanina, assim como no alelo -206G.

```

NC_030829.1   GTATGGGTCCGCTGTACAAGCTGACACCCTAGAGGGTCCTTGACCATGACGTTTCAGGTA
-206T        GTATGGGTCCGCTGTACAAGCTGACACCCTAGAGGGTCCTTGACCATGACTTTCAGGTA
-206G        GTATGGGTCCGCTGTACAAGCTGACACCCTAGAGGGTCCTTGACCATGACGTTCAGGTA
*****

```

Figura 5. Alinhamento das sequências da região do fragmento PPARG onde está localizado o polimorfismo -206G/T, região promotora do gene *PPARG*. Sequência de referência do gene *PPARG* de caprinos (NC_030829.1). Sequência do alelo -206T (-206T). Sequência do alelo -206G (-206G). Em negrito, posição em que ocorre o polimorfismo.

Visto que, tanto mutação -282delGAG como a transversão -206G/T estão contidas no fragmento PPARG. Mesmo com as avaliações *in silico*, não foi possível determinar qual dos dois polimorfismos descritos acima é responsável pela alteração no padrão de migração observado no gel. Alteração que resulta nos alelos A e B descritos anteriormente. Isto não foi possível, pois o fragmento de banda alta no gel (alelo A) apresenta os alelos -282delGAG e -206G. Já o fragmento de banda baixa (alelo B) apresenta os alelos -282GAG e -206T, o que impossibilita essa determinação.

Os dois alelos deste segundo polimorfismo também foram avaliados *in silico* quanto a formação de estruturas secundárias no DNA de fita dupla e simples. De acordo com os resultados, o polimorfismo não provoca alterações em sequências que possam formar G-quadruplexes. No entanto, observou-se que, entre os dois alelos, ocorrem diferenças na estrutura secundária, predita *in silico*, da molécula de DNA de fita simples, como pode ser observado na Figura 6.

Para avaliar a possibilidade de genotipagem desta mutação pela técnica de PCR-RFLP, foi realizada a busca por enzimas de restrição que fossem capazes de diferenciar os dois alelos existentes. Porém, das enzimas comercialmente disponíveis, nenhuma ganha ou perde sítio de restrição na região polimórfica, o que impossibilita o uso de enzimas de restrição para realizar esta diferenciação.

Este segundo polimorfismo também está localizado na região promotora do gene *PPARG*. Por este motivo, os diferentes alelos também foram avaliados *in silico* quanto a

diferenças relacionadas à presença de sequências de sítios de ligação para fatores de transcrição descritos em mamíferos, pois mesmo que a probabilidade destes sítios serem funcionais em caprinos seja pequena, caso eles ocorram, polimorfismos que os alterem podem provocar alterações na expressão gênica. Com isso, foi possível observar que, na presença do alelo -206G ocorrem cinco sítios de ligação descritos para fatores de transcrição. Deste fatores os mais importantes para as características avaliadas no presente trabalho são: o ATF1, envolvido na resposta celular a diversos fatores externos, como fatores de crescimento, hormônios peptídicos, neurotransmissores e até mesmo íons de cálcio (BLECKMANN et al., 2002), MEIS3, envolvido na sobrevivência de células β -pancreáticas (LIU et al., 2010) e o GMEB2 (KAUL et al., 2000) que aumenta a sensibilidade celular a glicocorticóides. Sítios de ligação para outros seis fatores de transcrição estão presentes apenas no alelo -206T. Dentre eles, é importante mencionar o TCF7L2, envolvido na regulação da homeostase da insulina (LIU et al., 2009b), e os fatores STAT5A, STAT3 e STAT4, mediadores importantes da resposta celular à diversos ligantes (AKIRA, 1999).

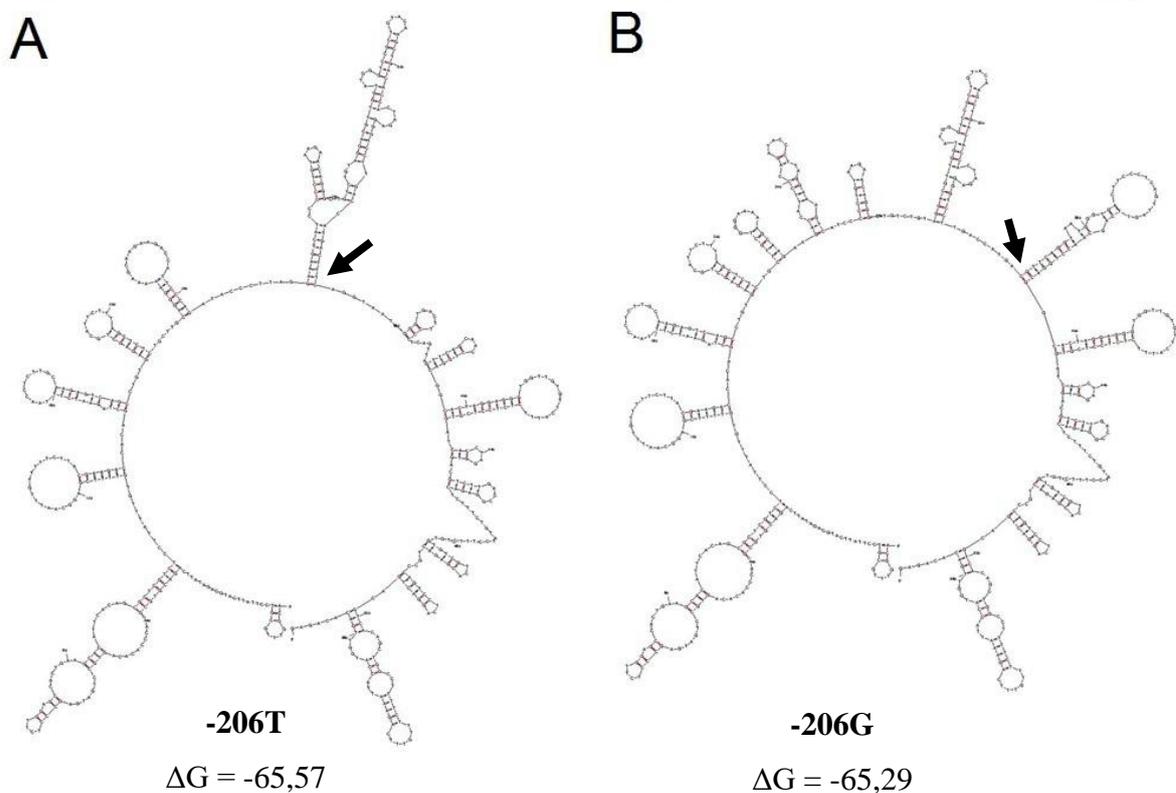


Figura 6. Predição das estruturas secundárias com o menor ΔG formadas pelas moléculas de DNA de fita simples do fragmento *PPARG* para cada um dos alelos da mutação -206G/T. **(A)** Estrutura formada na presença do alelo -206T. **(B)** Estrutura formada na presença do alelo -206G. A seta indica a região em que a mutação está localizada. Energia livre da estrutura (ΔG).

Embora em caprinos não tenham sido encontrados trabalhos que descrevam polimorfismos no gene *PPARG* e nem tampouco a associação destes com características de produção, estudos em outras espécies demonstram que mutações neste gene podem estar associadas ao metabolismo de lipídios. Conforme revisado por LAMRI et al. (2012), em

humanos, existem polimorfismos neste gene que estão associados com o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 e de obesidade. Em bovinos, polimorfismos neste mesmo gene foram associados com comprimento corporal, circunferência cardíaca (HUA et al. 2011), com características de qualidade de carcaça e com o perfil de ácidos graxos do músculo *Longissimus* (LEE et al. 2016).

Como demonstrado anteriormente, o alelo A está associado a um maior valor genético para a produção total de leite, de gordura, de proteína e de extrato seco. O que significa que, os alelos que apresentaram associação com maiores produções são os que estão contidos no fragmento caracterizado como alelo A, -282delGAG e -206G. Na presença do alelo -282delGAG parte de uma sequência com potencial para formar um G-quadruplex é alterada. G-quadruplexes são conhecidos reguladores da expressão gênica, partindo de um ponto de vista canônico, sua presença dificulta o progresso da RNA polimerase. Helicases específicas são necessárias para desfazer estas estruturas e permitir a leitura correta da fita de DNA pelas enzimas e fatores associados a transcrição (RHODES; LIPPS, 2015). Além disso, a presença do alelo -282delGAG pode resultar na perda de um sítio de ligação para o fator de transcrição FOXO1, importante regulador da sensibilidade insulina, e conhecido por reprimir a expressão do *PPARG* em adipócitos (ARMONI et al., 2006). Em relação ao alelo -206G, observou-se que ele provoca alterações na estrutura secundária da molécula de DNA de fita simples predita *in silico*, alterando a posição de diversos *hairpins*, estruturas secundárias determinantes para a regulação da expressão gênica. A formação de um *hairpin* pode impedir o acesso de fatores de transcrição a suas sequências alvo ou então pode ser necessária para que fatores de transcrição se liguem na molécula de DNA (KAUSHIK et al., 2016). A presença do alelo -206G também pode resultar em alterações de sítios de ligação de fatores de transcrição, dentre eles um de grande importância é o ATF1, essencial para promover a diferenciação de adipócitos e para a expressão do *PPARG* nestes tipos celulares (FOX et al., 2006). Conforme discutido anteriormente, tanto probabilidade de ocorrência destas estruturas secundárias, bem como, a probabilidade de que os sítios de ligação de fatores de transcrição sejam funcionais, são muito pequenas, porém, caso elas ocorram podem resultar em modificações na expressão deste gene. Sem a análise de expressão gênica não é possível determinar se estas mutações levam a maior ou menor expressão, mas vale lembrar que estes polimorfismos estão localizados na região promotora, região que tem papel importante na regulação da transcrição de RNAm.

Na glândula mamária, a expressão do gene *PPARG* é essencial para a produção de leite. Em bovinos, BIONAZ et al. (2013) demonstram o papel central do *PPARG* no metabolismo de lipídios na glândula mamária, e posteriormente, estudos com transcriptoma na glândula mamária de caprinos (SHI et al., 2016) também corroboraram este fato. Além disso, em ratos foi demonstrado que a ausência do gene *PPARG* na glândula mamária provoca diversas alterações na morfologia da glândula, entre elas estão a redução no número de alvéolos e o aumento na quantidade de adipócitos. Somado a isso, nestes animais as células epiteliais dos alvéolos são preenchidas com vesículas enormes de gordura. Em ruminantes, essa redução no número de células secretoras da glândula mamária está diretamente relacionada à redução na produção de leite (BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENTA; JAMMES, 2004). Dessa forma, caso as alterações provocadas pelos polimorfismos descritos acima alterem a expressão gênica, elas poderão afetar também o metabolismo da glândula mamária, o que irá se refletir na produção do leite e de seus componentes. Por este motivo, pode então ter ocorrido a associação observada entre alelos e o valor genético dos animais.

4.2 Polimorfismos no locus *UCP2*

Para avaliar a região promotora do gene *UCP2*, foi utilizado o par de *primers* UCP2-PR que amplifica uma pequena parte do éxon 1 e parte da região promotora do gene. Quando os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese, confirmou-se a existência de uma pequena diferença de tamanho entre as amostras, descrita anteriormente por FERREIRA (2013). Como pode ser observado na Figura 7, a diferença encontrada no gel é típica de uma diferença de tamanho, porém, após o sequenciamento de duas amostras que apresentam banda alta e duas amostras que apresentam banda baixa, não foi encontrada nenhuma deleção ou inserção na sequência. Apesar disto, identificamos uma troca de nucleotídeo único G/A na posição 308 do fragmento amplificado, posição que corresponde ao nucleotídeo 51511697 da da sequência NC_019472.2. Nesta posição desta sequência, a transição G/A esta na fita *reverse*, mesma fita na qual o gene *UCP2* está localizado, dessa maneira, na fita *forward* a transição é C/T. Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução do gene *UCP2* de ovinos (*Gene ID*: 101104932) como o nucleotídeo +1, este polimorfismo está localizado na posição -3708, região promotora do gene, e por este motivo foi denominado de -3708G/A. A comparação das sequências dos diferentes alelos com a sequência de ovinos pode ser observada na Figura 8, na qual também pode-se observar que a sequência de ovinos apresenta uma adenina na posição desta mutação, assim como o alelo -3708A.

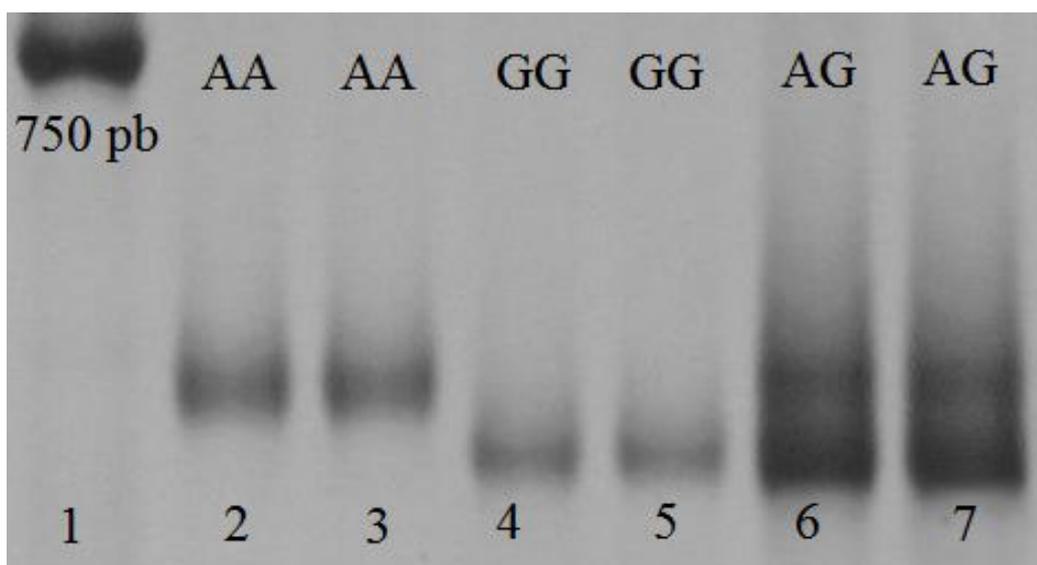


Figura 7. Gel representativo das diferenças de migração associadas ao polimorfismo -3708G/A encontradas no fragmento amplificado pelo par de *primers* UCP2-PR, que amplifica a região promotora e parte do éxon 1 do gene *UCP2*. Genótipos -3708AA (canaletas 2 e 3), genótipos -3708GG (canaletas 4 e 5), genótipo -3708AG (canaletas 6 e 7). Marcador de peso molecular 100 pb (Ludwig biotecnologia), M. Pares de base, pb. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata.

As amostras que se apresentam com banda alta no gel, possuem uma adenina na posição -3708 (alelo -3708A), já as amostras de banda baixa possuem uma guanina (alelo -3708G). Dessa maneira, é muito provável que, assim como ocorreu no polimorfismo descrito anteriormente no gene *PPARG*, esta diferença no padrão de migração das amostras no gel esteja associada a alterações na conformação do fragmento de PCR. Como já mencionado

anteriormente, há muito tempo se sabe que diferenças na sequência de DNA de fragmentos com mesmo tamanho podem levar a padrões de migração distintos em géis de poliacrilamida. Essas diferenças são causadas por alterações na curvatura da molécula de DNA, pois moléculas de DNA curvadas tem padrão de migração mais lento (STELLWAGEN; STELLWAGEN, 2009). Futuros trabalhos que estudem o efeito deste polimorfismo sobre esta propriedade do DNA poderão auxiliar neste entendimento.

```

NC_019472.2      GGTACAAAAGGGCTGACGCGGGGACCGAAGCCCGGAAATGGGAGTGAAAGAAGGCGCGAA
-3708G          GGTACAAGAGGGCTGACGCGGGGACCGAAGCCCGGAAATGGGAGTGAAAGAAGGCGCGAA
-3708A          GGTACAAAAGGGCTGACGCGGGGACCGAAGCCCGGAAATGGGAGTGAAAGAAGGCGCGAA
*****

```

Figura 8. Alinhamento das sequências da região do fragmento UCP2-PR onde está localizado o polimorfismo -3708G/A, região promotora do gene *UCP2*. Sequência de referência do gene *UCP2* de ovino (NC_019472.2). Sequência do alelo -3708G (-3708G). Sequência do alelo -3708A (-3708A). Em negrito, posição em que ocorre o polimorfismo.

Como o polimorfismo -3708G/A está localizado na região promotora do gene, foram realizadas avaliações para verificar se, em decorrência dele, ocorrem alterações em sequências com potencial para formarem G-quadruplexes, ou se ele provoca alterações na estrutura secundária, predita *in silico*, das moléculas de DNA de fita simples. De acordo com os resultados, esta mutação não provoca alterações em nenhuma destas características.

Devido a sua localização na região promotora, da mesma maneira como foi realizado nas mutações descritas anteriormente no gene *PPARG*, os diferentes alelos deste polimorfismo também foram avaliados quanto a presença de sítios de ligação para fatores de transcrição descritos em mamíferos. Com isso, observamos que na presença do alelo -3708A ocorrem sítios exclusivos de ligação para nove fatores de transcrição entre os quais estão TCF7L2, importante na homeostase da insulina (LIU et al., 2009a) e o fator de ligação em sequências do tipo TATA-box (TBP) (BURLEY, 1996).

Para avaliar a possibilidade de realizar a genotipagem das amostras pela técnica de PCR-RFLP realizamos análises *in silico* em busca de enzimas de restrição que fossem capazes de diferenciar estes dois alelos. De acordo com os algoritmos utilizados a enzima *MnII* reconhece o alelo -3708G. Assim, com o uso desta enzima é possível identificar o genótipo dos animais.

Após a caracterização do polimorfismo, a distribuição dos diferentes alelos e genótipos na população em estudo foi analisada. O alelo -3708A apresentou frequência de 0,68 e o alelo -3708G apresentou frequência de 0,33. O genótipo -3708AA apresentou frequência de 0,45 e os genótipos -3708AG e -3708GG de 0,43 e 0,12, respectivamente. A população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg para este *locus*, o que sugere que não esteja ocorrendo pressão de seleção sobre determinado alelo deste *locus*.

Os efeitos destes genótipos sobre as características de produção e composição do leite foram avaliados através de análises de associação dos genótipos com os valores genéticos dos animais. Com esta análise, observamos que os animais portadores do genótipo -3708GG possuem valores genéticos superiores para porcentagem de proteína, porcentagem de gordura e porcentagem de extrato seco (Tabela 7). Além disso, não ocorre efeito negativo destes genótipos sobre o valor genético para produção total de leite. Dessa maneira, a seleção de animais para o alelo -3708G irá favorecer os teores de gordura, proteína e extrato seco sem prejudicar a produção de leite dos animais.

Em resumo, existem fortes evidências de que o polimorfismo -3708G/A apresente associação com o valor genético dos animais para porcentagem de gordura, proteína e extrato

seco no leite. Além disso, caso este polimorfismo seja realmente responsável pela diferença de migração observada no gel, é muito provável que ele provoque alterações na curvatura da molécula de DNA. Neste sentido, um fato deve ser levado em consideração, este polimorfismo está localizado na região promotora do gene, região importante na regulação da expressão, o que sugere que o efeito observado sobre as o valor genético dos animais para as características de produção e qualidade do leite ocorra devido a alterações na expressão gênica.

Tabela 7. Associação dos genótipos do polimorfismo -3708G/A com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.

Característica	Genótipos -3708G/A (n=185)			P-valor
	-3708AA ⁽¹⁾ (n=85)	-3708AG ⁽¹⁾ (n=81)	-3708GG ⁽¹⁾ (n=22)	
Produção Total	451.9980 ± 38.9573	450.9819 ± 37.8910	460.0833 ± 38.6451	0.6102
Produção de Gordura	16.6064 ± 0.9852	16.5375 ± 1.0546	16.9583 ± 1.1007	0.2377
Produção de Proteína	14.7414 ± 0.9262	14.7318 ± 1.0812	15.1044 ± 1.2317	0.2945
Produção Extrato Seco	56.0515 ± 3.6534	55.7583 ± 3.8984	56.7084 ± 4.0535	0.5802
Produção de Lactose	4.8759 ± 1.5967	4.6621 ± 1.5963	4.7630 ± 1.5369	0.6923
Porcentagem de Gordura	3.5941 ± 0.1248 ^b	3.5853 ± 0.1515 ^b	3.6897 ± 0.1450 ^a	0.0072
Porcentagem de Proteína	3.1480 ± 0.1174 ^b	3.1575 ± 0.1387 ^b	3.2750 ± 0.1534 ^a	0.0003
Porcentagem de Extrato Seco	11.9943 ± 0.2412 ^b	11.9836 ± 0.2843 ^b	12.2298 ± 0.2926 ^a	0.0005
Porcentagem de Lactose¶	4.3571 ± 0.1019	4.3361 ± 0.0708	4.3611 ± 0.0823	0.0972
Duração da Lactação	260.0265 ± 7.2456	262.8006 ± 8.7510	262.6777 ± 8.9333	0.0744
CCS¶	6.6085 ± 0.0312	6.6074 ± 0.0302	6.6229 ± 0.0340	0.0556

⁽¹⁾ Valores expressos em valor genético da característica somado à média da característica ± desvio padrão do valor genético da característica.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

¶Análise de variância realizada pelo teste de Kruskal Wallis.

Além da presença de sítios de ligação para fatores de transcrição, a região promotora apresenta uma série de outras características que a diferem do restante do genoma. Entre estas, esta a curvatura da molécula de DNA. Dependendo da sequência de DNA, a curvatura da molécula pode ser uma propriedade intrínseca ou então ela pode ser induzida por fatores externos, como fatores de transcrição ou outras proteínas associadas a ele (BUCKLAND, 2006). Diversas evidências apontam que a curvatura intrínseca da molécula de DNA afeta diretamente a afinidade de fatores de transcrição, como por exemplo o TBP. De acordo com PARVIN et al. (1995), quando comparada a uma molécula de DNA linear, a afinidade de ligação de uma molécula de DNA naturalmente curva com o TBP é até 100 vezes maior, *in vitro*. KIM; KLOOSTER; SHAPIRO (1995) demonstram que quando sequências curvas são inseridas *upstream* de sequências TATA-box, a expressão gênica aumenta em até 100 vezes. NISHIKAWA et al. (2003), ainda observou que sequências de DNA curvas geralmente são encontradas *upstream* de sequências TATA-box. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, ao menos *in vitro*, o polimorfismo -3708G/A altera a estrutura secundária do DNA. Caso isto também ocorra *in vivo*, é possível que esta alteração estrutural provoque alterações também na expressão gênica. Neste sentido, futuros trabalhos que avaliem a associação deste polimorfismo com a expressão do gene *UCP2* poderão auxiliar a elucidar esta suposição.

Com o sequenciamento do fragmento UCP2-PR também foi possível identificar a existência de uma segunda mutação na região promotora do gene *UCP2*. Esta, consiste de uma transição A/G na posição 401 do fragmento amplificado, posição que corresponde ao nucleotídeo 51511604 sequência NC_019472.2. Nesta posição desta sequência, a transição A/G esta na fita *reverse*, mesma fita na qual o gene *UCP2* está localizado, dessa maneira, na fita *forward* a transição é T/C. Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução do gene *UCP2* de ovinos (*Gene ID*: 101104932) como o nucleotídeo +1, este polimorfismo está localizado na posição -3615, região promotora do gene, e por este motivo foi denominado de -3615A/G (Figura 9). Inicialmente ao identificar esta mutação acreditamos que ela também estava associada com o padrão de migração das amostras no gel. Mas após o sequenciamento de um número maior de amostras encontramos um animal de banda alta com esta mutação em heterozigose, o que invalidou esta hipótese. Como também pode ser observado na Figura 9, a sequência de ovinos apresenta uma Guanina na posição do polimorfismo, assim como o alelo -3615G. Também é possível observar que na posição -3603 em ovinos existe uma Timina, enquanto que em caprinos ocorre uma Citosina.

```

NC_019472.2      GACGACCCTGGGGCGTGGCGGCCTCTGCGGCTAACGGGTCGCCGCCAGTCCTCGGAGCC
-3615G          GACGACCCTGGGGCGTGGCGGCCTCTGCGGCTAACGGGTCGCCGCCAGTCCTCGGAGCC
-3615A          GACGACCCTGGGGCGTGGCGGCCTCTGCGGCTAACGGGTCACCGCCAGTCCTCGGAGCC
*****

```

Figura 9. Alinhamento das sequências da região do fragmento UCP2-PR onde está localizado o polimorfismo -3615A/G, região promotora do gene *UCP2*. Sequência de referência do gene *UCP2* de ovino (NC_019472.2). Sequência do alelo -3615G (-3615G). Sequência do alelo -3615A (-3615A). Em negrito, posição em que ocorre o polimorfismo. Nesta imagem também pode ser observado um SNP que ocorre entre as sequências de caprinos e ovinos localizado a 3603 pb do sítio de início de transcrição da sequência do gene *UCP2* ovino.

Como este polimorfismo está localizado na região promotora do gene, foram realizadas avaliações para verificar se ele provoca alterações em sequências com potencial para formarem G-quadruplexes. Também avaliamos se em decorrência dele ocorrem alterações na estrutura secundária, predita *in silico*, das moléculas de DNA de fita simples. De acordo com os resultados, esta mutação não provoca alterações em nenhuma destas características.

Com o intuito de realizar a genotipagem deste polimorfismo pela técnica de PCR-RFLP, também avaliamos este polimorfismo quanto a existência de enzimas de restrição que fossem capazes de reconhecer os diferentes alelos. De acordo com esta análise, quatro enzimas de restrição são capazes de reconhecer e clivar o fragmento na presença do alelo -3615A, a *BstEII*, *MaeIII*, *TSP45I* e *HpaI*. Outras três enzimas são capazes de reconhecer e clivar o alelo -3615G, a *TauI*, a *BisI* e a *Fnu4HI*. Com isto, é possível identificar os genótipos dos animais amostrados para este polimorfismo com o auxílio de alguma destas enzimas através do protocolo de PCR-RFLP.

Devido a sua localização na região promotora, este polimorfismo também foi avaliado *in silico* quanto a presença de sequências de sítios de ligação para fatores de transcrição já identificados em mamíferos. Nesta análise, observou-se que o genótipo -3615A apresenta a sequência de sítios de ligação exclusivos para onze fatores de transcrição, entre eles SP2, SP3 importantes reguladores da expressão do gene *UCP2* (MEDVEDEV et al., 2001). Já o genótipo -3615G apresenta sítio de ligação exclusivo para apenas um fator o E2F4, envolvido no ciclo celular (GARNEAU et al., 2009).

Com o intuito de analisar a região do éxon 2 do gene *UCP2* caprino, um fragmento que abrange o éxon 2 e parte do primeiro íntron do gene *UCP2* foi amplificado pela técnica de PCR utilizando-se o par de *primers UCP2-2*. Este par de *primers* foi descrito anteriormente em outro trabalho deste grupo de pesquisa (FERREIRA, 2013), juntamente com um polimorfismo, que foi detectado por PCR-RFLP, nesta região gênica. Neste trabalho, a partir do sequenciamento de 5 amostras, foi possível descobrir que este polimorfismo consiste de uma transição G/A na posição 532 do fragmento UCP2-2, posição que corresponde ao nucleotídeo 952 da sequência do gene *UCP2* de ovinos (*Gene ID*: 101104932). Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução deste gene como o nucleotídeo +1, este polimorfismo se localiza na posição -2569, por este motivo foi denominado de -2569G/A. Esta mutação está localizada no éxon 2 do gene *UCP2*, mais especificamente, na posição 57 de uma pequena matriz aberta de leitura de 111pb descrita por PECQUEUR et al., (1999) na região 5' UTR deste gene (Figura 10A). Esta matriz aberta de leitura codifica um pequeno peptídeo de 36 aminoácidos, apesar disto, a ocorrência desta mutação não leva a alterações na sequência de aminoácidos do peptídeo (Figura 10B). Como também pode ser observado no alinhamento, a sequência de referência do gene em ovinos apresenta uma Guanina na posição da mutação, assim como no alelo -2569G. Também ocorre uma diferença de bases entre as sequências das duas espécies, a troca de uma Citosina por uma Timina na posição -2998 do gene. Esta alteração leva também a uma diferença no aminoácido 10 do peptídeo que em caprinos é uma Prolina e em ovinos é uma Serina.

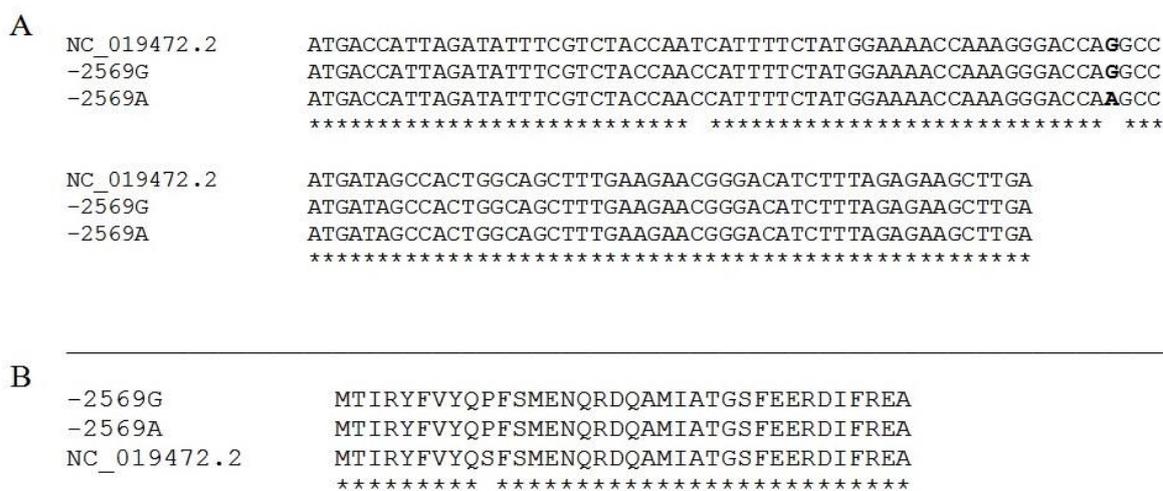


Figura 10. Alinhamento das sequências de DNA e do peptídeo da região do fragmento UCP2-2 em que está localizado o polimorfismo -2569G/A, região 5'UTR do gene *UCP2*. **(A)** Alinhamento das sequências polimórficas da pequena ORF localizada na região 5' UTR do gene *UCP2*. Sequência de referência do gene *UCP2* de ovino (NC_019472.2). Sequência do alelo -2569G (-2569G). Sequência do alelo -2569A (-2569A). Na imagem também pode ser observado um SNP que ocorre entre as sequências de caprinos e ovinos na posição 923 do gene ovino. **(B)** Alinhamento entre as sequências polimórficas do peptídeo que é codificado pela pequena ORF da região 5' UTR do gene *UCP2*. Sequência de referência de ovinos (NC_19472.2). Sequência do alelo -2569G (-2569G). Sequência do alelo -2569A (-2569A). Na imagem também pode ser observado um alteração de aminoácido que ocorre entre as sequências de caprinos e ovinos em decorrência do SNP existente entre as sequências das duas espécies.

Como esta mutação está localizada na região 5' UTR do gene *UCP2*, além de realizar avaliações *in silico* para verificar se o polimorfismo pode provocar alterações em sequências com potencial para formarem G-quadruplexes, também foi avaliado se ele pode provocar alterações nas estruturas secundárias, previstas *in silico*, das moléculas de DNA de fita simples e de RNA. A partir dos resultados, é possível observar que esta troca de uma Guanina por uma adenina altera apenas a estrutura secundária prevista para a molécula de DNA de fita simples, essas alterações podem ser observadas na figura 11.

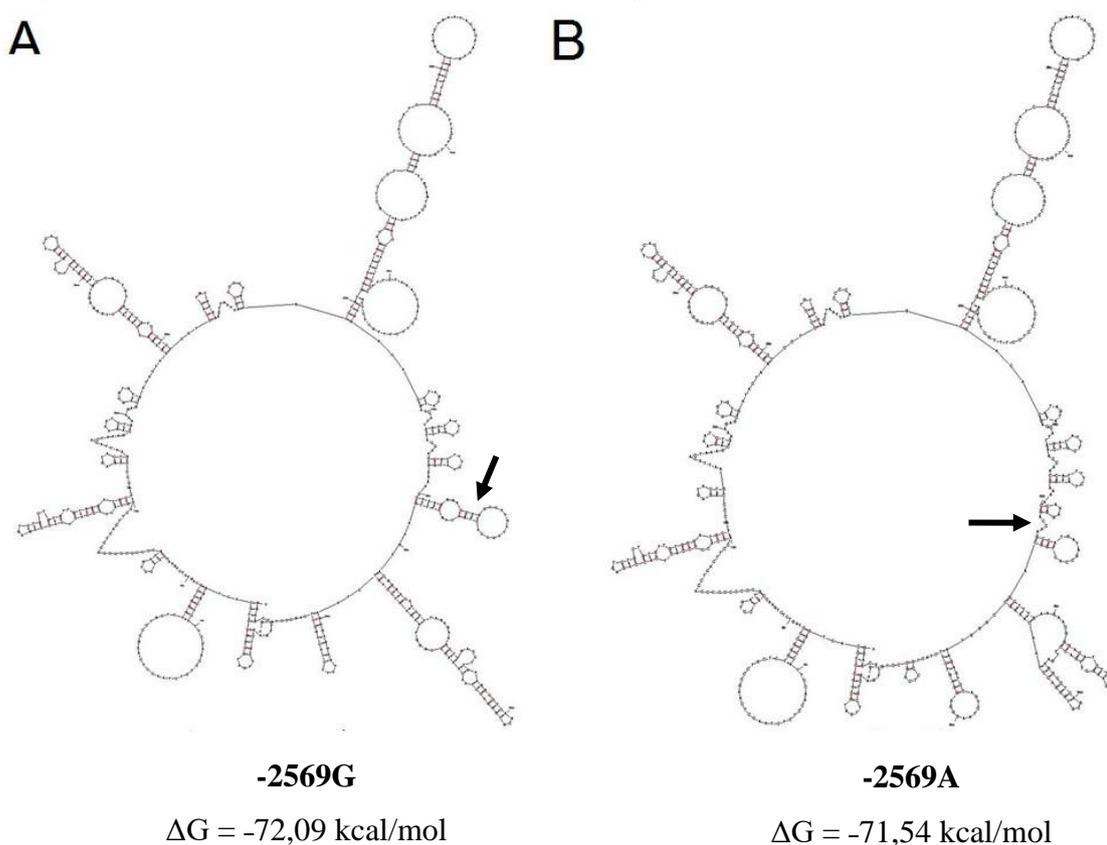


Figura 11. Predição das estruturas secundárias com o menor ΔG formadas pelas moléculas de DNA de fita simples do fragmento UCP2-2 para cada um dos alelos da mutação -2569G/A. (A) Estrutura formada na presença do alelo -2569G. (B) Estrutura formada na presença do alelo -2569A (-2569A). A seta indica a região em que a mutação está localizada. Energia livre da estrutura (ΔG).

A genotipagem dos animais para este polimorfismo foi realizada por meio da digestão dos fragmentos amplificados pelo par de *primers* UCP2-2 com a enzima de restrição *Hae*III, mesmo método utilizado por FERREIRA (2013). Com a digestão virtual das sequências, observou-se que, na presença do alelo -2569G, a enzima *Hae*III corta o fragmento UCP2-2 em sete sítios de restrição, o que resulta em oito fragmentos diferentes: 24, 11, 36, 322, 36, 107, 62 e 75 pb, relacionados aqui na ordem de corte. Já na presença do alelo -2569A, o sítio de corte que separa o fragmento de 107 pb do de 62 pb não existe, e o fragmento permanece íntegro, com 169 pb. Assim, a digestão deste alelo resulta em apenas sete fragmentos: 24, 11, 36, 322, 36, 169 e 75 pb, relacionados aqui também na ordem de corte.

O produto da digestão com a enzima *Hae*III no gel pode ser observado na Figura 12. As bandas menores que 50 pb não foram mostradas e são iguais nos dois alelos, dessa forma, nas amostras de homocigotos para o alelo -2569G são visualizadas 4 bandas: 322, 107, 75 e 62 pb. No caso dos homocigotos para o alelo -2569A, aparecem três bandas: 322, 169 e 75 pb. Nos animais heterocigotos estão presentes todos os fragmentos relatados para os homocigotos: 322, 169, 107, 75, 62 pb.

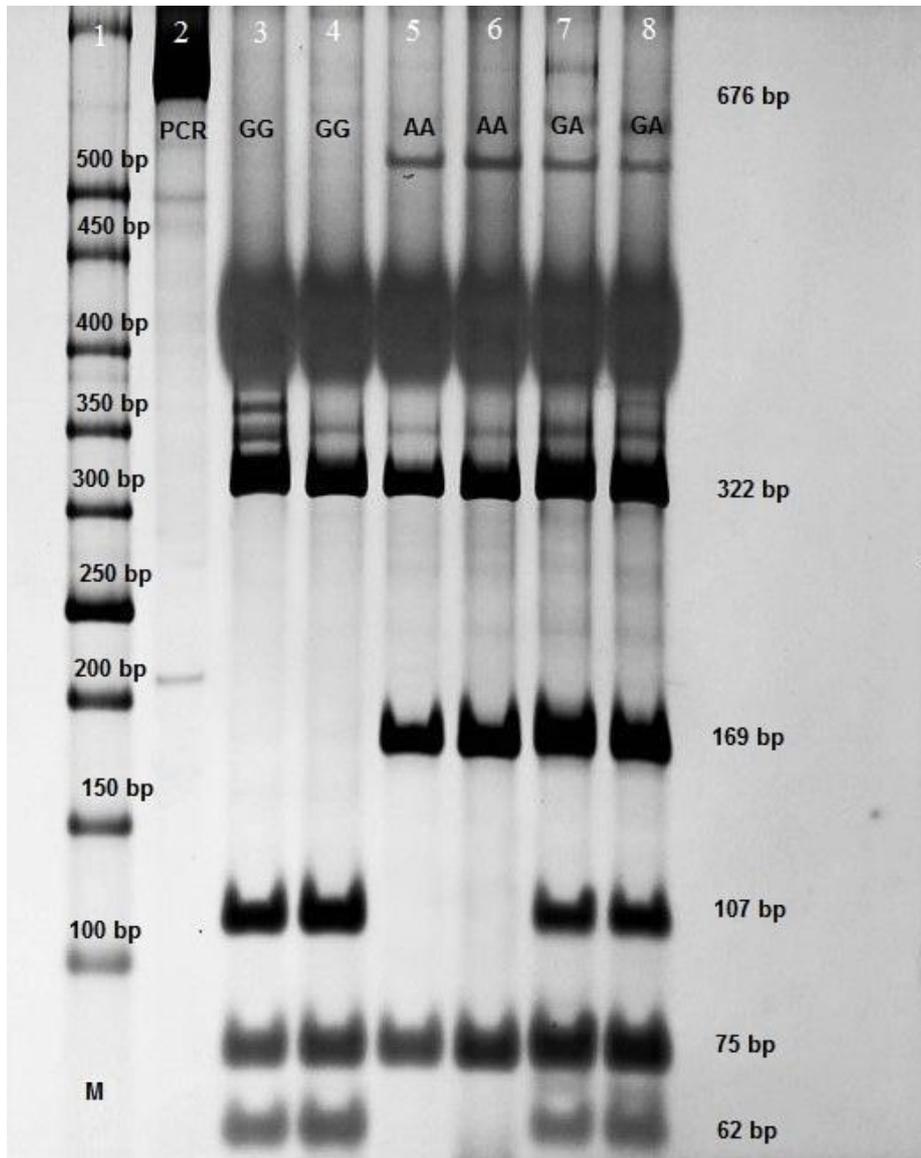


Figura 12. Gel representativo do padrão de bandas observado para cada um dos genótipos do polimorfismo -2569 G/A após a digestão do fragmento UCP2-2 com a enzima *Hae*III. Genótipo -2569GG (canaletas 3 e 4), genótipos -2569AA (canaletas 5 e 6), genótipo -2569GA (canaletas 7 e 8). Marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig biotecnologia), (M). Produto de PCR não digerido, PCR (canaleta 2). Pares de base, pb. Gel de poliácridamida 12% revelado com nitrato de prata.

Posteriormente à caracterização do polimorfismo avaliamos sua associação com o valor genético dos animais para características de produção e composição do leite. Na população estudada, o alelo -2569A apresentou frequência igual a 0,48 enquanto que o alelo -2569G apresentou frequência igual a 0,52. O genótipo -2569AA apresentou frequência de 0,25 o genótipo -2569AG de 0,47 e o genótipo -2569GG de 0,28. Em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a população avaliada também se mostrou em equilíbrio, o que sugere que não está ocorrendo seleção a favor de determinado alelo. Os testes de associação demonstram que o polimorfismo avaliado no éxon 2 apresentou associação com o valor genético dos animais para as características porcentagem de gordura, porcentagem de proteína e porcentagem de extrato seco. Para todas essas características os animais portadores do genótipo alelo -2569GG apresentaram médias superiores do que os animais portadores do genótipo -2569GA (Tabela 8). Resultados que sugerem que a seleção para animais com o alelo -2569G em homozigose pode levar ao aumento nos percentuais de gordura, proteína e extrato seco. Também foi observada associação deste polimorfismo com o valor genético dos animais para porcentagem de lactose, neste caso, os animais portadores do genótipo -2569AA apresentaram médias superiores a dos animais portadores do genótipo -2569GA.

Tabela 8. Associação dos genótipos encontrados para no fragmento *UCP2-2* com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite de caprinos.

Característica	Genótipos -2569G/A (n=177)			P-valor
	-2569GG ⁽¹⁾ (n=52)	-2569GA ⁽¹⁾ (n=87)	-2569AA ⁽¹⁾ (n=46)	
Produção Total	447,1974 ± 38,0506	454,9095 ± 36,6361	458,9511 ± 36,5934	0,2869
Produção de Gordura*	16,6312 ± 1,1000	16,6784 ± 1,0007	16,7665 ± 0,9129	0,7766
Produção de Proteína*	14,8164 ± 1,1116	14,8417 ± 0,9604	14,8860 ± 0,9020	0,9202
Produção de Extrato Seco	55,8018 ± 3,7803	56,2946 ± 3,5537	56,6831 ± 3,5006	0,4931
Produção de Lactose	4,5242 ± 1,3963	4,9256 ± 1,4392	5,1677 ± 1,5848	0,0973
Porcentagem de Gordura	3,6402 ± 0,1419 ^a	3,580 ± 0,1318 ^b	3,5941 ± 0,1100 ^{ab}	0,0366
Porcentagem de Proteína	3,2040 ± 0,1154 ^a	3,1483 ± 0,1224 ^b	3,1487 ± 0,1301 ^{ab}	0,0267
Porcentagem de Extrato Seco	12,1106 ± 0,2615 ^a	11,9748 ± 0,2536 ^b	12,0296 ± 0,2158 ^{ab}	0,0101
Porcentagem de Lactose	4,3590 ± 0,0770 ^{ab}	4,3478 ± 0,0843 ^b	4,3921 ± 0,0885 ^a	0,0181
Duração da Lactação	262,2580 ± 9,1605	263,0744 ± 7,9685	261,6966 ± 6,7480	0,6365
CCS	6,6057 ± 0,0357	6,6117 ± 0,0305	6,6114 ± 0,0296	0,5389

⁽¹⁾Valores expressos em valor genético da característica somado à média da característica ± desvio padrão do valor genético da característica.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

*Variável não obedeceu normalidade foi avaliada através de transformação logarítmica.

O polimorfismo -2569G/A está localizado em uma pequena matriz aberta de leitura que ocorre na região 5' UTR do gene *UCP2* (PECQUEUR et al., 2001). Embora a tradução deste peptídeo ainda não foi comprovada, a partir de estudos de mutagênese nesta região, observou-se o forte efeito inibitório desta matriz aberta de leitura sobre a tradução do mRNA do gene *UCP2* (HURTAUD et al., 2006), o que demonstra o importante papel regulatório desta região gênica. Além disso, embora seja pouco provável que elas ocorram em condições intracelulares, as alterações na estrutura secundária resultantes do polimorfismo -2569G/A preditas pelo software utilizado, são conhecidas pela sua capacidade de modificar a expressão

gênica (BIKARD et al., 2010; BRÁZDA et al., 2011). Dessa maneira, é possível que da mutação -2569G/A resultem alterações na expressão ou na tradução do gene *UCP2*.

Em estudo anterior com caprinos, avaliou-se a influência dos dois polimorfismos previamente descritos, -3708G/A e -2569G/A, sobre o valor genético dos animais para as características porcentagem de gordura e produção de gordura, porém, nenhuma associação foi encontrada. De acordo com os autores, o pequeno número de animais utilizados no estudo, apenas 40, pode não ter sido suficiente para avaliar estas associações (FERREIRA, 2013). Com o presente trabalho, foram encontradas associações destes dois polimorfismos com o valor genético dos animais para as características de porcentagem de gordura, porcentagem de proteína e porcentagem de extrato seco. Como o trabalho atual avaliou um número maior de animais, é possível que, assim como sugerido pelo autor, o número de animais utilizados no trabalho de FERREIRA (2013) tenha sido realmente pequeno para avaliar estas associações.

A existência de polimorfismos no gene *UCP2* também foi avaliada em bovinos. Em vacas leiteiras, um SNP na região promotora do gene *UCP2* apresenta associação com a idade ao primeiro parto e com o peso destes animais (CLEMPSON et al., 2011), e um SNP no éxon 2 apresenta associação com conversão alimentar e produção de carne magra (SHERMAN et al., 2008).

Nas células β -pancreáticas a expressão da *UCP2* tem papel central na regulação da secreção de insulina. Isto ocorre pois, o vazamento de prótons provocado pela *UCP2* reduz a sensibilidade destas células à glicose. Com isso, a liberação de insulina dependente de glicose é reduzida e ocorre a redução dos níveis plasmáticos deste hormônio (AFFOURTIT; BRAND, 2008). Já no tecido adiposo, a expressão da *UCP2* estimula a liberação de adiponectina, hormônio que aumenta a sensibilidade à insulina em diversos tecidos do organismo (CHEVILLOTTE et al., 2007). Neste ponto, alguns trabalhos apontam que, tanto a concentração de proteína, como a concentração de gordura no leite, sofrem influência das concentrações plasmáticas de insulina (BAUMAN; GRIINARI, 2001; GRIINARI et al., 1997; MACKLE et al., 2000). Portanto, caso os polimorfismos descritos acima alterem a expressão do gene *UCP2*, eles podem afetar a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas ou de adiponectina pelos adipócitos e assim influenciar os teores de gordura e de proteína no leite.

4.3 Polimorfismos no locus *LPL*

A partir do par de *primers* *LPL*, foi amplificado um fragmento de 154 pares de base. Posteriormente, com o intuito de buscar polimorfismos que estivessem no sítio de restrição da enzima, foi realizada a digestão com a enzima Anza™ 57 *Bpu*1102I (GCNAGC). De acordo com a digestão virtual da sequência, esta enzima corta este fragmento *LPL* em dois, um de 147 pb e outro de 7 pb. Porém, após a amplificação e digestão de 51 amostras nenhuma diferença no padrão de corte entre as amostras foi observada.

Uma vez que o tamanho do fragmento *LPL* é de apenas 154 pb e que ele amplifica apenas uma parte do primeiro éxon do gene *LPL*, para realizar as análises em uma região maior do gene, um novo *primer forward* foi desenhado. Com este novo *primer*, além de amplificar parte do éxon 1, também é possível amplificar parte da região promotora do gene. Por este motivo, o fragmento foi denominado *LPL-PR*. Após amplificação por PCR, os fragmentos *LPL-PR* de 20 amostras foram avaliados quanto a diferenças no padrão de migração em gel de poliacrilamida a 12%. Como também não foi encontrada nenhuma variação, em busca de polimorfismos, fragmentos *LPL-PR* de quatro amostras com valores genéticos contrastantes para a porcentagem de gordura do leite foram sequenciadas. Com isto, foi possível identificar uma transição C/T na posição 388 deste fragmento, posição que corresponde ao nucleotídeo 134 da sequência do gene *LPL* caprino (*Gene ID*: 100860750). Considerando a adenina do ATG que marca o sítio de início de tradução deste gene como o nucleotídeo +1, este polimorfismo está localizado na posição -170,

região 5' UTR, e por este motivo foi denominado -170C/T (Figura 13). Como também pode ser observado no alinhamento a sequência de caprinos usada como referência apresenta uma Citosina na posição do polimorfismo, assim como no alelo -170C.

```

NC_030815      CATTTTCTCCTCCCCACCTCCTCCTCCTCCGAGGAAACCTGCCGCTTCTAGCTCCCCAC
-170C         CATTTTCTCCTCCCCACCTCCTCCTCCTCCGAGGAAACCTGCCGCTTCTAGCTCCCCAC
-170T         CATTTTCTCCTCCCCACCTCCTCCTCCTCCGAGGAAACCTGCCGCTTCTAGCTCCCCAC
*****

```

Figura 13. Alinhamento das sequências da região do fragmento LPL-PR onde está localizado o polimorfismo -170C/T, região 5' UTR do gene *LPL*. Sequência de caprino utilizada como referência (NC_030815). Sequência do alelo -170C (-170C). Sequência do alelo -170T (-170T). Em negrito, posição em que ocorre o polimorfismo.

Como a mutação -170C/T está localizada na região 5' UTR do gene *LPL*, além de realizar avaliações *in silico* para verificar se dela decorrem alterações em sequências com potencial para formarem G-quadruplexes, também foi avaliado se ocorrem alterações nas estruturas secundárias, previstas *in silico*, tanto das moléculas de DNA de fita simples como das moléculas de RNA, porém, nenhuma alteração foi encontrada. Com o auxílio de algoritmos esta mutação também foi avaliada quanto a existência de enzimas de restrição capazes de diferenciar os alelos encontrados. Com isso, foi possível observar que a enzima *MboII* reconhece o alelo -170T e a enzima *HniI* reconhece o alelo -170C. Assim, é possível determinar o genótipo dos animais através da técnica de PCR-RFLP. Futuros trabalhos podem avaliar a distribuição deste polimorfismo na população e se ele apresenta alguma associação com características de produção e composição do leite.

4.4 Polimorfismos no locus *SCD*

Com o intuito de avaliar a existência de associação do polimorfismo 802 A/C, descrito por ZHANG et al. (2010), com o valor genético dos animais para características de produção e qualidade do leite. A partir do fragmento de 377 pb amplificado pelo par de *primers* descrito pelos autores, foram realizadas análises *in silico* para avaliar a existência de alguma enzima restrição que fosse capaz de reconhecer este polimorfismo, o que possibilitaria a genotipagem dos animais através da técnica de PCR-RFLP. A partir da digestão virtual da sequência, observou-se que, na presença do alelo 802C, o fragmento de 377 pb é cortado pela enzima *TspRI* (NNCASTGNN) na posição 202, o que resulta em dois fragmentos, um de 202 e outro de 175 pb. Já na presença do alelo A, não há corte pela enzima.

Posteriormente, 79 amostras foram amplificadas e submetidas à técnica de PCR-RFLP com a enzima descrita acima. Porém, em nenhuma das amostras ocorreu o corte do fragmento, o que caracteriza apenas a presença do alelo 802A. Devido a isto, para encontrar outras mutações e confirmar a ausência da mutação 802 A/C por outra técnica, realizamos o sequenciamento de bases deste fragmento em quatro animais que possuem valores genéticos contrastantes para o teor de gordura no leite. Com isso, observamos que todos os 4 animais eram portadores do alelo A para a mutação descrita acima, também não encontramos nenhuma nova mutação neste fragmento.

A partir dos resultados, podemos inferir que, ou o alelo G não corre na população utilizada neste estudo, ou então que ele está em uma frequência baixa e por isso não foi encontrado na amostragem realizada. De fato as raças utilizadas neste trabalho são diferentes das raças avaliadas no trabalho de ZHANG et al. (2010), que utilizou animais de três raças: Xuhuai, Boer e Haimen. Nas três, o alelo 802C foi menos frequente, com frequência média de

0,1896. Caso o alelo 802C apresentasse essa frequência na população estudada, com o número de animais avaliados, ele provavelmente seria encontrado, o que não ocorreu.

A região do éxon 6 faz parte da matriz aberta de leitura do gene *SCD*. Sabe-se que, por serem regiões que participam diretamente da codificação do peptídeo em si, estas regiões apresentam alto grau de conservação. Por este motivo, este polimorfismo pode não ocorrer na população utilizada neste trabalho. Análises com maior número de animais, podem confirmar esta hipótese e também avaliar se esta mutação ocorre em animais das raças Saanem e Alpina.

4.5 O Isolamento de RNA a partir das células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite

Uma vez que o polimorfismo descrito por HE et al. (2011) no gene *GPAT4* também apresentou associação com o valor genético de caprinos para o teor de gordura no leite em um outro trabalho desta mesma equipe (BAGATOLI, 2015), buscamos avaliar se este polimorfismo descrito no gene *GPAT4* e se os polimorfismos descritos acima nos genes *PPARG* e *UCP2* estão associados a alterações na expressão gênica, e se a expressão destes três genes varia no decorrer da lactação em células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite de caprinos. Para tanto, a partir do leite, foram realizadas coletas de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite de acordo com a procedimento descrito por SUÁREZ-VEGA et al. (2015). Este é um método não invasivo de avaliar a expressão gênica neste órgão que foi inicialmente descrito por BOUTINAUD et al. (2002). Posteriormente, diversos trabalhos demonstraram que a expressão gênica nessas células é semelhante com a expressão gênica em biópsias da glândula mamária, e que portanto, este método pode ser utilizado como forma de avaliar a expressão de genes neste órgão (BOUTINAUD; JAMMES, 2002; MURA et al., 2013; TORAL et al., 2016). Além disso, CÁNOVAS et al. (2015) avaliaram a semelhança do transcriptoma de biópsias da glândula mamária com diversas metodologias de isolamento destas células e observaram que a metodologia descrita por BOUTINAUD et al. (2002) é a mais representativa do transcriptoma deste órgão. Além de ser mais simples e não invasiva, esta metodologia tem um custo menor para realização das coletas, e por este motivo ela foi selecionada para a realização dos estudos de expressão gênica neste trabalho.

Anteriormente à realização das coletas para o experimento, foi executado um teste deste procedimento com três amostras de animais do setor de caprinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Neste teste, após a coleta e o isolamento das células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite, as amostras não foram congeladas e foram imediatamente utilizadas para o isolamento de RNA com o *kit* PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA). O procedimento funcionou de maneira adequada e foi possível isolar com sucesso RNA de boa qualidade. A imagem do gel utilizado para verificar a integridade do RNA destas amostras pode ser observada na Figura 14A. Posteriormente ao teste, procedeu-se a coleta das amostras de animais provenientes do setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa. Com a utilização do mesmo procedimento foram realizadas coletas entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017, com uma adaptação. Como as células não seriam utilizadas imediatamente para o isolamento de RNA, os *pellets* de células foram ressuspendidos em solução de PBS 1x-EDTA 0,05M e armazenados em nitrogênio líquido até o momento das análises, setembro de 2017. Ao proceder o isolamento de RNA destas amostras com o *kit* PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA), observou-se que as amostras apresentavam alto grau de degradação e que, ocorreu também, contaminação das amostras com grande quantidade de DNA (Figura 14B).

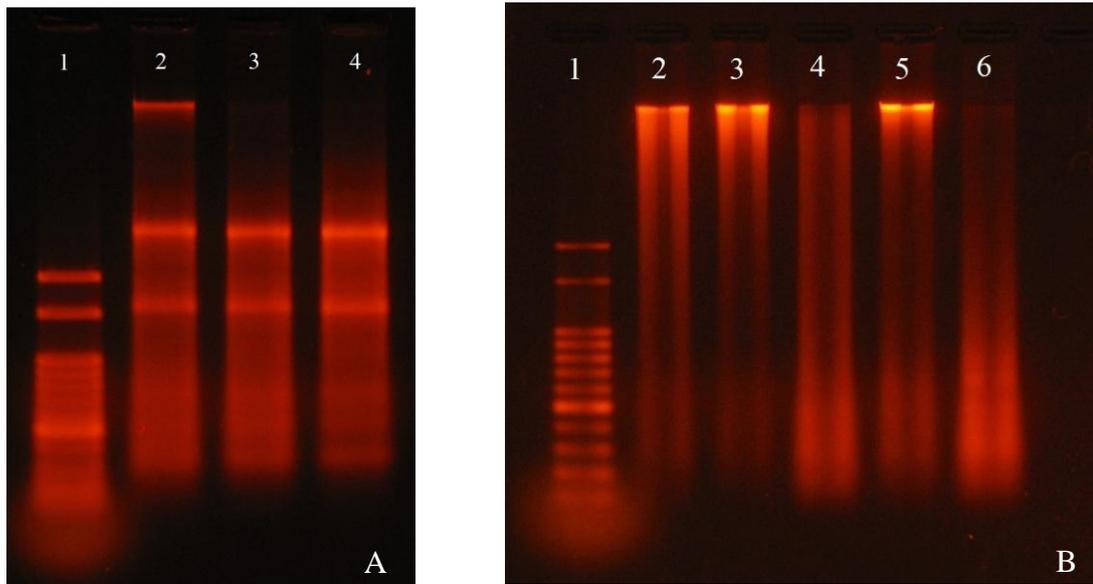


Figura 14. Imagem dos géis de amostras de RNA de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite isoladas com o uso do PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA). **(A)** amostras de RNA provenientes de extração de RNA realizada a partir de células recém coletadas sem congelamento (frescas). Marcador de peso molecular de 100 pb, Ludwig biotecnologia (canaleta 1) **(B)** amostras de RNA provenientes de extração de RNA realizada a partir de células congeladas e armazenadas por aproximadamente 1 ano (células congeladas). Marcador de peso molecular de 100 pb, Ludwig biotecnologia (canaleta 1). Gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium).

Devido ao fato de que estava ocorrendo contaminação das amostras com grandes quantidades de DNA, acreditamos que o protocolo que havia uma vez funcionado para células frescas poderia não estar funcionando adequadamente quando utilizado para células congeladas. Por este motivo procedemos a extração com o reagente Brazol® (LGC Biotecnologia). A partir deste procedimento observou-se também alto grau de degradação das amostras e novamente a contaminação das mesmas com grande quantidade de DNA, como pode ser observado na Figura 15A. Posteriormente, também realizamos a tentativa de extração com reagente TRIzol™ Reagent (Invitrogen, *Life Technologies*), porém, com este procedimento também observamos alto grau de degradação das amostras, apesar da menor quantidade de DNA, como pode ser observado na Figura 15B. Como um dos requisitos para a realização da análise de expressão gênica é a integridade do RNA, devido a degradação do RNA das amostras não foi possível realizar a análise de expressão gênica.

Como a partir da extração de RNA de células frescas foi possível extrair RNA integro, um dos prováveis motivos da degradação é a metodologia de armazenamento. Anteriormente ao congelamento, o *pellet* de células foi ressuscitado em uma solução de PBS-EDTA, assim como no trabalho de TUDISCO et al., (2014). Esses autores, no entanto, suplementaram a solução de PBS-EDTA com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% para a inativação de RNases, e posteriormente armazenaram as amostras a -80°C . Outros autores também utilizam nos passos do isolamento das células soluções de PBS-BSA ou PBS-EDTA que não contenham DEPC (BOUTINAUD et al., 2002; SUÁREZ-VEGA et al., 2015; WICKRAMASINGHE et al., 2012), porém em todos estes casos o pellet de células foi ressuscitado em Trizol e utilizado imediatamente para a extração de RNA. Apesar das amostras deste experimento terem sido armazenadas em nitrogênio líquido, considerado o melhor método de

armazenamento de material biológico, pode ser que o armazenamento em solução de PBS-EDTA, sem o DEPC, não tenha impedido a degradação do RNA e por este motivo não foi possível realizar o isolamento de RNA íntegro.

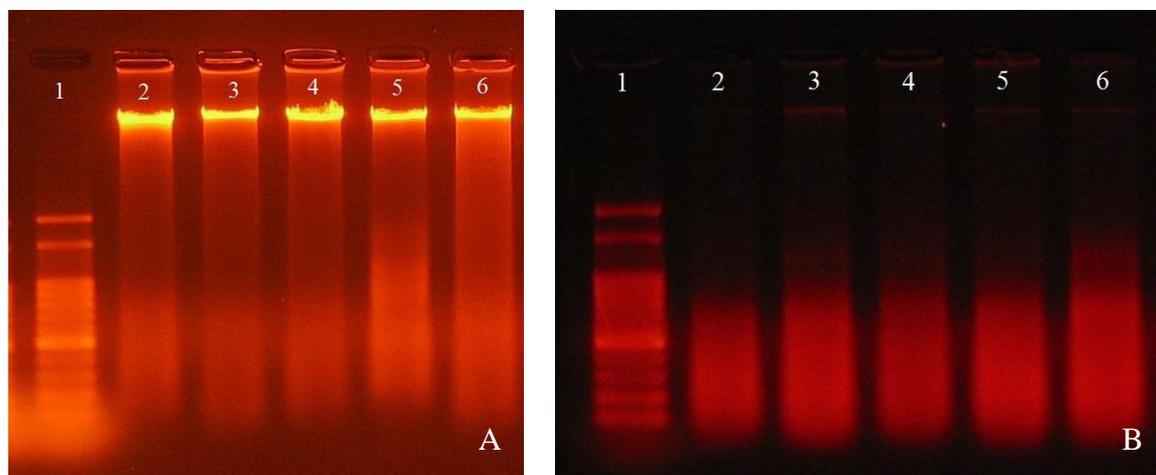


Figura 15. Imagem dos géis de amostras de RNA isoladas a partir de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite congeladas e armazenadas por aproximadamente 1 ano (células congeladas). (A) extração realizada com o reagente Brazol (*LGC Biotecnologia*). Marcador de peso molecular de 100 pb, Ludwig biotecnologia (canaleta 1) (B) extração realizada com o reagente TrizolTM (Invitrogen, *Life Technologies*). Marcador de peso molecular de 100 pb, Ludwig biotecnologia (canaleta 1). Gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium).

Neste caso da degradação das amostras, um outro fator que deve ser levado em consideração é o processo de descongelamento. Com o descongelamento, a temperatura das amostras aumenta consideravelmente e com isso pode ocorrer o aumento da atividade de RNases que irão degradar o RNA. Porém, um dado importante vai contra esta teoria. No trabalho de CIESLAK et al. (2015), os autores utilizaram amostras de leite congeladas em nitrogênio líquido dentro de tubos de 15 mL, volume bem superior ao da solução de células utilizadas no presente trabalho. Ao descongelar estas amostras os autores ainda foram capazes de isolar RNA de boa qualidade o que demonstra que, embora possa haver degradação durante o processo de descongelamento sua intensidade não é tão grande a ponto de degradar completamente o RNA das amostras.

Um terceiro ponto a ser levado em consideração é a metodologia utilizada para o isolamento do RNA. No trabalho de TUDISCO et al. (2014), os autores utilizaram células congeladas em solução de PBS-EDTA-DEPC, e para o isolamento do RNA utilizaram o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). No presente trabalho foram utilizadas três metodologias de extração, o kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA) e os reagentes Brazol (*LGC Biotecnologia*) e TrizolTM (Invitrogen, *Life Technologies*). Porém, com todas as metodologias obteve-se apenas RNA degradado. Dessa maneira, tendo em vista que utilizamos três metodologias diferentes, dentre as quais está uma metodologia que utiliza coluna (PureLink® RNA Mini Kit), semelhante à utilizada pelos autores supracitados, é pouco provável que a degradação do RNA seja proveniente da metodologia extração.

Portanto, em vista dos dados apresentados acima, é possível que a degradação do RNA tenha ocorrido devido à metodologia utilizada para o armazenamento das amostras. A grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura relata que a extração do RNA foi realizada

imediatamente após o isolamento das células do leite. No presente trabalho, apesar das amostras terem sido armazenadas em nitrogênio líquido, é possível que devido à falta de uma solução estabilizante de RNA na solução de armazenamento, tenha ocorrido a degradação. Em vista disto, nos casos em que seja necessário armazenar amostras deste tipo é importante utilizar soluções que estabilizem a molécula de RNA ou que inibam a ação de RNAses como soluções suplementadas com DEPC 0,1% ou então em reagentes como o TrizolTM (Invitrogen, *Life Technologies*).

4.6 Expressão gênica no músculo *Longissimus lumborum*

Como não foi possível realizar as análises de expressão gênica nas células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite devido a degradação do RNA das amostras coletadas neste trabalho, optamos por utilizar os *primers*, já sintetizados, para avaliar a expressão dos genes *PPARG*, *UCP2*, e *GPAT4* em amostras de cDNA provenientes do trabalho de GARCIA (2017). Estas amostras consistem de cDNA do músculo *longissimus lumborum* de caprinos machos das raças Saanem e Alpina abatidos com aproximadamente 150 dias de idade. Como no trabalho de GARCIA (2017), também foram coletados dados fenotípicos de peso ao abate (PA), peso de carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC), também foi possível aproveitar estes dados e avaliar se a expressão dos três genes apresentam alguma correlação com estas características.

4.6.1 Eficiência do *primers* utilizados

Para avaliar se as condições utilizadas possibilitam o funcionamento adequado das reações de PCR em tempo real, foram realizados testes de eficiência para cada par de *primers*. A eficiência da reação foi avaliada através da inclinação da reta de uma equação de regressão da concentração de cDNA *versus* o Ct das amostras. Em uma reação ideal, o valor da inclinação é o mais próximo de -3,32, que corresponde a 100% de eficiência. A confiabilidade do resultado pode ser avaliada através do coeficiente de determinação (R^2), que deve apresentar o valor próximo de 1.

Os valores de eficiência das reações, de inclinação das retas e os coeficientes de correlação, para cada um dos pares de *primers* utilizados, podem observados na Tabela 9. De acordo com o boletim técnico da empresa *Applied Biosystems*, (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/pcr-understanding-ct-application-note.html>), esses valores estão dentro do limite considerado adequado para a para reações de PCR quantitativo (qPCR). De acordo com o este boletim, a eficiência pode variar de 90 a 110% e o coeficiente de correlação deve ser próximo a 1. A eficiência mais distante de 100% obtida foi a do par de *primers* GPAT4, que apresentou eficiência de 106,28.

Tabela 9. Tabela com a eficiência de cada um dos pares de *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Slope	R^2	Eficiência
<i>PPARG</i>	3,421	0,998	96,02
<i>UCP2</i>	3,269	0,998	102,26
<i>GPAT4</i>	3,180	1,00	106,28
<i>EEF1A2</i>	3,222	0,998	104,35
<i>HMBS</i>	3,253	0,997	103,09

Inclinação da reta (*Slope*).

Coefficiente de determinação (R^2).

Eficiência da reação de PCR em tempo real (Eficiência).

4.6.2 Avaliação da especificidade das reações e Ct médio

Além da avaliação da eficiência da reação, para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real, também é importante que ocorra a amplificação de um fragmento único. Esta avaliação é realizada através da curva de dissociação (curva de *melting*) que deve apresentar pico único, demonstrando a amplificação de apenas um fragmento de PCR (BUSTIN et al., 2009). Os resultados da curva de dissociação das reações com os três pares de *primers* utilizados para amplificar os genes alvo (*PPARG*, *UCP2* e *GPAT4*), e dos pares de *primers* utilizados para amplificar os genes de referência utilizados, podem ser observados na Figura 16. Os resultados demonstram que para todos os genes as reações foram específicas e ocorreu a amplificação de apenas um fragmento de PCR.

Outro valor importante a ser avaliado é a faixa de Ct na qual os genes são expressos. A partir dos resultados das reações de PCR em tempo real realizadas na 10 amostras utilizadas neste experimento, foi possível obter a média do valor de Ct (\pm desvio padrão) para cada um dos genes avaliados, esses valores podem ser observados na Figura 16F.

4.6.3 Genes de referência

Como as amostras utilizadas neste experimento foram as mesmas utilizadas por GARCIA (2017), e este autor avaliou a estabilidade de três genes de referência (*EEF1A2*, *HMBS* e *GAPDH*) selecionamos para este experimento os dois genes que apresentaram melhor estabilidade no trabalho deste autor. Posteriormente, para selecionar entre os dois qual seria o melhor gene de referência, foi utilizado o programa *RefFinder* (XIE et al., 2012). Este algoritmo avalia qual o melhor controle endógeno a partir de outros quatro algoritmos: Δ Ct (SILVER et al., 2006), *Bestkeeper* (PFAFFL et al., 2004), *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTTOFT, 2004). A partir destas avaliações, o programa elenca qual dos genes analisados é o mais estável e, portanto, o melhor gene de referência para as condições experimentais. Com base nestas avaliações o programa *RefFinder* elencou o gene *EEF1A2* como o melhor gene de referência entre os dois avaliados. Dos quatro *softwares* que o *RefFinder* utiliza, três deles selecionaram o *EEF1A2*, o *Delta Ct*, o *Best Keeper* e o *NormFinder*, enquanto que o *GenNorm* não encontrou diferença entre os dois genes e selecionou os dois (Tabela 10). Porém, as diferenças entre os valores de Ct obtidos entre o gene *HMBS* e os genes alvo avaliados no trabalho foi muito grande (Figura 16F). Diferenças grandes entre os valores de Cts do gene de referencia e dos genes alvo podem levar a resultados viesados (TURABELIDZE; GUO; DIPIETRO, 2010), por este motivo, neste trabalho, optamos por utilizar o gene *HMBS*, e não o gene *EEF1A2*, como gene de referência.

Tabela 10. Tabela do ranking do melhor gene de referência gerado pelo algoritmo *RefFinder* a partir das análises realizadas pelos programas *Delta CT*, *BestKeeper*, *Normfinder*, *Genorm*.

Método	Ordem de Ranqueamento (Melhor - Bom - Médio)	
	1	2
<i>Delta CT</i>	EEF1A2	HMBS
<i>BestKeeper</i>	EEF1A2	HMBS
<i>Normfinder</i>	EEF1A2	HMBS
<i>Genorm</i>	HMBS EEF1A2	
Ranqueamento recomendado	EEF1A2	HMBS

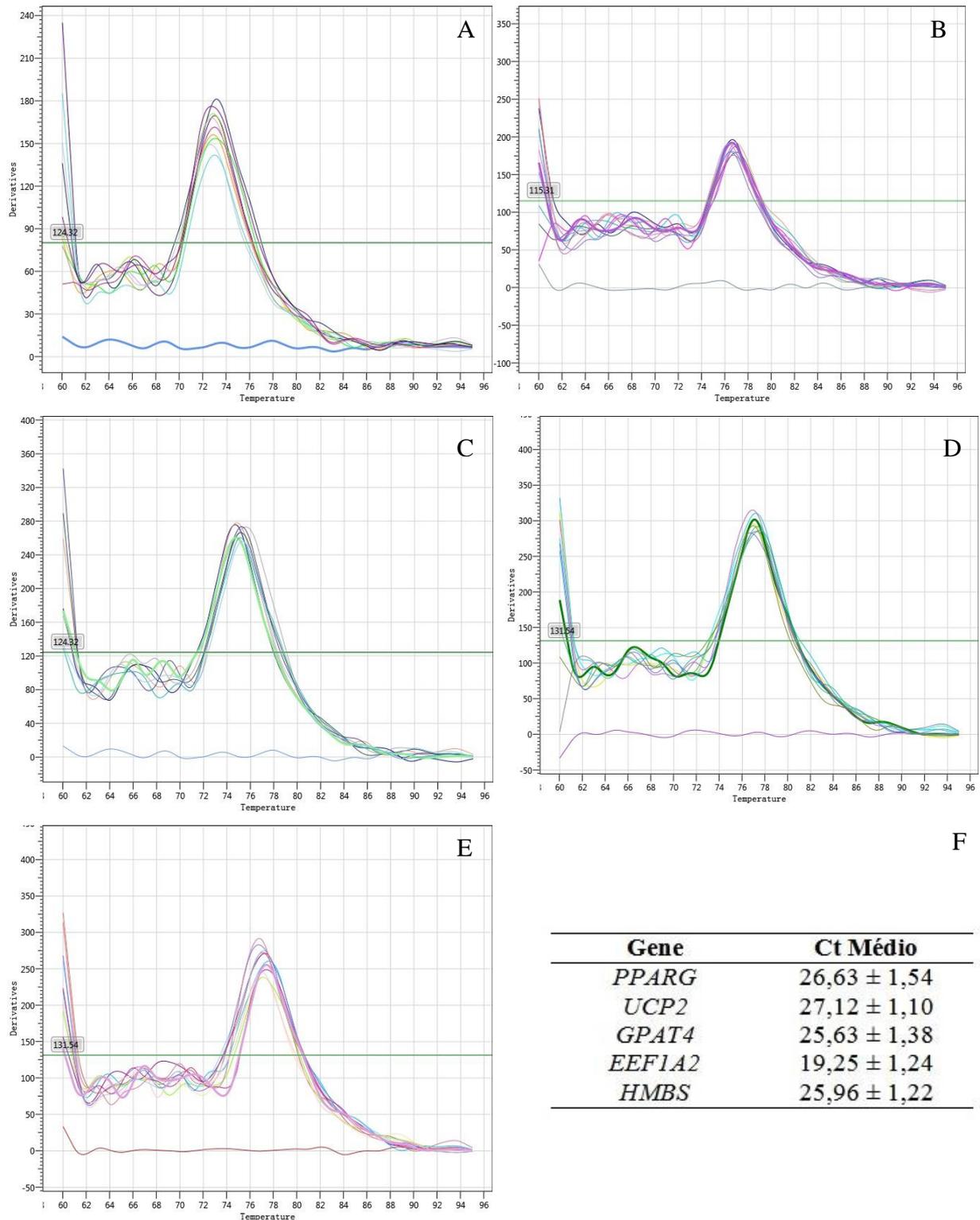


Figura 16. Curvas de dissociação dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real para análise de expressão gênica em músculo *Longissimus lumbarum* e média do valor de Ct obtido para cada um dos genes avaliados. *PPARG* (A), *UCP2* (B), *GPAT4* (C), *EEF1* (D), *HMBS* (E), média do valor de Ct (\pm desvio padrão) obtida a partir das reações de PCR em tempo real das 10 amostras utilizadas neste experimento para cada gene (F).

4.6.4 Correlação da expressão gênica com as características fenotípicas avaliadas

Através de análise de correlação de Pearson seguida pelo teste T-student, foi possível avaliar se a expressão dos genes *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4* estavam correlacionadas entre si ou com alguma das variáveis fenotípicas avaliadas: peso ao abate (PA), peso de carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC). Os resultados desta análise estão disponíveis na Tabela 11.

A expressão do gene *PPARG* apresentou correlação positiva com a expressão do gene *GPAT4*. Isso significa, que o aumento na expressão de algum destes dois genes pode levar ao aumento na expressão do outro. É muito provável que esta correlação positiva ocorra devido ao papel do fator de transcrição codificado pelo gene *PPARG*, o PPAR- γ , tenha sobre o gene *GPAT4*. Atualmente sabe-se que o tratamento de células epiteliais da glândula mamária de bovinos com agonistas do PPAR- γ provoca o aumento na expressão do gene *GPAT4* (KADEGOWDA et al., 2009) e que, em células epiteliais da glândula mamária de caprinos, superexpressão do gene *PPARG* provoca o aumento na expressão do gene *GPAT4* (SHI et al., 2014). De acordo com os dois autores supracitados, o provável motivo destes resultados é o fato de que o gene *GPAT4* é um possível alvo do gene PPAR- γ nestes tipos celulares. A correlação positiva entre a expressão destes dois genes observada neste trabalho sugere que a no tecido muscular o gene *GPAT4* também seja um gene alvo do PPAR- γ . Futuros trabalhos que avaliem o efeito do tratamento de células do tecido muscular com agonistas do PPAR- γ sobre a expressão do gene *GPAT4* poderão auxiliar neste entendimento.

Tabela 11. Correlação de Pearson entre a expressão dos genes $1/(2^{-\Delta C_t})$ *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4* entre si e com as variáveis peso ao abate (PA), peso da carcaça (PC) e força de cisalhamento (FC).

Características	Correlações	P-valor
PA-PPARG	-0,15196	0,6752
PA-UCP2	0,07329	0,8405
PA-GPAT4	-0,31354	0,3777
PC-PPARG	-0,02361	0,9484
PC-UCP2	0,20223	0,5753
PC-GPAT4	-0,16972	0,6392
FC-PPARG	-0,48533	0,1550
FC-UCP2	-0,22182	0,5379
FC-GPAT4	-0,30507	0,3914
PPARG-UCP2	0,01612	0,9647
PPARG-GPAT4*	0,79278	0,0062
UCP2-GPAT4	0,24621	0,5712

*Correlações com $P > 0,05$.

4.6.5 Expressão gênica entre os grupos formados para cada uma das características avaliadas (FC, PA e PC)

Para avaliar se diferenças nas características FC, PA e PC estão associadas à expressão genes *PPARG*, *UCP2* e *GPAT4*, através do teste T, foi observado se ocorrem diferenças na expressão entre os diferentes grupamentos realizados para cada uma das características. Por exemplo, entre animais de maior peso e animais de menor peso. Na Tabela 12 podem ser observadas as médias e desvios padrão da expressão gênica entre esses diferentes grupos de cada uma das características avaliadas. Com isso, é possível observar que não ocorrem diferenças na expressão gênica entre os grupos.

Tabela 12. Médias e desvio padrão da expressão gênica $1/(2^{-\Delta C_t})$ entre os diferentes grupos, para cada uma das características avaliadas, FC, PA e PC.

Força de Cisalhamento	Maior⁽¹⁾ (n = 5)	Menor⁽¹⁾ (n = 5)	P-valor
PPARG	2,4144 ± 1,6320	1,6076 ± 1,1505	0,3927
UCP2	2,8773 ± 1,6373	2,7398 ± 2,3714	0,9176
GPAT4	0,9569 ± 0,4494	0,8038 ± 0,3550	0,5665
Peso ao Abate	Maior⁽¹⁾ (n = 5)	Menor⁽¹⁾ (n = 5)	P-valor
PPARG	2,4063 ± 1,8165	1,6157 ± 0,8388	0,4027
UCP2	3,0282 ± 2,1950	2,5889 ± 1,8377	0,7404
GPAT4	1,0013 ± 0,3191	0,7594 ± 0,4519	0,3568
Peso da Carcaça	Maior⁽¹⁾ (n = 5)	Menor⁽¹⁾ (n = 5)	P-valor
PPARG	2,2919 ± 1,7639	1,7301 ± 1,0418	0,5567
UCP2	2,8057 ± 2,2592	2,8113 ± 1,7922	0,9967
GPAT4	1,0354 ± 0,3629	0,7253 ± 0,3883	0,2283

⁽¹⁾Valores da expressão gênica, expressos em $1/(2^{-\Delta C_t})$.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificados novos polimorfismos nos genes *LPL*, *UCP2* e *PPARG*, mas não foram encontrados polimorfismos na região avaliada do gene *SCD*.

Na região promotora do gene *PPARG* foram identificados dois polimorfismos, -282delGAG e -206G/T, porém, não foi possível identificar qual deles é responsável pela diferença de migração observada no fragmento amplificado com o par de *primers* *PPARG*. O polimorfismo responsável por esta diferença apresenta associação com o valor genético dos animais para as características de produção total de leite, produção de gordura, produção de proteína, produção de extrato seco, produção de lactose e porcentagem de lactose.

Dos polimorfismos avaliados no *locus UCP2*, tanto o polimorfismo -3708G/A, identificado pela diferença de migração observada no fragmento *UCP2-PR*, como o polimorfismo -2569G/A, identificado através da digestão do fragmento amplificado pelo par de *primers UCP2-2* com a enzima de restrição *HaeIII*, apresentam associação com o valor genético dos animais para as características porcentagem de proteína, porcentagem de gordura e porcentagem extrato seco. Além disso, o polimorfismo -2569G/A também apresenta associação com o valor genético dos animais para porcentagem de lactose.

A metodologia utilizada para coleta e armazenamento de células de descamação do epitélio da glândula mamária presentes no leite não é adequada para posteriores análises de expressão gênica.

No músculo *longissimus lumborum* de caprinos existe correlação positiva entre a expressão dos genes *PPARG* e *GPAT4*, o que sugere que o gene *GPAT4* é um gene alvo do *PPARG-γ* neste tecido.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFOURTIT, C.; BRAND, M. D. On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 973–979, jul. 2008.
- AKIRA, S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. **Stem Cells**, v. 17, n. 3, p. 138–146, maio 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER P. **Molecular biology of the cell**. 4^a ed. Garland Science, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.
- ARMONI, M.; HAREL, C.; KARNI, S.; CHEN, H.; BAR-YOSEPH, F.; MAREL R. VER, M. R.; MICHAEL J. QUON, M. J.; KARNIELI, E. FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and -gamma2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 29, p. 19881–91, 21 jul. 2006.
- ARSENJEVIC, D. ONUMA, H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B. S.; MIROUX, B.; COUPLAN, E.; ALVES-GUERRA, M.; GOUBERN, M.; SURWIT, R.; BOUILLAUD, F.; RICHARD, D.; COLLINS, S.; RICQUIER, D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. **Nature Genetics**, v. 26, n. 4, p. 435–439, dez. 2000.
- AUBOEUF, D.; RIEUSSET, J.; FAJAS, L.; VALLIER, P.; FRERING, V.; RIOU, J. P.; STAELS, B.; AUWERX, J.; LAVILLE, M.; VIDAL, H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1319–27, ago. 1997.
- BADAOU, B.; SERRADILLA, J. M.; TOMÀS, A.; URRUTIA, B.; ARES, J. L.; CARRIZOSA, J.; SÀNCHEZ, A.; JORDANA, J.; AMILLS, M. Short communication: Identification of two polymorphisms in the goat lipoprotein lipase gene and their association with milk production traits. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 3012–7, 2007.
- BAGATOLI, A. **Polimorfismo e Expressão de Genes Envolvidos com a Mobilização de Gordura no Período do Pós-parto em Cabras Leiteiras**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2015.
- BARAK, Y.; NELSON, M. C.; ONG, E. S.; JONES, Y. Z.; RUIZ-LOZANO, P.; CHIEN, K. R.; KODER, A.; EVANS, R. M. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 585–95, out. 1999.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, n. 1–2, p. 15–29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; HARVATINE, K. J.; LOCK, A. L. Nutrigenomics, rumen-derived

bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. **Annual review of nutrition**, v. 31, p. 299–319, 21 ago. 2011.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of animal science**, v. 80, n. 5, p. 1285–93, maio 2002.

BEIGNEUX, A. P.; VERGNES, L.; QIAO, X.; QUATELA, S.; DAVIS, R.; WATKINS, S. M.; COLEMAN, R. A.; WALZEM, R.L.; PHILIPS, M.; REUE, K.; YOUNG, S. G. *Agpat6* - a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 4, p. 734–744, abr. 2006.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; HAYES, H.; GAUTIER, M.; CHILLIARD, Y.; MARTIN, P. Characterization of the caprine stearyl-CoA desaturase gene and its mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. **Gene**, v. 281, n. 1–2, p. 53–61, 27 dez. 2001.

BIKARD, D.; LOOT, C.; BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 4, p. 570–588, 1 dez. 2010.

BIONAZ, M.; CHEN, S.; KHAN, M. J.; LOOR, J. J. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research**, v. 2013, 2013.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis.pdf. **BioMed Central**, v. 9, p. 366, 2008.

BLECKMANN, S. C.; BLENDY, J. A.; RUDOLPH, D.; MONAGHAN, A. P.; SCHMID, W.; SCHÜTZ, G. Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 6, p. 1919–25, mar. 2002.

BOUTINAUD, M.; RULQUIN, H.; KEISLER, D. H.; DJIANE, J.; JAMMES, H. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. **Journal of animal science**, v. 80, n. 5, p. 1258–69, maio 2002.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENTA, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction, nutrition, development**, v. 44, n. 5, p. 499–508, 2004.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction, nutrition, development**, v. 42, n. 2, p. 133–47, 2002.

BRADLEY, R. L.; FISHER, F. F. M.; MARATOS-FLIER, E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 16, n. 5, p. 938–44, maio 2008.

BRAND, M. D.; ESTEVES, T. C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Cell Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 85–93, ago. 2005.

BRÁZDA, V.; LAISTER, R. C.; JAGELSKÁ, E. B.; ARROWSMITH, C. Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. **BMC Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 33, 5 ago. 2011.

BUCKLAND, P. R. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their

mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1762, n. 1, p. 17–28, jan. 2006.

BURLEY, S. K. The TATA box binding protein. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 1, p. 69–75, fev. 1996.

BUSIELLO, R. A.; SAVARESE, S.; LOMBARDI, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 36, 2015.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CÁNOVAS, A.; RINCÓN, G.; BEVILACQUA, C.; ISLAS-TREJO, A.; BRENAUT, P.; HOVEY, R.C.; BOUTINAUD, M.; MORGENTHALER, C.; VANKLOMPENBERG, M. K.; MARTIN, P.; MEDRANO, J. F. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5297, 8 maio 2015.

CHEN, X.; WANG, K.; CHEN, J.; GUO, J.; YIN, Y.; CAI, X.; GUO, X.; WANG, G.; YANG, R.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; WANG, J.; XIANG, Y.; WENG, C.; ZEN, K.; ZHANG, J.; ZHANG, C. Y. In Vitro Evidence Suggests That miR-133a-mediated Regulation of Uncoupling Protein 2 (UCP2) Is an Indispensable Step in Myogenic Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5362–5369, 20 fev. 2009.

CHEN, Y. Q.; KUO, M. S.; LI, S.; BUI, H. H.; PEAKE, D. A.; SANDERS, P.E.; THIBODEAUX, S. J.; CHU, S.; QIAN, Y. W.; ZHAO, Y.; BREDT, D. S.; MOLLER, D. E.; KONRAD, R. J.; BEIGNEUX, A. P.; YOUNG, S. G.; CAO, G. AGPAT6 Is a Novel Microsomal Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 15, p. 10048–10057, 11 abr. 2008.

CHEVILLOTTE, E. C.; GIRALT, M.; MIROUX, B.; RICQUIER, D.; VILLARROYA, F. Uncoupling Protein-2 Controls Adiponectin Gene Expression in Adipose Tissue Through the Modulation of Reactive Oxygen Species Production. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1042–1050, 1 abr. 2007.

CIESLAK, J.; MACKOWSKI, M.; CZYZAK-RUNOWSKA, G.; WOJTOWSKI, J.; PUPPEL, K.; KUCZYNSKA, B.; PAWLAK, P. Screening for the Most Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies in Equine Milk Somatic Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139688, 5 out. 2015.

CLEMPSON, A. M.; POLLOTT, G. E.; BRICKELL, J. S.; BOURNE, N. E.; MUNCE, N.; WATHES, D. C. Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. **Animal**, v. 5, n. 9, p. 1335–1343, 11 ago. 2011.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 2, p. 134–76, mar. 2004.

CRYER, A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. **International Journal of Biochemistry**, v. 13, n. 5, p. 525–541, 1981.

D'ALFONSO, S.; RICHIARDI, P. M. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. **Immunogenetics**, v. 39, n. 2, p. 150–4, 1994.

- DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. the Use of Molecular Genetics in the Improvement of Agricultural Populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 1, p. 22–32, 2002.
- DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological reviews**, v. 86, p. 465–514, 2006.
- DIANO, S.; HORVATH, T. L. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 1, p. 52–58, jan. 2012.
- DONADELLI, M.; DANDO, I.; FIORINI, C.; PALMIERI, M. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1171–1190, 27 abr. 2014.
- DREYER, C.; KREY, G.; KELLER, H.; GIVEL, F.; HELFTENBEIN, G.; WAHLI, W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879–887, 1992.
- ENOCH, H. G.; CATALÁ, A.; STRITTMATTER, P. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. **The Journal of biological chemistry**, v. 251, n. 16, p. 5095–103, 25 ago. 1976.
- FAJAS, L.; AUBOEUF, D.; RASPÉ, E.; SCHOONJANS, K.; LEFEBVRE, A. M.; SALADIN, R.; NAJIB, J.; LAVILLE, M.; FRUCHART, J. C.; DEEB, S.; VIDAL-PUIG, A.; FLIER, J.; BRIGGS, M. R.; STAELS, B.; VIDAL, H.; AUWERX, J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18779–89, 1997.
- FAN, Y. Y.; ZAN, L. S.; FU, C. Z.; TIAN, W. Q.; WANG, H. B.; LIU, Y. Y.; XIN, Y. P. Three novel SNPs in the coding region of PPAR γ gene and their associations with meat quality traits in cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 1, p. 131–137, 21 jan. 2011.
- FERREIRA, L. **Polimorfismo e Expressão do Gene da Ucp2 no Fígado de Cabras em Lactação**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.
- FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAINBAULT, S.; CHAMPIGNY, O.; MEYRUEIS, L. C.; BOUILLAUD, M. F.; SURWIT, R. S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C. H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, v. 15, n. 3, p. 269–272, 1 mar. 1997.
- FOX, K. E.; FANKELL, D. M.; ERICKSON, P. F.; MAJKA, S. M.; CROSSNO, J. T. JR.; KLEMM, D. J. Depletion of cAMP-response Element-binding Protein/ATF1 Inhibits Adipogenic Conversion of 3T3-L1 Cells Ectopically Expressing CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) α , C/EBP β , or PPAR γ 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40341–40353, 29 dez. 2006.
- FUCCI, A.; COLANGELO, T.; VOTINO, C.; PANCIONE, M.; SABATINO, L.; COLANTUONI, V. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the esophageal, gastric, and colorectal cancer. **PPAR Research**, v. 2012, 2012.
- GARCÍA-ROJAS, P.; ANTARAMIAN, A.; GONZÁLEZ-DÁVALOS, L.; VILLARROYA, F.; SHIMADA, A.; VARELA-ECHAVARRÍA, A.; MORA, O. Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue^{1,2}. **Journal of animal science**, v. 88, n. 5, p. 1801–8, maio 2010.

GARCIA, O. S. R. **Utilização de marcadores moleculares na análise da característica de qualidade da carne em caprino (*Capra hircus*)**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.

GARLID, K. D.; JABŮREK, M.; JEZEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. **FEBS letters**, v. 438, n. 1–2, p. 10–4, 30 out. 1998.

GARNEAU, H.; PAQUIN, M. C.; CARRIER, J. C.; RIVARD, N. E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 2, p. 350–358, nov. 2009.

GOLDBERG, I. J.; MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 6, p. D388–405, 1 mar. 2001.

GRIINARI, J. M.; MCGUIRE, M. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E.; BARBANO, D. M.; HOUSE, W. A. The Role of Insulin in the Regulation of Milk Protein Synthesis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2361–2371, out. 1997.

GROMMES, C.; LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 7, p. 419–29, jul. 2004.

HAVEL, R. J.; GORDON, R. S. Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in an affected family. **The Journal of clinical investigation**, v. 39, n. 10, p. 1777–1790, 1960.

HE, C.; WANG, C.; CHANG, Z. H.; GUO, B. L.; LI, R.; YUE, X. P.; LAN, X. Y.; CHEN, H.; LEI, C. Z. AGPAT6 polymorphism and its association with milk traits of dairy goats. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2747–2756, 4 nov. 2011.

HE, W.; BARAK, Y.; HEVENER, A.; OLSON, P.; LIAO, D.; LE, J.; NELSON, M.; ONG, E.; OLEFSKY, J. M.; EVANS, R. M. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15712–7, 23 dez. 2003.

HEINEMANN, F. S.; OZOLS, J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 68, n. 2, p. 123–33, fev. 2003.

HEVENER, A. L.; HE, W.; BARAK, Y.; LE, J.; BANDYOPADHYAY, G.; OLSON, P.; WILKES, J.; EVANS, R. M.; OLEFSKY, J. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. **Nature medicine**, v. 9, n. 12, p. 1491–7, dez. 2003.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697–703, 3 maio 1996.

HUA, L.; WANG, J.; CHEN, F.; HU, S.; CHEN, H. The peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARG) gene polymorphisms and associations with body measurements of cattle. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 14, p. 2785–2790, 2011.

HUANG, P.; CHANDRA, V.; RASTINEJAD, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 247–72, 2010.

HUPPERT, J. L.; BALASUBRAMANIAN, S. Prevalence of quadruplexes in the human

- genome. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2908–2916, 16 maio 2005.
- HUPPERT, J. L.; BALASUBRAMANIAN, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 2, p. 406–13, 2007.
- HURTAUD, C.; GELLY, C.; BOUILLAUD, F.; LÉVI-MEYRUEIS, C. Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 15, p. 1780–1789, 17 ago. 2006.
- HURTAUD, C.; GELLY, C.; CHEN, Z.; LÉVI-MEYRUEIS, C.; BOUILLAUD, F. Glutamine stimulates translation of uncoupling protein 2 mRNA. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 14, p. 1853–1860, 18 jul. 2007.
- ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645–650, 18 out. 1990.
- KADEGOWDA, K.; BIONAZ, M.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A.; LOOR, J. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 9, p. 4276–89, 2009.
- KANG, Y.; HENGBO, S.; JUN, L.; JUN, L.; WANGSHENG, Z.; HUIBIN, T.; HUAIPING, S. PPAR γ modulated lipid accumulation in dairy GMEC via regulation of ADRP gene. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 192–201, 2015.
- KAUL, S.; BLACKFORD, J. A. JR.; CHEN, J.; OGRYZKO, V. V.; SIMONS, S. S. JR. Properties of the Glucocorticoid Modulatory Element Binding Proteins GMEB-1 and -2: Potential New Modifiers of Glucocorticoid Receptor Transactivation and Members of the Family of KDWK Proteins. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 1010–1027, jul. 2000.
- KAUSHIK, M.; KAUSHIK, S.; ROY, K.; SINGH, A.; MAHENDRU, S.; KUMAR, M.; CHAUDHARY, S.; AHMED, S.; KUKRETI, S. A bouquet of DNA structures: Emerging diversity. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 388–395, mar. 2016.
- KHAN, M. J.; HOSSEINI, A.; BURRELL, S.; ROCCO, S. M.; MCNAMARA, J. P.; LOOR, J. J. Change in subcutaneous adipose tissue metabolism and gene network expression during the transition period in dairy cows, including differences due to sire genetic merit. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 4, p. 2171–82, 2013.
- KIKIN, O.; D'ANTONIO, L.; BAGGA, P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. **Nucleic acids research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W676-82, 1 jul. 2006.
- KIM, J. K.; FILLMORE, J. J.; CHEN, Y.; YU, C.; MOORE, I. K.; PYPAERT, M.; LUTZ, E. P.; KAKO, Y.; VELEZ-CARRASCO, W.; GOLDBERG, I. J.; BRESLOW, J. L.; SHULMAN, G. I. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7522–7, 19 jun. 2001.
- KIM, J.; KLOOSTER, S.; SHAPIRO, D. J. Intrinsically bent DNA in a eukaryotic transcription factor recognition sequence potentiates transcription activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 3, p. 1282–8, 20 jan. 1995.
- KLIEWER, S. A.; FORMAN, B. M.; BLUMBERG, B.; ONG, E. S.; BORGMAYER, U.; MANGELSDORF, D. J.; UMESONO, K.; EVANS, R. M. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 15, p. 7355–9, 1994.

KNIGHT, J. C.; UDALOVA, I.; HILL, A. V.; GREENWOOD, B. M.; PESHU, N.; MARSH, K.; KWIATKOWSKI, D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nature Genetics**, v. 22, n. 2, p. 145–150, 1 jun. 1999.

KRAUSS, S.; ZHANG, C.-Y.; LOWELL, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 248–261, 1 mar. 2005.

KULIG, H.; ŻUKOWSKI K.; KOWALEWSKA-ŁUCZAK I.; ŁAKOMY P. SCD1 POLYMORPHISM AND BREEDING VALUE FOR MILK PRODUCTION TRAITS IN COWS. **Bulgarian Journal of Agricultural Science Agricultural Academy**, v. 22, n. 1, p. 131–134, 2016.

LAMRI, A.; ABI KHALIL, C.; JAZIRI, R.; VELHO, G.; LANTIERI, O.; VOL, S.; FROGUEL, P.; BALKAU, B.; MARRE, M.; FUMERON, F. Dietary fat intake and polymorphisms at the PPARG locus modulate BMI and type 2 diabetes risk in the D.E.S.I.R. prospective study. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 218–224, 3 fev. 2012.

LEDESMA, A.; DE LACOBIA, M. G.; RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome biology**, v. 3, n. 12, p. REVIEWS3015, 2002.

LEE, J.-Y.; HA, J. J.; PARK, Y. S.; YI, J. K.; LEE, S.; MUN, S.; HAN, K.; KIM, J. J.; KIM, H. J.; OH, D. Y. Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Gene and Fatty Acid Composition in Korean Native Cattle. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 2, p. 184–94, fev. 2016.

LEHRKE, M.; LAZAR, M. A. The many faces of PPAR- γ **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993–999, 2005.

LI, D.; YU, L.; WU, H.; SHAN, Y.; GUO, J.; DANG, Y.; WEI, Y.; ZHAO, S. Cloning and identification of the human LPAAT-zeta gene, a novel member of the lysophosphatidic acid acyltransferase family. **Journal of Human Genetics**, v. 48, n. 8, p. 438–442, 1 ago. 2003.

LI, M.; PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 13, p. 4699–707, jul. 2000.

LI, N.; ZHAO, F.; WEI, C.; LIANG, M.; ZHANG, N.; WANG, C.; LI, Q.; GAO, X.; Function of SREBP1 in the milk fat synthesis of dairy cow mammary epithelial cells. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 16998–7013, 2014.

LIM, D.; KIM, N.K.; PARK, H. S.; LEE, S. H.; CHO, Y. M.; OH, S. J.; KIM, T. H.; KIM, H. Identification of candidate genes related to bovine marbling using protein-protein interaction networks. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 7, p. 992–1002, 2011.

LING, Y.; WANG, K.; YIN, J.; ZHU, L.; ZHANG, X.; HAN, C.; DING, J. Molecular analyses for genetic polymorphisms of the lpl gene and their associations with intramuscular fat content in goats. **Journal of Animal and Plant Science**, v. 25, n. 5, 2015.

LITTLEJOHN, M. D.; TIPLADY, K.; LOPDELL, T.; LAW, T. A.; SCOTT, A.; HARLAND, C.; SHERLOCK, R.; HENTY, K.; OBOLONKIN, V.; LEHNERT, K.; MACGIBBON, A.; SPELMAN, R. J.; DAVIS, S. R.; SNELL R. G. Expression Variants of the Lipogenic AGPAT6 Gene Affect Diverse Milk Composition Phenotypes in *Bos taurus*. **PLoS ONE**, v.

9, n. 1, p. e85757, 21 jan. 2014.

LIU, J.; WANG, Y.; BIRNBAUM, M. J.; STOFFERS, D. A. Three-amino-acid-loop-extension homeodomain factor Meis3 regulates cell survival via PDK1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20494–20499, 23 nov. 2010.

LIU, P. H.; CHANG, Y. C.; JIANG, Y. D.; CHEN, W. J.; CHANG, T. J.; KUO, S. S.; LEE, K. C.; HSIAO, P. C.; CHIU, K. C.; CHUANG, L. M. Genetic Variants of *TCF7L2* Are Associated with Insulin Resistance and Related Metabolic Phenotypes in Taiwanese Adolescents and Caucasian Young Adults. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3575–3582, set. 2009a.

LIU, Y. CHEN, L.; XU, X.; VICAUT, E.; SERCOMBE, R. Both ischemic preconditioning and ghrelin administration protect hippocampus from ischemia/reperfusion and upregulate uncoupling protein-2. **BMC physiology**, v. 9, p. 17, 22 set. 2009b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LODHI, M. A.; YE, G.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6–13, mar. 1994.

MAAREK, Y. S.; JACOVI, M.; SHTALHAIM, M.; UR, S.; ZERNIK, D.; BEN-SHAUL, I. Z. WebCutter: a system for dynamic and tailorable site mapping. **Computer Networks and ISDN Systems**, v. 29, n. 8–13, p. 1269–1279, set. 1997.

MACKLE, T. R.; DWYER, D. A.; INGVARTSEN, K. L.; CHOUINARD, P. Y.; ROSS, D. A.; BAUMAN D. E. Effects of Insulin and Postruminal Supply of Protein on Use of Amino Acids by the Mammary Gland for Milk Protein Synthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 93–105, jan. 2000.

MANIATIS, T.; JEFFREY, A.; VAN DESANDE, H. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. **Biochemistry**, v. 14, n. 17, p. 3787–94, 26 ago. 1975.

MATHELIER, A.; FORNES, O.; ARENILLAS, D. J.; CHEN, C. Y.; DENAY, G.; LEE, J.; SHI, W.; SHYR, C.; TAN, G.; WORSLEY-HUNT, R.; ZHANG, A. W.; PARCY, F.; LENHARD, B.; SANDELIN, A.; WASSERMAN, W. W. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D110–D115, 4 jan. 2016.

MATSUSUE, K.; HALUZIK, M.; LAMBERT, G.; YIM, S. H.; GAVRILOVA, O.; WARD, J. M.; BREWER B. JR.; REITMAN, M. L.; GONZALEZ, F. J. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 5, p. 737–47, mar. 2003.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597-600, 1 jul. 2013.

MEAD, J. R.; IRVINE, S. A.; RAMJI, D. P. Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 12, p. 753–769, 2002.

MEDVEDEV, A. V.; SNEDDEN, S. K.; RAIMBAULT, S.; RICQUIER, D.; COLLINS, S. Transcriptional Regulation of the Mouse Uncoupling Protein-2 Gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 10817–10823, 6 abr. 2001.

MELE, M.; CONTE, G.; CASTIGLIONI, B.; CHESSA, S.; MACCIOTTA, N. P.; SERRA, A.; BUCCIONI, A.; PAGNACCO, G.; SECCHIARI, P. Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4458–4465, set. 2007.

MERTZ, J. E.; BERG, P. Viable deletion mutants of simian virus 40: selective isolation by means of a restriction endonuclease from Hemophilus parainfluenzae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 12, p. 4879–83, dez. 1974.

MISZTAL, REMLF90 Manual. Disponível em: <<http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/numpub/blupf90/docs/remlf90.pdf>> 2002. Acesso em: 13/3/2008.

MIYAZAKI, M.; NTAMBI, J. M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 113–121, fev. 2003.

MOIOLI, B.; D'ANDREA, M.; PILLA, F. Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 179–192, 2007.

MURA, M. C.; DAGA, C.; BODANO, S.; PALUDO, M.; LURIDIANA, S.; PAZZOLA, M.; DETTORI, M. L.; VACCA, G. M.; CARCANGIU, V. Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 3, p. 2169–2173, 24 mar. 2013.

NAGLE, C. A.; VERGNES, L.; DEJONG, H.; WANG, S.; LEWIN, T.M.; REUE, K.; COLEMAN, R. A. Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in Agpat6 ^{-/-} mice. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 4, p. 823–831, abr. 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

NISHIKAWA, J.; AMANO, M.; FUKUE, Y.; TANAKA, S.; KISHI, H.; HIROTA, Y.; YODA, K.; OHYAMA, T. Left-handedly curved DNA regulates accessibility to cis-DNA elements in chromatin. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 22, p. 6651–62, 15 nov. 2003.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M.; STOEHR, J. P.; LAN, H.; KENDZIORSKI, C. M.; YANDELL, B. S.; SONG, Y.; COHEN, P.; FRIEDMAN, J. M.; ATTIE, A. D. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11482–6, 20 ago. 2002.

NTAMBI, J.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 91–104, mar. 2004.

O-SULLIVAN, I.; ZHANG, W.; WASSERMAN, D. H.; LIEW, C. W.; LIU, J.; PAIK, J.; DEPINHO R. A.; STOLZ, D. B.; KAHN, C. R.; SCHWARTZ, M. W.; UNTERMAN, T. G.

FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. **Nature Communications**, v. 6, p. 7079, 12 maio 2015.

OH, D.; LEE, Y.; LEE, C.; CHUNG, E.; YEO, J. Association of bovine fatty acid composition with missense nucleotide polymorphism in exon7 of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene. **Animal Genetics**, v. 43, n. 4, p. 474–474, 1 ago. 2012.

OH, D.; LA, B.; LEE, Y.; BYUN, Y.; LEE, J.; YEO, G.; YEO, J. Identification of novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the lipoprotein lipase (LPL) gene associated with fatty acid composition in Korean cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 3155–3163, 28 abr. 2013.

PARVIN, J. D.; MCCORMICK, R. J.; SHARP, P. A.; FISHER, D. E. Pre-bending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor. **Nature**, v. 373, n. 6516, p. 724–727, 23 fev. 1995.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. E28–E37, 1 jul. 2009.

PECQUEUR, C.; CASSARD-DOULCIER, A. M.; RAIMBAULT, S.; MIROUX, B.; FLEURY, C.; GELLY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. Functional Organization of the Human Uncoupling Protein-2 Gene, and Juxtaposition to the Uncoupling Protein-3 Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 1, p. 40–46, 5 fev. 1999.

PECQUEUR, C.; ALVES-GUERRA, M. C.; GELLY, C.; LEVI-MEYRUEIS, C.; COUPLAN, E.; COLLINS, S.; RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F.; MIROUX, B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 12, p. 8705–12, 23 mar. 2001.

PERDIGÃO, N. R. DE O. F.; OLIVEIRA, L. S.; CORDEIRO, A. G. P. C. **Sistemas de Produção de Caprinos Leiteiros**. Anais do 13^o Workshop sobre Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica. **Anais**. Coronel Pacheco - MG, 2016.

PETERS, J. M.; SHAH, Y. M.; GONZALEZ, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 3, p. 181–195, 2012.

PFÄFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, mar. 2004.

PI, J.; COLLINS, S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic β -cell function. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 12, n. s2, p. 141–148, 1 out. 2010.

PIRISI, A.; LAURET, A.; DUBEUF, J. P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 167–178, 1 mar. 2007.

QIN, Y.; ZHANG, Y.; YIN, Y.; XU, F.; GAO, B.; SHI, Q.; ZHU, C.; LI, W.; LI, B. Cloning of Xuhuai goat lipoprotein lipase gene and the preparation of transgenic sheep. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8439–8446, 19 ago. 2012.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL G.; PACCARD P.; GUILLETA I.; CHILLIARD Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v.

79, n. 1, p. 57–72, set. 2008.

RHODES, D.; LIPPS, H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 18, p. 8627–8637, 15 out. 2015.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **American journal of epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 505–14, 15 fev. 2009.

ROSEN, E. D. SARRAF, P.; TROY, A. E.; BRADWIN, G.; MOORE, K.; MILSTONE, D. S.; SPIEGELMAN, B. M.; MORTENSEN, R. M. PPAR gamma Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue *in vivo* and *in vitro* **Molecular cell**. v. 4, p. 611–617, 1999.

ROTHSCHILD, M.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v. 8, p. 13–20, 1997.

ROUSSET, S.; ALVES-GUERRA, M.; MOZO, J.; MIROUX, B.; CASSARD-DOULCIER, A.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S130-5, fev. 2004.

RUPPRECHT, A.; BRÄUER, A. U.; SMORODCHENKO, A.; GOYIN, J.; HILSE, K. E.; SHABALINA, I. G.; INFANTE-DUARTE, C.; POHL, E. E. Quantification of Uncoupling Protein 2 Reveals Its Main Expression in Immune Cells and Selective Up-Regulation during T-Cell Proliferation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e41406, 3 ago. 2012.

RUTTER, G. A. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. **Molecular aspects of medicine**, v. 22, n. 6, p. 247–84, dez. 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977.

SCANU, A. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. **Science**, v. 153, n. 3736, p. 640–1, 5 ago. 1966.

SHERMAN, E. L.; NKRUMAH, J. D.; MURDOCH, B. M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S. S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 1–16, 18 set. 2008.

SHI, H.; ZHAO, W.; ZHANG, C.; SHAHZAD, K.; LUO, J.; LOOR, J. J. Transcriptome-Wide Analysis Reveals the Role of PPAR γ Controlling the Lipid Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells. **PPAR Research**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

SHI, H. B.; ZHAO, W. S.; LUO, J.; YAO, D. W.; SUN, Y. T.; LI, J.; SHI, H. P.; LOOR, J. J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 and γ 2 isoforms alter lipogenic gene networks in goat mammary epithelial cells to different extents. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5437–5447, set. 2014.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 7, p. 33, 6 out. 2006.

SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; MOGNOL, G. P.; RIBEIRO, L. F. C.; SILVA, J. L. C.; BRANCALHÃO, R. M. C. Polimorfismo do gene da alpha s1 -caseína em um rebanho leiteiro na região sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3598, 2009.

SORET, B.; LEE, H. J.; FINLEY, E.; LEE, S. C.; VERNON, R. G. Regulation of differentiation of sheep subcutaneous and abdominal preadipocytes in culture. **Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 3, p. 517–524, 1999.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. User's guide. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

STELLWAGEN, N. C.; STELLWAGEN, E. Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 10, p. 1917–1929, 6 mar. 2009.

SUÁREZ-VEGA, A.; GUTIÉRREZ-GIL, B.; KLOPP, C.; ROBERT-GRANIE, C.; TOSSER-KLOPP, G.; ARRANZ, J. J. Characterization and Comparative Analysis of the Milk Transcriptome in Two Dairy Sheep Breeds using RNA Sequencing. **Scientific Reports**, v. 5, p. 18399, 18 dez. 2015.

SUNDEVOLD, H.; GRINDFLEK, E.; LIEN, S. Tissue distribution of porcine peroxisome proliferator-activated receptor alpha: detection of an alternatively spliced mRNA. **Gene**, v. 273, n. 1, p. 105–113, 2001.

TAKEUCHI, K.; REUE, K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1195–E1209, 1 jun. 2009.

TANIGUCHI, M.; UTSUGI, T.; OYAMA, K.; MANNEN, H.; KOBAYASHI, M.; TANABE, Y.; OGINO, A.; TSUJI, S. Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 15, n. 2, p. 142–8, fev. 2004.

TODD, A. K.; JOHNSTON, M.; NEIDLE, S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2901–2907, 16 maio 2005.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147–56, 30 dez. 1994.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; SUÁREZ-VEGA, A.; ARRANZ, J. J.; FRUTOS, P. Isolation of RNA from milk somatic cells as an alternative to biopsies of mammary tissue for nutrigenomic studies in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 8461–8471, out. 2016.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329–39, ago. 2001.

TUDISCO, R.; GROSSI, M.; CALABRÒ, S.; CUTRIGNELLI, M. I.; MUSCO, N.; ADDI, L.; INFASCELLI, F. Influence of pasture on goat milk fatty acids and Stearoyl-CoA desaturase expression in milk somatic cells. **Small Ruminant Research**, v. 122, n. 1–3, p. 38–43, 1 nov. 2014.

TURABELIDZE, A.; GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. **Wound Repair and Regeneration** v. 18, n. 5, p. 460–466, 19 ago. 2010.

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

RESEARCH0034, 18 jun. 2002.

VERBEKE, J.; VAN POUCKE, M.; PEELMAN, L.; DE VliegHER, S. Differential expression of CXCR1 and commonly used reference genes in bovine milk somatic cells following experimental intramammary challenge. **BMC Genetics**, v. 16, n. 1, p. 40, 22 dez. 2015.

VERGNES, L.; BEIGNEUX, A. P.; DAVIS, R.; WATKINS, S. M.; YOUNG, S. G.; REUE, K. Agpat6 deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 4, p. 745–54, abr. 2006.

WANG, H.; ASTARITA, G.; TAUSSIG, M. D.; BHARADWAJ, K. G.; DIPATRIZIO, N. V.; NAVE, K. A.; PIOMELLI, D.; GOLDBERG, I. J.; ECKEL, R. H. Deficiency of Lipoprotein Lipase in Neurons Modifies the Regulation of Energy Balance and Leads to Obesity. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 105–113, jan. 2011.

WANG, Y.; YANG, W.; GUI, L.; WANG, H.; ZAN, L. Association and expression analyses of the Ucp2 and Ucp3 gene polymorphisms with body measurement and meat quality traits in Qinchuan cattle. **Journal of Genetics**, v. 95, n. 4, p. 939–946, 7 dez. 2016.

WELCH, J. S.; RICOTE, M.; AKIYAMA, T. E.; GONZALEZ, F. J.; GLASS, C. K. PPAR γ and PPAR δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- γ target genes in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 11, p. 6712–7, 27 maio 2003.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1785–8, dez. 2003.

WENDEL, A. A.; LEWIN, T. M.; COLEMAN, R. A. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 501–506, jun. 2009.

WICKRAMASINGHE, S.; Wickramasinghe, S.; Rincon, G.; Islas-Trejo, A.; Medrano, J. F. Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. **BMC genomics**, v. 13, p. 45, 25 jan. 2012.

WILLIAMS, J. L. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, n. 1, p. 379–91, 2005.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75–84, set. 2012.

YONEZAWA, T.; HAGA, S.; KOBAYASHI, Y.; KATOH, K.; OBARA, Y. Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 367, n. 4, p. 729–35, 21 mar. 2008.

ZHANG, C. L.; GAO, X. Y.; SHAO, R. Y.; WANG, Y. H.; FANG, X. T.; CHEN, H. Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Gene Polymorphism in Goat Breeds. **Biochemical Genetics**, v. 48, n. 9–10, p. 822–828, 14 out. 2010.

ZHANG, C. C.; BAFFY, G.; PERRET, P.; KRAUSS, S.; PERONI, O.; GRUJIC, D.; HAGEN, T.; VIDAL-PUIG, A. J.; BOSS, O.; KIM, Y.; ZHENG, X. X.; WHEELER, M. B.; SHULMAN, G. I.; CHAN, C. B.; LOWELL, B. B. Uncoupling protein-2 negatively regulates

insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. **Cell**, v. 105, n. 6, p. 745–55, 15 jun. 2001.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, 1 dez. 1994.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LIU, X.; LI, Y.; DING, J.; ZHANG, X.; ZHANG, Y. Reference gene screening for analyzing gene expression across goat tissue. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 26, n. 12, p. 1665–71, dez. 2013.

ZHAO, W. S.; ZHAO, W. S.; HU, S. L.; YU, K.; WANG, H.; WANG, W.; LOOR, J.; LUO, J. Lipoprotein Lipase, Tissue Expression and Effects on Genes Related to Fatty Acid Synthesis in Goat Mammary Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22757–22771, 9 dez. 2014.

ZHENG, K.; CHEN, Z.; HAO, Y. H.; TAN, Z. Molecular crowding creates an essential environment for the formation of stable G-quadruplexes in long double-stranded DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 1, p. 327–338, jan. 2010.

ZHU, M.; ZHAO, S. Candidate gene identification approach: progress and challenges. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 7, p. 420–7, 25 out. 2007.

ZHU, Y.; QI, C.; KORENBERG, J. R.; CHEN, X. N.; NOYA, D.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7921–7925, 1995.

ZIDI, A.; FERNÁNDEZ-CABANÁS, V. M.; URRUTIA, B.; CARRIZOSA, J.; POLVILLO, O.; GONZÁLEZ-REDONDO, P.; JORDANA, J.; GALLARDO, D.; AMILLS, M.; SERRADILLA, J. M. Association between the polymorphism of the goat stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene and milk fatty acid composition in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4332–4339, set. 2010.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3406–15, 1 jul. 2003.