

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Polimorfismo nos Genes *IGF-1* e *NF1-C2* e sua Associação com
Características Produtivas em Caprinos Leiteiros**

Amanda Mendes Rangel

2015



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

**POLIMORFISMO NOS GENES *IGF-1* E *NFI-C2* E SUA ASSOCIAÇÃO
COM CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS EM CAPRINOS LEITEIROS**

AMANDA MENDES RANGEL

Sob a orientação da professora
Ana Lúcia Puerro de Melo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ
Julho de 2015

636.390821

R196p

T

Rangel, Amanda Mendes, 1991-

Polimorfismo nos genes IGF-1 e NF1-C2 e sua associação com características produtivas em caprinos leiteiros / Amanda Mendes Rangel. - 2015.

40 f.: il.

Orientador: Ana Lúcia Puerro de Melo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Bibliografia: f.32-40.

1. Caprino - Genética - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Leite - Produção - Teses. I. Melo, Ana Lúcia Puerro, 1984- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

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

AMANDA MENDES RANGEL

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/07/2015

Ana Lúcia Puerro de Melo Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Denise Monnerat Nogueira Dra. UFRRJ

Eliane Gasparino Dra. UEM

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por tornar tudo isso possível a cada dia.

Aos meus pais Marcos Antonio e Sonia Resende por toda dedicação e amor em toda a minha vida, e a minha irmã, Aline Mendes por pela amizade e apoio.

Ao meu amor João Carlos, por sempre compreender e apoiar com toda paciência, amizade e amor.

Aos amigos, Amanda, Diego, Érica, Helen, Lidiane e Lilian, pela companhia e incentivos em todos os momentos.

Aos amigos que contribuíram diretamente com a realização desse trabalho e na minha formação, Adriana, Érica, Odair, Leonardo, Ramon, e ao querido Francisco, por toda ajuda e amizade.

Aos meus orientadores por todos os ensinamentos e pela amizade, Ana Lúcia e Maria Amélia, por toda a dedicação, auxílio na realização deste projeto e sempre ótima orientação, tenho muita admiração e respeito. Agradeço pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa e discussão e por fazer do laboratório do departamento de Genética, da qual sentirei muita falta.

A todos que estão sempre presentes e fizeram parte desde o início, tornando melhores as situações e fazendo de Seropédica um lugar mais agradável de se viver. A todos os que fizeram parte de minha vida, direta ou indiretamente, por me fazerem continuar e não desistir mesmo com as dificuldades. Agradeço por todos os momentos e pela amizade verdadeira.

Ao apoio de todos os professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aos Institutos de Zootecnia e ao de Biologia, pela oportunidade de utilização das suas dependências, salas de aula e laboratórios, que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste projeto.

BIOGRAFIA

AMANDA MENDES RANGEL, filha de Marcos Antonio Rangel e Sonia Resende Mendes, nasceu em Nova Iguaçu – RJ, em 12 de Setembro de 1991.

No ano de 2009, iniciou no Curso de Graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo em maio de 2013.

Em agosto de 2013, iniciou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado, Área de Concentração Produção Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro especificamente em Melhoramento Genético Animal.

RESUMO

RANGEL, A. M. **Polimorfismo nos Genes *IGF-1* e *NFI-C2* e sua Associação com Características Produtivas em Caprinos Leiteiros**. 40p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Diversos processos fisiológicos e metabólicos têm a participação do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF-1*). Durante os processos de crescimento mamário e gravidez, este fator atua na ação local de hormônios esteróides, do hormônio do crescimento e da prolactina, os principais reguladores da diferenciação. Além disso, é um fator necessário para o desenvolvimento do lóbulo-alveolar da glândula mamária. O *NFI-C2* é o gene que codifica o fator de transcrição nuclear 1-C2, o qual media a ação da prolactina na glândula mamária e desempenha um papel importante na ativação de vários genes específicos desta glândula, participando tanto do seu estabelecimento como na proteção contra tumores durante a proliferação. Sendo assim, objetivamos com o presente estudo avaliar se as variações encontradas nos genes *IGF-1* e *NFI-C2* de caprinos das raças Xinjiang e Nanjiang cashmere (*IGF-1*) e Xinong Saanen Guanzhong

Xinjiang cashmere branca (*NFI-C2*) estão presentes em uma população experimental de caprinos das raças Saanen e Alpina, relacionando-as com a produção de leite, duração da lactação, contagem de células somáticas e teor de constituintes do leite (proteína, gordura, lactose e extrato seco total), e detectar marcadores moleculares que possam ser utilizados na seleção e melhoramento animal. Foi utilizado um rebanho de cabras (*Capra hircus*), em idade reprodutiva, composto por animais das raças Saanen e Alpina, sendo considerada uma única população, genotipadas para os polimorfismos dos genes *IGF-1* e *NFI-C2*. O sangue coletado da circulação periférica (aproximadamente 10 mL) foi utilizado para a extração de DNA genômico através das células sanguíneas brancas e a amplificação dos fragmentos foi feita por intermédio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados foram avaliados pelo polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP), identificados por intermédio de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, corado com nitrato de prata. Os produtos de PCR apresentaram tamanho aproximado conforme esperado, 363 pb (*IGF-1*) e 233 pb (*NFI-C2*), com um total de 168 e 197 animais avaliados, respectivamente. No íntron 4 do gene *IGF-1* o polimorfismo de base única (SNP) referente a transversão G>C na posição 5752 foi identificado por meio da endonuclease *HaeIII*, porém o alelo A teve uma frequência muito baixa (0,09), e não houve associação significativa com nenhuma das características produtivas avaliadas ($P>0,05$). Logo, seu uso como marcador para estas características não é recomendado. No gene *NFI-C2*, o SNP localizado no éxon 5 (G>A), na posição 44654 da sequência de nucleotídeos, foi identificado através do uso da enzima de restrição *BstNI*, os alelos A e G tiveram as frequências de 0,43 e 0,57, respectivamente. Foi encontrada associação deste polimorfismo com a porcentagem de proteína do leite ($P<0,01$), com o genótipo AA associado ao maior teor do que o GG, enquanto o genótipo heterozigoto não diferiu dos homozigotos. Assim, este polimorfismo pode auxiliar na seleção de animais que produzam um leite com maior conteúdo proteico.

Palavras-chaves: Alpina, produção de leite, RFLP, Saanen.

ABSTRACT

RANGEL, A. M. **Polymorphism in *IGF-1* and *NFI-C2* genes and their association with productive traits in Dairy Goats.** 40p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Several physiological and metabolic processes have the participation of the growth factor insulin-like 1 (IGF-1). During the breast enlargement process and pregnancy, this factor works in the local action of steroid hormones, growth hormone and prolactin, the primary regulators of differentiation. Besides is required for the development of mammary gland lobuloalveolar. The *NFI-C2* is the gene encoding the nuclear transcription factor 1-C2, which mediates the action of prolactin in the mammary gland and plays an important role in the activation of several specific genes of this gland, participating both from its establishment as protect against tumors during proliferation. Therefore, we aim with this study: evaluate the variations found in *IGF-1* and *NFI-C2* genes in breeds of dairy goats cashmere Xinjiang and Nanjiang (*IGF-1*) and white cashmere Xinong Saanen Guanzhong Xinjiang (*NFI-C2*) are present in an experimental population of goats of Saanen and Alpine, relating them to milk production, lactation period, somatic cell count and milk constituents content (fat, protein, lactose, and total solids) and detect molecular markers that may be used in animal breeding and selection. A herd of goats (*Capra hircus*) in reproductive age, composed of animals of Saanen and Alpine breeds, considered as a single population, genotyped for polymorphisms of *IGF-1* and *NFI-C2* genes was used. The collected blood of peripheral circulation (approximately 10 mL) was used for genomic DNA extraction through the white blood cells and the amplification of the fragments was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The amplified fragments were assessed for polymorphism by restriction fragment length (PCR-RFLP), identified via polyacrylamide gel electrophoresis 5%, stained with silver nitrate. PCR products showed approximate size as expected, 363 bp (*IGF-1*) and 233 bp (*NFI-C2*), with a total of 168 and 197 evaluated animals, respectively. In intron 4 of *IGF-1*, the single base polymorphism gene (SNP) refers to transversion G>C in position 5752 was identified by *HaeIII* endonuclease, but allele A had a very low frequency (0.09) and there was no significant association with neither of the productive characteristics ($P>0.05$). Therefore, its use as a marker for these traits is not recommended. In *NFI-C2* gene, the SNP located in exon 5 (G>A), in position 44654 of the nucleotide sequence, was identified by *BstNI* restriction enzyme and frequencies of A and G alleles are 0.43 and 0.57, respectively. It was found association of this polymorphism with the percentage of milk protein ($P<0.01$), with AA genotype associated to greater content of protein than GG, while the heterozygous genotype did not differ from homozygotes. Therefore, this polymorphism may help select animals that produce milk with higher protein content.

Key-words: Alpine, milk production, RFLP, Saanen.

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos pares de primers. | 18 |
| Tabela 2. Sítios de corte das enzimas de restrição e padrão de corte para genotipagem..... | 19 |
| Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas do SNP identificado no gene <i>IGF-1</i> por <i>HaeIII</i> PCR-RFLP..... | 22 |
| Tabela 4. Resumo da ANOVA para as características avaliadas em função dos genótipos do gene <i>IGF-1</i> | 25 |
| Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas do SNP G/A identificado no gene <i>NFI-C2</i> por <i>BstNI</i> PCR-RFLP. | 28 |
| Tabela 6. Resumo da ANOVA para as características avaliadas em função dos genótipos do gene <i>NFI-C2</i> | 29 |
| Tabela 7. Associação dos genótipos do gene <i>NFI-C2</i> com as médias da porcentagem de proteína no leite e o erro padrão. | 29 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da pré proteína IGF e IGF maduro. O peptídeo sinal e domínio E são removidos proteoliticamente para obtenção do IGF maduro (Adaptado de MORIYAMA et al., 2000). 4
- Figura 2.** Representação esquemática da estrutura e organização gênica do IGF-1 em caprinos. Os éxons estão representados por caixas, sendo as regiões de codificação indicadas por caixas escuras. Os íntrons e regiões flanqueadoras estão representados por linhas (Adaptado de MIKAWA et al., 1995). 5
- Figura 3.** Domínios e splicing alternativo dos genes NF1 em vertebrados. A primeira linha ilustra características gerais e as demais os produtos de *splicing* alternativo dos quatro genes NF1 em vertebrados. A estrutura geral de codificação é composta por 11 éxons (caixas) com o domínio de ligação ao DNA e a dimerização da região N-terminal codificado predominantemente pelo éxon 2 (caixa cinza). Dentro do segundo éxon estão quatro resíduos de cisteína conservados (rotulados de C) necessários para uma regulação da ligação ao DNA, o de redox de ligação, um domínio de base alfa helicoidal (*basic helix*) e o domínio de ligação da polimerase (*Ad Pol binding*). Os números acima da linha são números aproximados de resíduos e os que estão abaixo da linha são números dos éxons. As regiões C-terminal de cada domínios (Transativação e repressão) codificam proteínas especializadas, incluindo o domínio de transativação rica em prolina (*Proline-rich*). Para cada gene, os maiores cDNAs existentes contêm 11 éxons, e isoformas de *splicing* alternativo são mostradas por colchetes abaixo de cada gene com seus nomes abaixo. Primeiros éxons alternativos são apresentados por caixas ou linhas conectadas ao segundo éxon. Os nomes dos primeiros éxons denotam conservação das regiões de codificação, éxons1a (8-10 aa), 1b (32-47 aa) e 1c (1 aa). (Adaptado de Gronostajski et al., 2000). 11
- Figura 4.** (a) Esquema da organização e estrutura dos polipeptídeos NF1-C, com a posição de alguns aminoácidos e resíduos de aminoácidos codificados, indicados por números na parte inferior; (b) Comparação da estrutura e organização dos domínios de algumas das variantes de NF1-C (NF1-C1, NF1-C2, NF1-C5 e NF1-C7). Adaptado de Chikhirzhina et al. (2008). 13
- Figura 5.** Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base. Canaletas de 1 a 6 = fragmentos amplificados de aproximadamente 363 pb correspondentes ao íntron 4 do *IGF-1*. 20
- Figura 6.** Figura esquemática mostrando o padrão de bandas dos alelos A e B, obtidos após digestão com a enzimas *HaeIII*, para o gene *IGF-1*. M = marcador de peso molecular de 50 pb; AA = genótipo homozigoto para o alelo A que não apresenta região de corte; AB = genótipo heterozigoto no qual ocorre a clivagem do fragmento em duas regiões, originando três fragmentos

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| e o alelo A permanece intacto; BB = genótipo homozigoto para o alelo B com duas regiões de corte..... | 21 |
| Figura 7. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata dos produtos de digestão pela enzima <i>HaeIII</i> do gene <i>IGF-I</i> . Canaleta 1 = produto da PCR; 2 = animal homozigoto (AA), 3 e 4 = animais heterozigotos (AB), 5 e 6 = animais homozigotos (BB); M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base..... | 22 |
| Figura 8. Resultado do alinhamento entre as sequências de bovino (Numero de Acesso: emb HG797647.1) (<i>Bos taurus</i>) e caprino (<i>Capra hircus</i>). Na imagem pode ser observada a sequência do fragmento composto pelo íntron 4 caprino e o sítio de corte da enzima (em caixa preta)..... | 23 |
| Figura 9. Resultado do alinhamento entre as sequências de diferentes amostras e a sequência do Genbank (D 26119). A transversão G/C é mostrada pela letra S em um dos sítios de corte, onde não houve pareamento..... | 24 |
| Figura 10. Eletroferograma mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al. (1977) do fragmento amplificado pelo par de primers correspondente ao íntron 4, destacando a transversão G/C em um dos sítios de corte, indicada pela seta amarela. Cada base é representada por uma cor: A= Verde, G= Preto, C= Azul, T= Vermelho..... | 24 |
| Figura 11. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base. Canaletas de 1 a 7 = fragmentos amplificados de aproximadamente 233 pb correspondentes ao éxon 5 do <i>NFI-C2</i> | 26 |
| Figura 12. Esquema do padrão de bandas dos alelos A e G, obtidos após digestão com a enzimas <i>BstNI</i> , para o gene <i>NFI-C2</i> . M = marcador de peso molecular de 50 pb; (GG) = genótipo homozigoto para o alelo G que não apresenta região de corte; (AG) = genótipo heterozigoto no qual ocorre a clivagem do alelo A em duas regiões, originando três fragmentos e o alelo G permanece intacto; (AA) = genótipo homozigoto para o alelo A com os dois cortes..... | 27 |
| Figura 13. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata dos produtos de digestão pela enzima <i>BstNI</i> do gene <i>NFI-C2</i> . Canaleta 1 = produto da PCR; 2 e 3 = animais homozigotos (GG), 4 e 5 = animais homozigotos (AA), 6 e 7 = animais heterozigotos (AG); M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base..... | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALS - Subunidade do ácido-lábil (*Acid-Labile Subunit*)
- CEL – Gene que codifica a enzima carboxil éster lípase (*Carboxyl Ester Lipase*)
- cDNA – DNA complementar (*Complementary DNA*)
- CTAB - Brometo hexadeciltrimetilamônio (*Cetyl Trimethylammonium Bromide*)
- CTD – Domínio C-terminal (*C-Terminal Domain*)
- CTFs – Fatotes de transcrição C (*C Transcription Factors*)
- dCMP – Deaminase deoxicidina monofosfato (*deoxycytidine monophosphate deaminase*)
- EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)
- FSH - Hormônio folículo estimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*)
- GH – Hormônio do crescimento (*Growth Hormone*)
- GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina (*Gonadotropin-Releasing Hormone*)
- IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*)
- IGF-1* - Gene que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IGF-1R - Receptor do tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina
- IGFBP - Proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*)
- kb – kilobase
- kDa – KiloDalton
- LH – Hormônio luteinizante (*Luteinizing Hormone*)
- NF1-C2 - Fator nuclear 1 C2 (*Nuclear factor 1 C2*)
- NF1-C2* – Gene que codifica o fator nuclear 1 C2
- NSILA I and II – Atividade semelhante à insulina não supressível I e II (*Non-Suppressible Insulin-Like Activity I and II*)
- p53 – Proteína p53 (*Protein p 53*)
- p53* – Gene que codifica a proteína p53
- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chair Reaction*)
- PTH - Hormônio da paratireoide (*Parathyroid Hormone*)
- RFLP - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- SNP- Polimorfismo de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphisms*)
- TH - Hormônio da tireoide (*Thyroid Hormone*)
- TRPM2* - Receptor de potencial transitório do canal de cátion M2 (*Transient Receptor Potential Cation Channel M2*)
- UTR – Região não traduzida (*Untranslated Region*)
- WAP - Gene que codifica a proteína de soro de leite ácida (*Whey Acidic Protein*)

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 O fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1)..... | 3 |
| 2.1.1 IGF-1 e suas funções | 3 |
| 2.1.2 IGF-1 e a glândula mamária | 7 |
| 2.1.3 Polimorfismos no gene <i>IGF-1</i> | 7 |
| 2.2 O Fator de Transcrição Nuclear 1-C2 (NF1-C2)..... | 9 |
| 2.2.1 Fatores de transcrição | 9 |
| 2.2.2 A família do fator nuclear 1 (NF1)..... | 10 |
| 2.2.3 O fator nuclear 1-C2 e a produção de leite | 15 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 Composição da Amostra e Extração do DNA Genômico | 17 |
| 3.2 Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese..... | 17 |
| 3.3 Análise de PCR-RFLP..... | 18 |
| 3.4 Sequenciamento..... | 19 |
| 3.5 Análise Estatística | 19 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 4.1 Gene <i>IGF-1</i> | 20 |
| 4.1.1 Amplificação da região de interesse do gene <i>IGF-1</i> por PCR | 20 |
| 4.1.2 PCR-RFLP..... | 20 |
| 4.1.3 Sequenciamento..... | 23 |
| 4.1.4 Análise estatística..... | 24 |
| 4.2 Gene <i>NF1-C2</i> | 26 |
| 4.2.1 Obtenção dos Fragmentos por PCR..... | 26 |
| 4.2.2 PCR-RFLP | 26 |
| 4.2.3 Análise estatística..... | 28 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 31 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais aplicações da genética molecular ao melhoramento animal consiste em identificar e mapear os genes que interferem na expressão de características quantitativas de importância econômica, visando melhorar a compreensão do controle genético dessas características complexas.

Fatores como a composição genética, o ambiente nutricional favorável e práticas adequadas de gestão afetam amplamente a produção e composição do leite, classificando estas como características com influência das interações entre o genótipo e ambiente. Avanços para importantes características econômicas em várias espécies de animais domésticos têm sido atingidas através do desempenho fenotípico e da seleção quantitativa. No entanto, a eficiência da seleção tradicional nas populações tem sido baixa para características com correlação genética desfavorável, como por exemplo, a produção e o teor de proteína do leite (SCHWERIN et al., 1995).

Desenvolvimentos recentes na biologia molecular e estatística permitiram identificar e utilizar a variação do genoma e a participação de genes no melhoramento genético dos animais, de forma complementar à seleção tradicional (KIPLAGAT et al., 2012).

Um dos métodos utilizados com a finalidade de identificação de polimorfismos genéticos associados à variação fenotípica em características quantitativas é o do Gene Candidato (SCHWERIN et al., 1995; HU et al., 2009). Dentro dela, existem duas categorias principais com utilização no melhoramento genético, a do tipo I se refere ao estudo da relação entre polimorfismos em genes relacionados a proteínas-chave envolvidas no desenvolvimento ou fisiologia de características de interesse no desempenho animal, ou seja, polimorfismos determinantes de variação fenotípica (ANDERSSON, 2001); e a do tipo II, se refere a genes com efeitos em características detectadas estatisticamente, baseados em sequências polimórficas de DNA que se encontram no mesmo cromossomo de um gene de efeito quantitativo (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998).

Entre os genes que podem ser estudados quanto a sua associação com características de importância econômica em caprinos leiteiros pode-se citar o *IGF-1* e o *NFI-C2*, que codificam o fator de crescimento semelhante à insulina 1 e o fator de transcrição nuclear 1-C2, respectivamente.

O IGF-1 pertence a uma família de fatores de crescimento constituindo um sistema envolvido no eixo somatotrófico, que regula processos de crescimento e metabolismo, participando da embriogênese à reprodução (BAXTER, 1985; FROESCH et al., 1985). Em relação ao desenvolvimento mamário, atua com os hormônios esteroides, hormônio do crescimento e prolactina (HYNES; WATSON, 2010). Com isso, a diversidade de suas funções e relatos de polimorfismos encontrados no gene que codifica este fator (LIU et al., 2010; ZHANG et al., 2008) são alguns dos aspectos que podem contribuir para pesquisas voltadas a produção animal, em especial a informações sobre a variabilidade genética em caprinos e sua associação com características produtivas.

O fator de transcrição nuclear 1 é uma proteína nuclear necessária para a iniciação eficiente da replicação de DNA e também atua ativando ou inativando a transcrição (INOUE et al., 1990). Na glândula mamária, desempenha um papel na ativação de promotores de genes da proteína do leite durante a lactação (FURLONG et al., 1996). Dentre eles, pode-se citar dois genes com expressão quase exclusiva na glândula mamária, o *WAP*, que codifica a principal proteína ácida do soro do leite, e o gene *CEL*, que codifica a enzima carboxil éster lipase, uma proteína que facilita a absorção de gordura (BURDON et al., 1991).

Logo, propomos este trabalho com base na hipótese de que os polimorfismos identificados nos genes *IGF-1* e *NFI-C2* estão presentes em um rebanho experimental de caprinos leiteiros das raças Saanen e Alpina e apresentam associação com a produção de leite, duração da lactação, contagem de células somáticas e produção e composição dos constituintes do leite, podendo assim ser utilizados como marcadores moleculares para estas características em caprinos leiteiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1)

2.1.1 IGF-1 e suas funções

Um sistema complexo envolvendo a coordenação regulada de uma grande diversidade de vias neuroendócrinas com papel central do eixo somatotrófico governa o processo de crescimento pós-natal e metabolismo dos mamíferos. Os genes que fazem parte desse eixo são diretamente responsáveis pelo crescimento, sobretudo através dos hormônios que agem sobre os ossos e músculos mediados pelos fatores de crescimento, sendo um deles o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (SELLIER, 2000).

O IGF-1 estimula processos, como a proliferação de células, o crescimento do esqueleto e a síntese de proteínas. Devido a isso, é um fator de crescimento essencial que participa de processos desde a embriogênese, diferenciação celular, desenvolvimento fetal, crescimento, regulação do metabolismo e reprodução. (BAXTER, 1985; FROESCH et al., 1985).

Os IGFs são proteínas mediadoras chave dos efeitos do hormônio do crescimento (GH), liberadas a partir do fígado após estimulação pelo mesmo para controlar o desenvolvimento e crescimento normal (MORIYAMA et al., 2000). Em particular, pode ser considerado um gene candidato para características de crescimento devido ao seu papel bem estabelecido no sistema de regulação do GH (DUAN, 1997).

O histórico da nomenclatura dos IGFs (IGF-1 e IGF-2) iniciou-se com a sua identificação por Salmon e Daughaday (1956; 1957) e nomeados de fatores de sulfatação, pela sua capacidade de incorporar sulfato em cartilagem de rato *in vitro*. Também eram conhecidos como fatores de atividade não supressora semelhante à insulina (NSILA) I e II, do inglês *Non-Suppressible Insulin-Like Activity* (FROESCH et al., 1963). Posteriormente, esses termos foram substituídos por Somatomedina (DAUGHADAY, 1972) e por último, renomeados de IGF- 1 e 2, devido à sua semelhança estrutural com a insulina e ação na promoção do crescimento (RINDERKNECHT; HUMBEL, 1976).

A família desses fatores de crescimento constitui um sistema de componentes bem conservados que modulam sua ação biológica, incluindo dois ligantes de IGF (IGF-1 e IGF-2), receptores de IGF (IGF-1R e IGF-2R), através dos quais exercem seus efeitos na superfície das células, proteínas de ligação de alta afinidade (IGFBP-1 a 6), reguladoras da interação dos IGFs com seus receptores (DUAN, 1997) e proteases IGFBP (HWA et al., 1999). Além destes, outro grupo de proteínas de ligação de baixa afinidade, conhecidas como proteínas relacionadas à IGFBP (IGFBP-RPs), pertence à família IGF. A insulina, o receptor de insulina bem como um receptor híbrido insulina/IGF também são considerados membros dessa família por sua semelhança na estrutura e cascata de sinalização intracelular (MONGET; MARTIN, 1997; JUUL, 2003).

Receptores celulares de IGF compreendem um dos componentes do sistema de regulação de IGF circulatórios, e se assemelham ao receptor de insulina. O receptor de tipo 1 do IGF (IGF-1R) pode ligar-se a insulina, IGF-1, ou IGF-2, embora a afinidade para a insulina seja 100 vezes menor do que para IGF-1. A presença de IGF-1R pode conferir propriedades especiais à célula por poder evitar a morte celular programada (apoptose) (ROSEN, 1999).

As IGFbps de elevada afinidade são encontradas na circulação e em fluidos extracelulares e regulam a cinética do IGF e interação com o receptor a nível tecidual, mas possui também efeitos independentes do IGF, indicando que não são simples proteínas de transporte (HWA et al., 1999; LEROITH, et al., 2001). Controlam a ação dos IGFs aumentando a sua meia-vida na circulação, mediante o controle da disponibilidade para a ligação ao receptor. Assim, o aumento da concentração de IGFs livres na superfície da célula permite que se liguem e ativem o receptor de IGF, de modo que possa exercer seus efeitos mitogênicos e metabólicos. Portanto, a proteólise dos IGFbps modula diretamente o primeiro passo na sinalização do receptor de IGF e indiretamente modula a sobrevivência da célula, através dos processos de mitogênese e diferenciação (BUNN; FOWLKES, 2003).

O fígado é o principal local de produção dos níveis circulantes dos IGFs, embora, a maioria dos tecidos seja capaz de produzir IGF e IGFbp. Devido à homologia estrutural e funcional do IGF-1 com a insulina, é sugerida sua participação na homeostase da glicose, tanto com efeitos benéficos devido à redução da glicemia e ações de sensibilização da insulina, assim como no desenvolvimento de cânceres, aterosclerose e diabetes tipo 2 (FRYSTYK, 2004).

Em relação às concentrações de IGF-1 circulante no sangue, cerca de 75% do IGF-1 é complexado com a proteína IGFbp-3 e uma subunidade do ácido-lábil (ALS), em um complexo ternário de 150 a 200 kDa, enquanto que o restante se liga a IGFbps de massa molecular inferior. Apenas uma pequena fração (<1%) de IGF existe de forma livre no sangue (MOHAN; KESAVAN, 2012).

Embora ambos os IGFs sejam mitogênicos, o IGF-2 é muito mais ativo durante a vida pré-natal que o IGF-1. Por outro lado, O IGF-1 é o principal regulador do crescimento linear (ROSEN, 1999).

Sobre a estrutura, os peptídeos maduros de IGF-1 e IGF-2 consistem dos domínios A e B que são homólogos às cadeias A e B da insulina. Porém, ao contrário dela não são clivados, permanecendo ligados no peptídeo maduro pelo domínio C análogo ao da insulina. O IGF-1 e IGF-2 contêm um domínio D adicional curto que não se encontra em insulina. Seus pró-hormônios contêm um peptídeo E C-terminal que é clivado no aparelho de Golgi durante a secreção. Os precursores consistem de um peptídeo sinal, uma proteína madura e um domínio E, que é removido após a tradução (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989). Na figura 1 é mostrada a representação de sua estrutura inicial e após processamento (MORIYAMA et al., 2000).

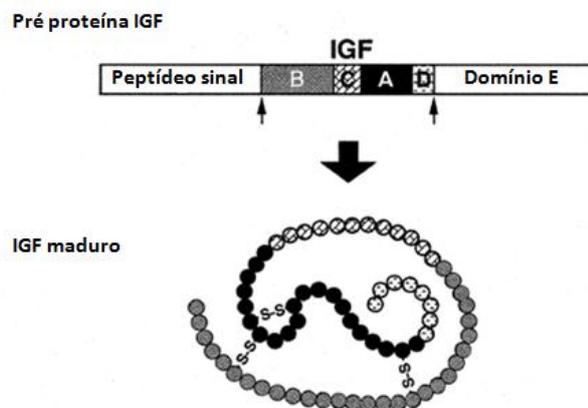


Figura 1. Representação esquemática da pré proteína IGF e IGF maduro. O peptídeo sinal e domínio E são removidos proteoliticamente para obtenção do IGF maduro (Adaptado de MORIYAMA et al., 2000).

As ações biológicas do IGF-1 começam pela interação com o seu receptor de superfície celular, o qual é ativado por ligação específica com a proteína tirosina quinase com semelhanças estruturais e funcionais ao receptor da insulina. O IGF-1 também se liga ao receptor de insulina, mas a afinidade entre eles é cerca de um centésimo em relação ao IGF-1 e o receptor de IGF-1. As sequências de aminoácidos são altamente homólogas entre humanos, bovinos e caprinos. Apenas o aminoácido 67 no IGF-1 maduro é diferente (treonina em cabra e alanina em bovinos e humanos). Essa conservação na estrutura pode ser funcionalmente vantajosa para a interação com outros fatores (MIKAWA et al., 1995).

O IGF-1 é um polipeptídeo de peso molecular de 7,5 kDa constituído por 70 aminoácidos (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989) e altamente conservado em vertebrados, embora o comprimento e estrutura gênica entre as espécies é variável (REYNA et al., 2010). Em seres humanos, porcos, cabras, ratos e galinhas, a sequência de nucleotídeos do IGF-1 é de cerca de 70-90 kb (KAJIMOTO; ROTWEIN, 1991). A expressão do IGF-1 em ratos é menor no período pré-natal e aumenta durante a puberdade e a idade adulta, momento em que a produção hepática torna-se um dos principais contribuintes para os níveis circulantes (LEROITH et al., 2003).

O gene *IGF-1* caprino é codificado por um único gene, localizado no cromossomo 5, consistindo de seis éxons, incluindo três éxons líderes (1W, 1 e 2), e o 3 e 4 codificam o peptídeo IGF-1 maduro. Esses éxons que expressam sequências líderes codificam uma proteína de endereçamento que geralmente são proteínas de exportação da célula, e a sequência de início da tradução. Na figura 2 é mostrada esta organização (MIKAWA et al., 1995). Sendo altamente conservado entre as espécies de mamíferos, os transcritos derivados dos éxons 1 e 2 são processados alternadamente com o éxon 3 gerando duas espécies de mRNA, classe 1 (formado pelos éxons 1 e 3) e classe 2 (éxons 2 e 3) e são regulados por promotores distintos (SZEWCZUK et al., 2011).



Figura 2. Representação esquemática da estrutura e organização gênica do IGF-1 em caprinos. Os éxons estão representados por caixas, sendo as regiões de codificação indicadas por caixas escuras. Os íntrons e regiões flanqueadoras estão representados por linhas (*Adaptado de MIKAWA et al., 1995*).

A expressão do gene *IGF-1* é regulada fisiologicamente e pelo desenvolvimento, sendo controlada pela transcrição e modificações pós-traducionais. Peptídeos distintos de IGF-1 podem surgir através da utilização de diferentes promotores, *splicing* alternativo, processamento proteolítico e eventos de glicosilação (CHRISTOPOULOS et al., 2015). Então é provável que não tenha os mesmos efeitos nas diferentes fases do crescimento. Plath-Gabler et al. (2001), avaliaram a expressão temporal do IGF-1 e IGF-2, seus receptores e proteínas de ligação e o receptor do GH em relação a participação do IGF no desenvolvimento mamário e lactação, nas fases de mamogênese, lactogênese, galactopoiese e involução da glândula mamária de bovinos. Este fato revela que a localização de IGF-1 parácrino e autócrino é importante para a remodelação da glândula mamária bovina durante essas etapas.

Os IGFs atuam na regulação da formação dos ossos e diversos reguladores sistêmicos e locais mediam seus efeitos, em parte pela modulação da produção de IGF-1. Um dos exemplos são os efeitos diretos do GH sobre o osso, em grande parte mediada através da regulação da expressão local de IGF-1, assim como seu efeito sobre o número de osteoblastos, *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que o IGF-1 é de fato o principal regulador da ação do GH e que seus efeitos são mediados através da produção de IGF-1 no fígado e osso. Outros estudos mostram que o IGF-1 também é necessário para a formação dos ossos, mediado por outros hormônios e fatores de crescimento locais, como por exemplo, o hormônio da tireoide (TH), hormônio da paratireoide (PTH), o fator de crescimento fibroblástico 2, fator de crescimento transformante- β 1, e interleucina-1 (MOHAN; KESAVAN, 2012).

O IGF-1 também é conhecido por desempenhar um importante papel em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento muscular, com efeitos na hipertrofia das células musculares e aumento do diâmetro da fibra muscular (DAVIS; SIMMEN, 1997).

De acordo com Pollak et al. (2004) esse papel da sinalização do IGF-1 no controle das taxas de renovação celular despertou a atenção para regulação tanto do envelhecimento quanto de neoplasias, porque ao mesmo tempo que a sinalização estimula a proliferação e prolonga a sobrevivência de células em cultura de tecidos, também acelera o envelhecimento em todo o organismo. Vários modelos de sistemas forneceram evidências de que a proliferação e metástase de células cancerosas são aumentadas pela ativação do receptor do IGF-1.

A produção de leite, bem como outras características biológicas, por exemplo, crescimento ou reprodução, comportamento e resistência a determinadas doenças, possuem uma herança complexa, ou seja, são controladas por múltiplos genes e influenciadas por fatores ambientais. Investigações a respeito de polimorfismos dentro de genes que afetam essas características e pertencem ao eixo somatotrópico são frequentemente escolhidas pela sua importância biológica sobre as características quantitativas de interesse (SZEWCZUK et al., 2011).

A reprodução, principalmente relacionada à fecundidade, é outro exemplo de característica economicamente importante na produção animal, sendo a taxa de ovulação um dos determinantes da eficiência reprodutiva. Como o desenvolvimento dos folículos antrais primordiais na fase inicial não é dependente de gonadotrofinas e mecanismos que regem o início de crescimento dos folículos primordiais não são completamente conhecidos o papel dos fatores de crescimento produzidos no ovário durante a foliculogênese tem sido pesquisado em mamíferos (XIANG-DONG et al., 2014; ZI et al., 2013).

Acredita-se que o aparecimento da capacidade reprodutiva na puberdade e o controle da função reprodutora ao longo da vida adulta são efeitos mediados, em parte pela ativação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo IGF-1, que é sintetizado periféricamente e centralmente, mas interações do IGF-I com GnRH *in vivo* não são completamente conhecidas. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é o modulador chave do sistema reprodutivo, que regula diretamente a liberação do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). Durante a puberdade de fêmeas de mamíferos, os níveis plasmáticos de IGF-1 aumentam no momento em que o estradiol circulante também está em maiores níveis, regulando positivamente níveis plasmáticos de IGF-1 e a densidade do receptor do IGF-1 no hipotálamo, aumentando assim a sensibilidade ao hipotálamo. Durante o envelhecimento, as concentrações plasmáticas de IGF-1 diminui, assim como os níveis de GnRH e LH liberados (MILLER; GORE, 2001).

2.1.2 IGF-1 e a glândula mamária

Na lactação, o papel do IGF-1 está relacionado ao aumento da produção de leite em unidade de tempo e aumento da sustentabilidade da lactação em animais em lactação. Com a infusão arterial de IGF-1 na glândula mamária houve aumento da produção de leite, além de ser demonstrado que o IGF-1 reduziu a perda por apoptose de células epiteliais mamárias durante a fase após a lactação, colocando o IGF-1 como um potente inibidor da morte celular programada (LIN et al., 2012).

No processo de desenvolvimento e crescimento normal, o eixo IGF/IGF1R tem um papel essencial desde o desenvolvimento do botão embrionário, através da sinalização em interações mesenquimais necessárias para a morfogênese mamária. No desenvolvimento pós-natal da glândula, o IGF-1 é produzido em células estromais e epiteliais, e na sua ausência não ocorre o desenvolvimento correto mostrando potencial de crescimento limitado. Durante os processos de crescimento mamário e gravidez, em que hormônios esteróides, hormônio do crescimento (GH) e prolactina são os principais reguladores da diferenciação, os fatores da família IGF-1 e outros têm funções específicas, atuando como efetor local desses hormônios, sendo necessário ainda para o desenvolvimento do lóbulo-alveolar da glândula mamária (HYNES; WATSON, 2010).

Os membros da família IGF são agentes mitogênicos diretos, que estimulam a síntese de DNA em culturas de células epiteliais mamárias, sugerindo que a unidade para o desenvolvimento mamário durante a gravidez vem do controle de fatores de crescimento, e no caso do IGF, através da modulação das proteínas de ligação, sendo o modo autócrino ou parácrino de ação, ou seja, a síntese do fator de crescimento local, mais prováveis e importantes que as concentrações sistêmicas de fator de crescimento (FORSYTH, 1996).

De acordo com Christopoulos et al. (2015) o IGF-1 se liga ao seu receptor cognato, IGF-1R, desencadeando uma cascata de sinalização que conduz a eventos anti-apoptóticos. Apesar de não ser ainda inteiramente elucidado, o papel do sistema de IGF-1 é apontado como importante no desenvolvimento do câncer de mama, em sua progressão e metástase, por ser o ponto de convergência para as principais vias de sinalização implicadas no crescimento. Além disso, outras descobertas demonstram que células epiteliais normais de ratos continuam a proliferar em meio isento de soro, em resposta ao IGF-1, sugerindo que o sistema de IGF-1 desempenha um papel importante na função e manutenção da glândula mamária.

A partir do fato de a proteína de ligação 3 do IGF se ligar aos IGFs com elevada afinidade e expressão espécie-específica dentro da glândula mamária e por isso ser difícil a determinação dos papéis biológicos desta proteína de ligação durante a lactação, Flint et al. (2000) propõe um papel para a IGFBP-5 na glândula mamária envolvendo a iniciação de apoptose induzida por sequestro do IGF-1. Esta proteína de ligação mantém a sua alta afinidade para o IGF-1, presente em concentrações extremamente elevadas em comparação com o fator de crescimento. Sendo provável que a IGFBP-5 seja capaz de impedir a interação de IGF-1 com seu receptor nas células epiteliais que sintetizam leite. Além disso, IGFBP-5 interage com α_2 -caseína e essa interação implica na regulação da ativação do plasminogênio na glândula mamária. Assim IGFBP-5 desempenha um papel chave na coordenação dos processos de morte celular e remodelação de tecidos.

2.1.3 Polimorfismos no gene *IGF-1*

Zhang et al. (2008) identificaram uma transversão de nucleótidos de G para C no íntron 4 do gene *IGF-1* (de 558 pb a 608 pb), na posição 589 da sequência (número de acesso D26118) em cabras Nanjinag Huang. O alelo C foi definido como o nucleótido com a mutação G \rightarrow C, e o alelo G como o sem esta mutação, resultando numa alteração de leucina

(Leu) a valina (Val) no aminoácido 41 do peptídeo sinal. Dois alelos e três genótipos foram observados em um grupo de 592 cabras. A frequência genotípica foi de 35,8, 37,5 e 26,7% para GG, GC e CC, respectivamente. As frequências dos alelos G e C foram de 54,6% e 45,4%, respectivamente. A distribuição das frequências dos alelos e dos genótipos apresentou desvios significativos ($P < 0,01$) do equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que o locus está sob pressão de seleção nesta população. As diferenças entre essas frequências são possivelmente devido a fertilização artificial e seleção a longo prazo em direção a elevada taxa de crescimento. Os resultados mostraram que as cabras com genótipo CC tiveram maior peso ao nascer (BW), peso aos seis meses (W6), peso aos 12 meses (W12), crescimento aos dois meses (G2), comprimento corpóreo aos seis meses (L6), altura aos seis meses (H6), altura aos 12 meses (H12) e crescimento aos 12 meses (G12) do que aquelas com o genótipo de GC, e as cabras GC maior peso aos 12 meses, altura aos seis meses, altura aos 12 meses e crescimento aos 12 meses do que aquelas com o genótipo GG ($P < 0,05$), o que demonstra um efeito de dominância do alelo C sobre o alelo G para peso ao nascimento, peso aos seis meses e peso aos 12 meses, indicando que os animais com genótipo CC têm maior taxa de crescimento após o desmame.

No trabalho de Bonakdar et al. (2010) os alelos A e B do gene *IGF-I* foram identificados com base na amplificação de um fragmento de 249 pb localizado na região reguladora do gene, seguido de digestão com a enzima de restrição *SnaBI*. Foi estimada a frequência dos alelos e dos genótipos em 250 vacas da raça Holandesa de quatro rebanhos diferentes, além da associação com a produção de leite (para 305 dias de lactação) e componentes do leite (produção e percentual de proteína e gordura). Os genótipos AA e AB foram os mais (0,583-0,661) e menos (0,083-0,192) frequentes nos rebanhos, respectivamente; a frequência do genótipo BB variou de 0,201 a 0,333. A frequência do alelo A variou de 0,375 a 0,495, enquanto que a do alelo B variou de 0,504 a 0,625, sendo o alelo dominante. Os autores verificaram que o genótipo AB foi superior ao AA e BB para a percentagem de gordura e proteína do leite, podendo ser selecionado para ganhos genéticos nestas características.

Sharma et al. (2013) fizeram um estudo sobre a diversidade de SNPs no gene *IGF-I* em caprinos para a identificação de SNPs e estruturação genética em raças de caprinos indianos. Um total de 80 amostras pertencentes a nove raças de caprinos indianos, incluindo três raças de grande porte (Jamunapari, Beetal e Jakhrana); três raças de médio porte (Sirohi, Barbari, e Osmanabadi) e três raças de pequeno porte (Preto Bengala, Changthangi, e Gadi), foram coletadas para a identificação e análise da diversidade de SNPs. A análise da sequência das nove raças de cabras estudadas revelou um total de 18 SNPs, dentre eles, um SNP na região 5' UTR, nove SNPs em região codificadora e os oito restantes na região intrônica. Todas as alterações de nucleótidos foram consideradas sinônimas. A frequência do alelo principal para os 18 SNPs segregantes variou de 0,88 a 0,99. A média observada de heterozigose foi encontrada sendo máxima (0,074) em Sirohi, Beetal, Osmanabadi e Gadi, ao passo que foi encontrada mínima (0,019) em cabras da raça Preto Bengala, enquanto que nas restantes foi intermediária em termos de heterozigosidade. Os polimorfismos encontrados podem ser utilizados tanto em estudos da diversidade entre as raças como na descoberta de associações com características de importância econômica.

Supakorn and Pralomkarn (2013) selecionaram o gene *IGF-I* como gene candidato para características de crescimento em uma população de cabras na Tailândia. As características avaliadas foram o peso ao nascimento (BW) e peso a desmama (WW). O DNA de 171 amostras de animais das raças Boer (B), nativa tailandesa (TN), Anglo-Nubiana (AN) e Saanen (SA) foram isolados. Seis genótipos (AA, AC, BB, BC, CC e DD) foram encontrados, com o AA tendo as maiores frequências genotípicas. Os homocigotos BB, CC e DD tiveram as mais baixas frequências genotípicas. O genótipo CC apresentou maior BW e

WW que os outros ($P < 0,05$). Com base nos resultados, este gene pode ser explorado como candidato para a selecção por marcadores moleculares em cabras após sua verificação e validação em um número maior de animais e em outras raças.

2.2 O Fator de Transcrição Nuclear 1-C2 (NF1-C2)

2.2.1 Fatores de transcrição

A importância dos fatores de transcrição para a expressão gênica está relacionada ao processo de transcrição, em que uma molécula de RNA é produzida a partir do DNA, sendo posteriormente convertida em uma proteína. Ou seja, se a informação genética de cada indivíduo contida no DNA determina as correspondentes características através das proteínas produzidas a partir do seu respectivo RNA, esse processo de produção do mesmo é essencial para todas as etapas seguintes, no caso de eucariotos. Assim, a transcrição se torna um ponto chave na regulação da expressão dos genes, tanto em células particulares de um tecido ou em resposta a um sinal específico (LATCHMAN, 2002).

Os fatores de transcrição são necessários para ligar-se ao DNA e influenciar a taxa de transcrição, positivamente ou negativamente, regulando com isso a expressão dos genes em resposta a estímulos específicos e/ou em tipos celulares específicos. Por consequência, devem ter sua atividade rigorosamente regulada para se tornarem ativos apropriadamente, garantindo que os genes sejam ativados no momento e local corretos. Dois mecanismos básicos pelos quais a ação de fatores de transcrição pode ser regulada envolvem o controle da síntese do fator de transcrição de modo que ela é feita apenas quando necessário, ou alternativamente, regulando a atividade do fator de modo que a proteína pré-existente torna-se ativada, quando necessário (DARNELL, 1982; LATCHMAN, 2004).

Considerando ainda o papel fundamental da estrutura da cromatina, das sequências de DNA e da RNA polimerase no processo de transcrição e regulação, o aspecto restante diz respeito aos fatores de transcrição que ligam-se a sequências específicas da molécula de DNA expostas por modificações na estrutura da cromatina e então alteram a transcrição através da interação direta ou indireta com a RNA polimerase. Para desempenhar esta função, os fatores de transcrição devem possuir determinadas características que os permitem modular a expressão gênica. A primeira delas, para muitos destes fatores, é a habilidade de ligar-se a uma sequência de DNA de maneira específica e, a partir da ligação, interagir com outros fatores ou com a RNA polimerase a fim de influenciar a transcrição tanto positiva quanto negativamente (LATCHMAN, 2004).

O processo da transcrição dos genes pela RNA polimerase II é realizado através da ação conjunta de três classes de fatores proteicos. Uma classe compreende fatores gerais de transcrição necessários para a montagem ordenada de um complexo ativo de pré-iniciação. A maquinaria basal envolve também a participação de fatores regulatórios específicos, normalmente caracterizados pela existência de domínios de ativação de ligação ao DNA. A terceira classe de fatores funciona como proteínas coativadoras mediando interações entre fatores de transcrição gerais e específicos (WENZELIDES et al., 1996).

Os fatores de transcrição possuem uma organização modular típica que consiste em dois domínios funcionalmente distintos referentes à sequência específica de ligação ao DNA e de transcrição. Os primeiros são frequentemente encontrados adjacentes às regiões necessárias para a oligomerização de proteínas, sendo na maioria dos casos necessários para o reconhecimento de DNA e apresentam configurações estruturais altamente ordenadas e bem definidas. Em contraste, os domínios responsáveis pela transcrição podem não possuir tal organização estabelecida e a hipótese é de que tornam-se estruturados somente por meio da interação com fatores de transcrição basais (ROULET et al., 1995). Os domínios de ativação

têm sido agrupados em três classes, dependendo da sua composição de aminoácidos: ácido, rico em glutamina ou rico em prolina (CHAUDHRY et al., 1998).

Apesar de muitos trabalhos destacarem as proteínas de ligação específicas ao DNA que coordenam a transcrição em células eucarióticas, existem evidências de que as mesmas também participam de processos como o início da replicação do DNA, além da integração, recombinação e transposição. E por meio da análise detalhada dessas proteínas versáteis, o estudo da potencial relação de regulação de mecanismos variados vem sendo mais esclarecida (MERMOD et al., 1989).

2.2.2 A família do fator nuclear 1 (NF1)

Os fatores de transcrição da família de proteínas do fator nuclear 1 (NF1) são um exemplo típico de organização modular. Foi inicialmente identificado por Nagata et al. (1982) como uma proteína nuclear que se liga a origem de replicação do adenovírus para a iniciação eficiente da replicação de DNA *in vitro* e posteriormente sítios vinculados ao NF1 foram identificados em outros promotores virais e celulares, conforme revisado por Inoue et al. (1990), ativando ou inativando a transcrição, e também atuando sinergicamente com moduladores da transcrição em humanos e leveduras.

Em adenovírus, o estímulo à iniciação da replicação do DNA pelo fator nuclear 1 (NF1) ocorre por meio de uma proteína inicial em que um resíduo de dCMP (do inglês 'deoxycytidine monophosphate deaminase activity'), uma deaminase desoxicitidina monofosfato é acoplada a região terminal dessa proteína precursora e o alongamento subsequente ocorre através de um mecanismo de deslocamento em cadeia (DEKKER et al., 1996).

Essa família de proteínas representa um grupo específico de sequências de ligação ao DNA que reconhecem sequências de consenso 5'- TTGGC(N₅)GCCAA-3'. Diversas classes de cDNA que codificam o NF1 foram isoladas de humanos, rato, hamster e porco, demonstradas serem necessárias para a correta expressão de vários genes (NAGATA et al., 1983; GOYAL et al., 1990).

Segundo Jones et al. (1987) e Santoro et al. (1988), o NF1 é provavelmente idêntico ao fator de transcrição de ligação à CCAAT, uma proteína envolvida na expressão de diversos genes. A partir dessa semelhança identificada, as proteínas NF1 foram também reconhecidas como fator de transcrição CCAAT, entretanto por se ligarem a apenas um pequeno grupo dessas sequências e devido aos primeiros cDNA terem sido clonados de genes NF1-C, a família pode ser chamada de NF1/CTF e os fatores de transcrição e proteínas NF1-C, referidos como CTFs (DORN et al., 1987). Foi confirmado após outros estudos em vários organismos que essa proteína vista como única, pertencia a uma família de múltiplos fatores de transcrição.

O domínio de ligação ao DNA das proteínas NF1 não mostra semelhança óbvia a qualquer sequência das classes conhecidas de domínios de ligação ao DNA, tais como dedos de zinco, zíper de leucina ou hélice-alfa-hélice. Um suposto segmento α -helicoidal mediando o contato ao DNA foi identificado por Santoro et al. (1988).

Com base na composição de aminoácidos, estão agrupadas na classe de ativadores ricos em prolina (CHAUDHRY et al., 1998). Tem sido demonstrado que os mecanismos de ação dos domínios de ativação ácidos e ricos em prolina são fundamentalmente semelhantes em organismos eucarióticos desde leveduras até seres humanos, embora os mecanismos exatos através dos quais diferentes tipos de domínios de ativação estimulam a transcrição não sejam conhecidos (WENZELIDES et al., 1996).

Em vertebrados, a família NF1 consiste em quatro membros, denominados NF1-A, NF1-B, NF1-C, e NF1-X, que variam em tamanho de ~30-100 kilodaltons (kDa), cada um

codificado por um gene diferente e altamente conservados desde frango até humanos. Cada um deles possui diferentes isoformas geradas por *splicing* alternativo, que corresponde a uma variação de produtos dos genes gerada por processamento alternativo do transcrito primário do RNAm (GOYAL et al., 1990; RUPP et al., 1990). A figura 3 mostra a estrutura geral do gene comparando com a de cada isoforma e seus *splicing* alternativos (GRONOSTAJSKI et al., 2000).

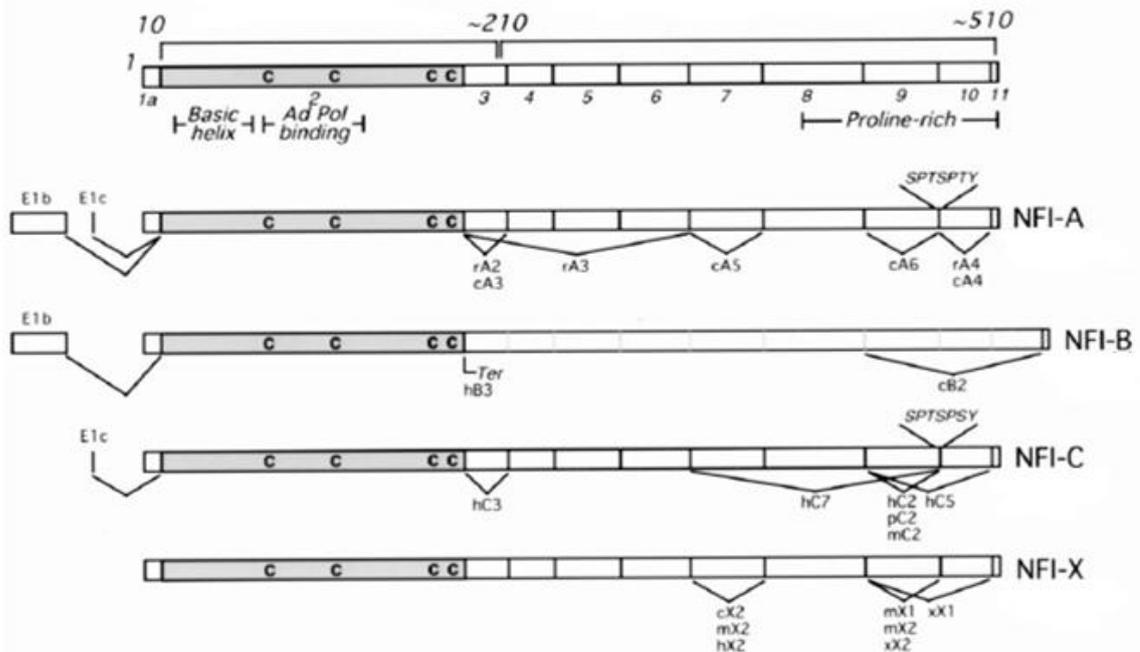


Figura 3. Domínios e *splicing* alternativo dos genes NF1 em vertebrados. A primeira linha ilustra características gerais e as demais os produtos de *splicing* alternativo dos quatro genes NF1 em vertebrados. A estrutura geral de codificação é composta por 11 éxons (caixas) com o domínio de ligação ao DNA e a dimerização da região N-terminal codificado predominantemente pelo éxon 2 (caixa cinza). Dentro do segundo éxon estão quatro resíduos de cisteína conservados (rotulados de C) necessários para uma regulação da ligação ao DNA, o de redox de ligação, um domínio de base alfa helicoidal (*basic helix*) e o domínio de ligação da polimerase (*Ad Pol binding*). Os números acima da linha são números aproximados de resíduos e os que estão abaixo da linha são números dos éxons. As regiões C-terminal de cada domínios (Transativação e repressão) codificam proteínas especializadas, incluindo o domínio de transativação rica em prolina (*Proline-rich*). Para cada gene, os maiores cDNAs existentes contêm 11 éxons, e isoformas de *splicing* alternativo são mostradas por colchetes abaixo de cada gene com seus nomes abaixo. Primeiros éxons alternativos são apresentados por caixas ou linhas conectadas ao segundo éxon. Os nomes dos primeiros éxons denotam conservação das regiões de codificação, éxons 1a (8-10 aa), 1b (32-47 aa) e 1c (1 aa). (*Adaptado de Gronostajski et al., 2000*).

De acordo com Chaudhry et al. (1998) os quatro diferentes genes NF1 em vertebrados, a expressão diferencial durante o desenvolvimento e a expressão regulada dos genes dependentes de NF1 em vários órgãos, como cérebro, músculo, pulmão, fígado, dentre outros tecidos, confirmam as diferentes propriedades de modulação da transcrição das proteínas NF1.

A formação de heterodímeros indica a formação de dímeros de NF1 estáveis na ausência de DNA, permitindo elevado grau de controle dos sítios de ligação e acrescenta, ao lado da diversidade genética e *splicing* alternativo, outro nível de diversidade a esta família de proteínas, gerada também por modificações em nível pós-transcricional de regulação da estabilidade do RNAm e pós-traducionais, por fosforilação ou glicosilação, o que aumenta o número de proteínas de ligação ao DNA (KRUSE; SIPPEL et al., 1994; FURLONG et al., 1996).

Em sua maioria, o *splicing* alternativo cria proteínas NF1 de tal maneira que os fatores de transcrição resultantes apresentam especificidade de ligação ao DNA conservada, mas estruturas do domínio de ativação alteradas (GRÜNDER et al., 2003).

Os polipeptídeos NF1 contêm um domínio N-terminal conservado de aproximadamente 220 aminoácidos, onde ocorre a ligação ao DNA tanto como homo e heterodímeros, através de um domínio de ligação que contém quatro cisteínas essenciais à iniciação da transcrição e reconhecem o local consenso de ligação com semelhante afinidade. A distinção é feita pela variação existente nos domínios C-terminal, que supostamente codificam domínios de modulação de transcritos distintos. (ROULET et al., 1995; CHAUDHRY et al., 1998).

Em cada um dos genes *NF1*, o domínio de ligação ao DNA N-terminal é codificado principalmente por um único éxon (o éxon 2). Os genes *NF1-C* e *NF1-X* parecem ser os membros mais estreitamente relacionados tanto pela comparação da sequência dos quatro genes da família, quanto pelas regiões de localização no cromossomo em humanos (QIAN et al., 1995). Embora a via de duplicação dos genes que geraram a família NF1 seja desconhecida, estes dados de co-expressão (em conjunto com a co-localização no genoma) podem indicar que o *NF1-C* e *NF1-X* foram gerados por uma duplicação relativamente recente durante a evolução dos vertebrados (CHAUDHRY et al., 1997).

Na hipótese de Gründer et al. (2002) os resultados da análise de *splicing* alternativo e mapeamento dos genes *NF1* no genoma de rato e humano, os quatro genes *NF1* de vertebrados resultam de uma duplicação de um único segmento genômico contendo dois genes intermediários ao *NF1*, em vez de duas duplicações independentes de dois genes separados por um único ancestral. E assim, os genes *NF1-A* e *NF1-C*, e *NF1-B* e *NF1-X* assemelhem-se uns aos outros em grau de *splicing* alternativo para a duplicação filogenética de um segmento de DNA intermediário, contendo dois diferentes genes *NF1* localizados próximos.

As interações entre o domínio C-terminal rico em prolina de uma isoforma humana NF1-C e componentes da maquinaria de transcrição basal sugerem que este domínio de transativação de NF1-C pode funcionar por meio de reforço no recrutamento de componentes da transcrição para promotores que contenham sítios de ligação para o NF1, aumentando assim a taxa de transcrição. Esses sítios de ligação para proteínas NF1 estão presentes em genes expressos em tecidos múltiplos e em genes expressos exclusivamente em cérebro, músculo, fígado, glândula mamária e outros tipos de células diferenciadas (CHAUDHRY et al., 1997).

A primeira base molecular das propriedades de ativação do produto do gene *NF1-C* (NF1-C/CTF1) é a presença de uma região homóloga ao domínio C-terminal da RNA polimerase II (do inglês CTD 'C-terminal domain') e o fato desta região interagir fisicamente com componentes da maquinaria de transcrição basal. Essa interação tem sido proposta como atuante no aumento da taxa de transcrição pelo recrutamento de proteínas de transcrição para promotores contendo sítios de ligação NF1 (ALTMANN et al, 1994; KIM; ROEDER, 1994).

No entanto, as proteínas NF1-B e NF1-X isoladas por Chaudhry et al. (1997) podem ativar a transcrição, apesar de não conterem uma repetição semelhante ao domínio CTD. Estes dados indicam que domínios adicionais das proteínas NF1 podem participar de

interações de modo a promover a ativação da transcrição no lugar da repetição CTD, com aparentes diferenças no potencial de ativação entre os produtos dos genes NF1, indicando que o tipo de modulação específica da transcrição pelas proteínas NF1 pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de mamíferos.

Segundo Steele-Perkins et al. (2003) alterações nos genes *NF1-C* resultam em graves defeitos no desenvolvimento dentário. Ratos deficientes tiveram principalmente a formação da raiz afetada, e que sem os cuidados de criação adequados pode levar a morte do animal. Sendo assim, a falta de regulação de qualquer um dos genes *NF1* traz fenótipos específicos de desenvolvimento, evidenciando que cada um têm suas funções únicas para o desenvolvimento dos organismos.

As regiões dos polipeptídeos NF1-C (NF1-C1, NF1-C2, NF1-C5 e NF1-C7) necessários para ligação ao DNA, dimerização e replicação localizadas na região N-terminal, assim como a estrutura de ativação da transcrição das proteínas são mostrados na figura 4 (CHIKHIRZHINA et al., 2008). Destaca-se também a conservação da região N-terminal entre as isoformas representadas, enquanto que a parte C-terminal, onde se localiza a região responsável pela transcrição, é divergente entre as mesmas.

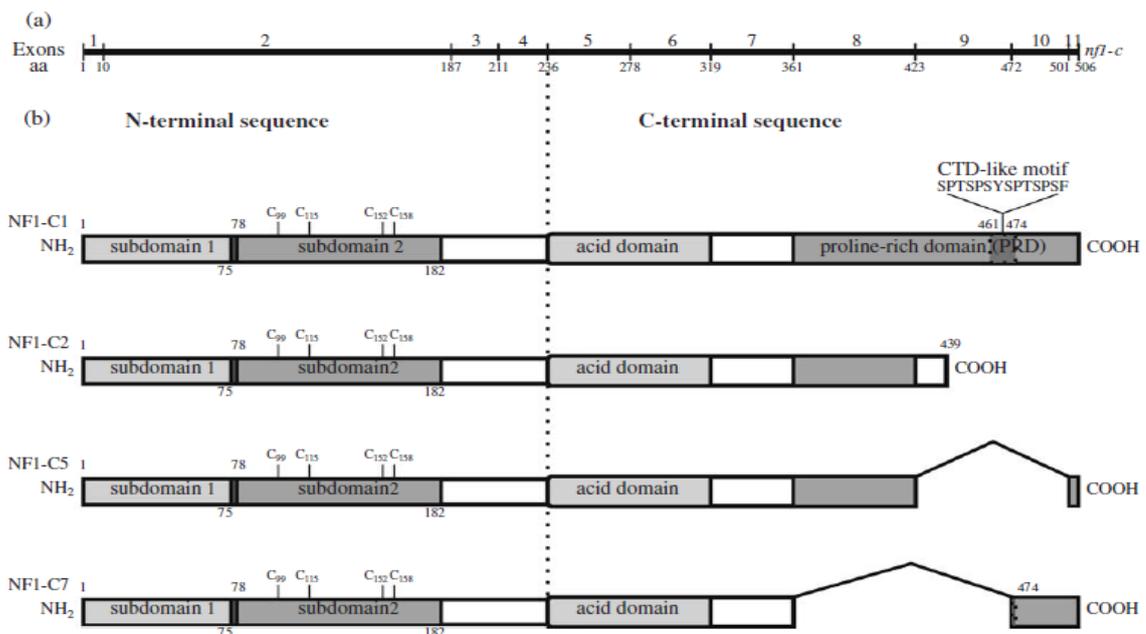


Figura 4. (a) Esquema da organização e estrutura dos polipeptídeos NF1-C, com a posição de alguns aminoácidos e resíduos de aminoácidos codificados, indicados por números na parte inferior; (b) Comparação da estrutura e organização dos domínios de algumas das variantes de NF1-C (NF1-C1, NF1-C2, NF1-C5 e NF1-C7). Adaptado de Chikhirzhina et al. (2008).

Wenzelides et al. (1996) compara a atividade de transcrição de um dos membros da família NF1/CTF, o CTF-5 com as proteínas CTF-1, CTF-2 e CTF-7. CTF-1 representa o produto de 70 kb do gene NF1/CTF, composto por 11 éxons. Contém um domínio N-terminal de ligação ao DNA e o domínio de dimerização, bem como o domínio de transativação rica em prolina localizado no C-terminal. O derivado CTF-2 não tem o éxon 9 como resultado de *splicing* alternativo. A remoção deste éxon cria uma rescisão dentro do éxon 10. CTF-7 não tem o éxon 7, 8 e 9. No entanto, o processo de *splicing* não altera o enquadramento de leitura para os éxons 10 e 11. O CTF-5 carece dos éxons 9 e 10 e, portanto, este não inclui a região rica em prolina inteira e nem o motivo CTD relacionado, demonstrados como essenciais para

a transcrição de CTF-1. Na figura 4 também estão representadas as estruturas dessas quatro formas da família NF1/CTF, caracterizando cada uma delas. Neste mesmo trabalho, foi concluído que diferentes derivados das proteínas CTF exibem um amplo espectro de atividade de transativação, sendo que o membro CTF-5 ativa a transcrição em *Saccharomyces cerevisiae* em maior grau do que as outras formas de CTF analisados. Isto sugere que várias proteínas derivadas de variantes CTF de processamento natural, ativam a transcrição em diferentes graus e que o potencial para a obtenção de fatores com diferentes atividades a partir do mesmo gene adiciona uma nova dimensão aos mecanismos existentes para a modulação da expressão do gene.

A proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 5 (IGFBP-5) é expressa em muitos tipos celulares, possuindo uma alta afinidade específica para a matriz óssea, sendo a mais abundante IGFBP armazenada no osso. Ela é expressa em osteoblastos e seus precursores, estimula a proliferação e protege da apoptose *in vitro*. Neste estudo de Pérez-Casellas et al. (2009) verificou-se que a transcrição de IGFBP-5 é modulada diferencialmente em células osteoblásticas humanas por membros da família de fatores de transcrição NF1 através da ligação ao elemento consenso na região promotora, o que sugere que estas proteínas têm um potencial papel na regulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos. Todos os quatro genes NF1 foram expressos em culturas de osteoblastos humanos e os vetores de expressão mostraram que *NF1-B* foi o mais ativo em estimular a transcrição e *NF1-X* o menos ativo enquanto *NF1-A* e *NF1-C* foram inibidores. O que sugere que os genes da família NF1 são reguladores importantes da expressão das proteínas IGFBP-5 em osteoblastos humanos e, assim, na modulação das funções de IGFBP-5 no osso, mediando a ativação ou repressão da transcrição de IGFBP-5.

Alguns genes de proteínas do leite têm sido amplamente estudados como modelo para compreender estágios específicos do desenvolvimento e expressão de genes na glândula mamária, por demonstrarem desempenhar um papel em células específicas e com função de regulação de expressão de outros genes. Dentre eles, vários fatores de transcrição, hormônios peptídicos e esteroides, mostram a influência na expressão de genes da proteína do leite (FURLONG et al., 1996).

Na glândula mamária, membros da família NF1 desempenham um papel crítico na ativação de promotores de genes da proteína do leite durante a lactação, e a atividade de ligação ao DNA de algumas formas de NF1 se mostra dependente da matriz extracelular em células epiteliais mamárias (FURLONG et al., 1996).

Exemplos importantes são genes específicos da glândula mamária, tais como o *WAP*, que codifica a principal proteína ácida do soro do leite (do inglês '*whey acidic protein*') e é expressa quase exclusivamente na glândula mamária (BURDON et al., 1991). O gene *CEL*, que codifica a enzima carboxil éster lipase (do inglês '*carboxyl ester lipase*'), uma lipase na qual a glândula mamária e pâncreas constituem os principais tecidos para sua síntese e secreção, e os genes que codificam a β -lactoglobulina e β 1,4-galactosiltransferase.

A atividade da enzima carboxil éster lipase está associada ao fato da capacidade do recém-nascido para digerir lípidos do leite ser menor durante os primeiros meses de vida. Assim, uma proteína que facilita a absorção compensatória de gordura é necessária. A enzima CEL é sugerido para desempenhar um papel importante durante o desenvolvimento precoce de crianças e nos adultos, facilitando a absorção de gordura, não só para a produção de uma atividade lipolítica mais elevada, mas também por ser qualitativamente diferente de lipase pancreática (LIDMER et al., 1995).

A regulação destes genes de proteínas do leite tem sido extensivamente estudada em células epiteliais mamárias, levando à identificação de importantes elementos que são necessários para a regulação dos mesmos, como os fatores e ativadores de transcrição, sendo um deles o fator nuclear 1 (NF1) (KANNIUS-JANSON et al., 1998).

De acordo com Mukhopadhyay et al. (2001) a expressão do gene *WAP* na glândula mamária de ratos aumenta no meio da gestação, é mais elevada durante a lactação e diminui rapidamente no início da involução. Neste estudo, isoformas NF1 específicas (NF1-A4, NF1-B2 e NF1-X1) foram clonadas a partir de RNAm isolados a partir do segundo dia de lactação com o objetivo de investigar o papel destas isoformas específicas na regulação da expressão do gene *WAP*, sendo demonstrada cooperatividade transcricional entre os três fatores nucleares de transcrição da proteína *WAP*. Além disso, a especificidade ao DNA de ligação das três isoformas NF1 específicas parece ser correlacionada com a sua capacidade de ativar a transcrição do gene *WAP*.

Diferentes membros da família NF1 podem ser expressos em linhagens celulares distintas, como em células epiteliais e fibroblastos, indicado através de extratos nucleares obtidos desses dois tipos por APT et al. (1994), em que três diferentes formas de *splicing* do NF1-C, o CTF-1, CTF-2 e CTF-3 apresentaram perfis de ligação ao DNA semelhantes nas células epiteliais, sugerindo predomínio da expressão das mesmas em células epiteliais.

2.2.3 O fator nuclear 1-C2 e a produção de leite

A morfogênese da glândula mamária é um processo complexo que ocorre em fases específicas durante o desenvolvimento pós-natal, passando por repetidos ciclos de desenvolvimento e regressão no animal adulto, sendo regulado, em grande parte, por estímulos hormonais, tais como o estrogênio, progesterona e prolactina. Pesquisas recentes têm elucidado o mecanismo de regulação hormonal da glândula e as vias de sinalização envolvidas, mas pouco se sabe sobre os fatores de transcrição específicos que são alvos dos hormônios e que afetam o desenvolvimento, regulando a transcrição gênica (JOHANSSON et al., 2005).

Segundo Murtagh et al. (2003) a família dos genes *NF1* exercem funções importantes durante o ciclo de desenvolvimento da glândula mamária, como esta glândula é um órgão com desenvolvimento predominantemente pós-natal, seus estágios de crescimento e diferenciação para a lactação seguido de remodelação associada a involução fornecem a oportunidade de desvendar um pouco sobre o envolvimento desses fatores para a complexa expressão de genes específicos em tecidos como o desta glândula.

A quantidade de proteínas NF1-C em células epiteliais mamárias não é regulada a nível transcricional, uma vez que foram encontrados altos níveis de transcritos NF1-C também em fases em que não foi detectada qualquer proteína NF1-C, sugerindo uma regulação pós-transcricional (KANNIUS-JANSON et al., 2002). A proteína NF1-C2 varia durante o desenvolvimento da glândula mamária até a gravidez, sendo fortemente induzida no 13º dia da gravidez, e mantida até o início da lactação.

A isoforma NF1 específica NF1-C2 foi identificada como um importante regulador transcricional do gene *p53* na glândula mamária de rato na metade da gestação. A proteína supressora de tumor denominada *p53* desempenha um papel importante na prevenção do desenvolvimento do câncer, prendendo ou matando células tumorais potenciais. A importância da *p53* no epitélio mamário foi evidenciada pela associação da alta frequência de mutações e expressão alterada do gene *p53* com a ocorrência de tumores na mama (COLES et al., 1992, WISEMAN; WERB, 2002).

A mutação funcional no local de ligação do NF1 ao promotor do gene *p53* de rato resultou numa redução da expressão do gene para menos de 30% em células epiteliais mamárias (JOHANSSON et al., 2003). O mecanismo dessa supressão é desconhecido, no entanto, a sobre-expressão de NF1 induz várias alterações morfológicas, incluindo o aumento da adesão celular e achatamento da monocamada de células, o que pode ser necessário para a supressão (CHAUDHRY et al., 1997).

Além disso, o fato do NF1-C2 regular outros genes, como *CEL* e *WAP*, sugere um papel mais amplo deste fator, participando tanto do estabelecimento de uma glândula funcional, como na proteção da glândula contra tumores durante a fase proliferativa.

Os genes *WAP* e *CEL* são induzidos aproximadamente ao mesmo tempo durante o desenvolvimento da glândula mamária e de acordo com Kannius-Janson et al. (2002) a ligação do NF1-C2 na região promotora do gene *CEL* aumentou no 13º dia de gestação, sugerindo assim, que existe uma ligação entre a indução desses genes e o NF1-C2 na gestação.

Outro papel do NF1 seria na regulação da transcrição de um gene associado à involução mamária, o *TRPM2* (do inglês '*Transient Receptor Potential Cation Channel M2*'). O aumento da expressão deste gene apresentou relação com involução da glândula mamária e a apoptose de uma série de diferentes tipos celulares de ratos (MURTAGH et al., 2003).

Johansson et al. (2005) demonstrou que a prolactina desempenha um papel importante no nível basal de proteínas NF1-C2 nos núcleos epiteliais mamários, pois ao tratar uma cultura de células epiteliais mamárias com prolactina por 15 min, o nível de proteínas NF1-C2 nos núcleos foi aumentado. O curto tempo de tratamento sugere um efeito direto da prolactina sobre os níveis de NF1-C2. Outro achado interessante neste trabalho foi a acentuada diminuição dos níveis de proteínas NF1-C2 em células epiteliais diferenciadas no período de lactação. A razão para isto é atualmente desconhecida. O que se especula é que o fator NF1-C2 tenha um papel importante no estabelecimento da glândula mamária funcional e, portanto, não é mais necessário nas células secretoras diferenciadas, sugerindo que o NF1-C2 é importante para a iniciação e não na manutenção da expressão dos genes das proteínas do leite. Outro mecanismo pelo qual NF1-C2 poderia iniciar a expressão é através da abertura da cromatina para aumentar a acessibilidade para outros fatores, não podendo com isso, excluir a possibilidade de que outros membros da família NF1 estariam envolvidos na regulação desses genes em lactação.

Sob a gestação, o fator NF1-C2 fornece um estímulo mitogênico, enquanto que em lactação tem propriedades de manutenção. Embora os níveis de proteína NF1-C2 tenham diminuído em lactação, a produção de RNAm pareceram inalterados. Assim, esta redução nos níveis de proteína, mas não nos níveis de mRNA sugere que a NF1-C2 é regulada pós-transcricionalmente. De acordo com os autores, estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o apesar do gene *NF1-C2* exercer um papel importante na ativação de genes relacionados com a produção de leite, os níveis da proteína NF1-C2 são reduzidos durante o período de lactação (JOHANSSON et al., 2005).

Wang et al. (2011) identificaram um polimorfismo de PCR-RFLP *EcoRII* (SNP G/A) no gene *NF1-C2* em cabras de três raças chinesas, Xinong Saanen, Guanzhong e Xinjiang cashmere branca, e avaliaram a associação deste polimorfismo com a produção de leite em diferentes estágios da lactação para uma delas, a raça Xinong Saanen. Foram encontrados os genótipos AA, AG e GG, com as frequências genotípicas de 0,422, 0,056 e 0,522 para a Xinong Saanen (n=249); 0,402, 0,206 e 0,392 para a Guanzhong (n=408) e 0,176, 0 (nula) e 0,824 para a Xinjiang cashmere branca (n=119), respectivamente. Apesar de não ser constatada associação significativa com a produção de leite ($P > 0,05$), foi observado que na terceira lactação o genótipo GG tendeu a uma associação com maior produção de leite, em comparação ao genótipo AA ($P = 0,07$).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Composição da Amostra e Extração do DNA Genômico

Foi utilizado um rebanho de cabras (*Capra hircus*), em idade reprodutiva, composto por animais das raças Saanen e Alpina, sendo considerada uma única população, alojadas no setor de caprinocultura da Universidade Federal de Viçosa-MG (UFV).

As cabras foram mantidas em baias coletivas, em sistema de confinamento (*free stalls*), com piso de cama e livre acesso à água, sal mineral e solário, e alimentados com silagem de milho, feno de capim Tifton-85 (*Cynodon sp.*), de acordo com a disponibilidade, e mistura concentrada, a base de fubá de milho, farelo de trigo e farelo de soja, fornecida duas vezes ao dia, formuladas para atender às exigências de animais em lactação de acordo com o AFRC (1993).

O monitoramento da produção e da composição do leite faz parte de procedimentos rotineiros realizados neste rebanho. Desta forma, a partir do parto, as cabras são monitoradas individualmente uma vez por semana para a mensuração da produção de leite no dia do controle e amostras individuais de leite são coletadas uma vez ao mês. Estas coletas são realizadas simultaneamente às ordenhas da manhã e da tarde, em vasilhame contendo o conservante Bronopol[®] (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol). Posteriormente as amostras são encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite da UFV para quantificação da contagem de células somáticas e dos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco total.

Para a genotipagem desses animais, foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue em tubos de *vacuntainer* estéreis contendo EDTA 8% (ácido etilenodiamino tetraacético). Os tubos contendo sangue coletado foram deixados em repouso, coletando-se a fase intermediária, onde se depositam os leucócitos. Esta camada foi transferida para tubos estéreis para o posterior isolamento do DNA.

Para o isolamento de DNA foi utilizado 100 µL de leucócitos de cada amostra e acrescidos 500 µL do tampão a base de brometo hexadeciltrimetilamônio 2% (CTAB 2%) em tubo de 2mL, seguindo o protocolo descrito por Lodhi et al. (1994) e modificado por Soares et al. (2009). Foram genotipados 168 animais para o gene *IGF-1* e 197 para o *NFI-C2*.

3.2 Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese

A amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada por intermédio da reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Para a execução desta técnica referente ao gene *IGF-1*, nos tubos de reação foram adicionados: 200 nM de cada *primer* (Tabela 1), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, 1,5 mM de MgCl₂, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), e aproximadamente 100 ng de DNA genômico, em um volume final de 20 µL. O programa do termociclador Applied Biosystems[®] ProFlex™ PCR System consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C por 40s para a desnaturação das fitas, anelamento dos *primers* a 56°C por 35s, extensão da fita pela *Taq* a 72°C por 35s e uma etapa final de extensão a 72°C durante 10 min.

Para o gene *NFI-C2* a reação seguiu as seguintes condições: 200nM de cada *primer* (Tabela 1), 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, 3,75mM de MgCl₂, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia LTDA), tampão da enzima, e aproximadamente 100 ng de DNA genômico, em um volume

final de 20 µL. O ciclo consistiu em 4 min a 94 ° C, 34 ciclos de 94 ° C durante 30s, hibridação a 51,6 ° C durante 30s, extensão a 72 ° C durante 30s e extensão final a 72 ° C durante 10 min), em termociclador (LongGene – Model MG 96+).

O material amplificado foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) 5%, corado com solução de nitrato de prata 0,2 % para a avaliação dos fragmentos amplificados pela PCR.

Tabela 1. Sequência, tamanho e temperatura de anelamento dos pares de primers.

| Par de primers F: Forward (5' – 3') R: Reverse (5' – 3') | Região de anelamento do primer | Condições para PCR | Produto da PCR |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|
| F: CACAGCGTATTATCCCAC R: GACACTATGAGCCAGAAG | Éxon 4 e parcial íntron 4 do <i>IGF-1</i> Liu et al. (2010) 363 pb*** | 56/1,5/35* | PCR-RFLP Integrated DNA Technologies (IDT)** |
| F: CCCTACCTTAACCCTAACCA R: GTCCCGGACTGTGATTTGC | Éxon 5 do <i>NF1-C2</i> Wang et al. (2011) 233 pb*** | 51,6/3,75/30* | PCR-RFLP Integrated DNA Technologies (IDT)** |

*Temperatura de anelamento (°C) /concentração de MgCl₂ (mM)/ tempo de extensão da fita (segundos)

**Empresa especializada responsável pela síntese dos primers

***Tamanho do fragmento amplificado

IGF-1 - gene do fator de crescimento semelhante a insulina 1

NF1-C2 - gene que codifica o fator de transcrição nuclear 1-C2

3.3 Análise de PCR-RFLP

Após a amplificação dos fragmentos pela PCR, estes foram submetidos à digestão por uma endonuclease específica, técnica conhecida como polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição, ou simplesmente PCR-RFLP (do inglês *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*). As reações foram realizadas conforme as recomendações do fabricante para cada enzima em um volume final de 10 µL.

Fragmentos obtidos da PCR do gene *IGF-1* foram digeridos utilizando a endonuclease *HaeIII* (*Promega, Madison, WI, USA*) sendo incubadas em banho-maria a 37°C durante 8h. Os produtos de PCR do gene *NF1-C2* foram submetidos à digestão com a endonuclease *BstNI* (*BioLabs Inc., New England*) e incubadas em banho-maria a 37°C durante 16h (Tabela 2). Do mesmo modo, as avaliações dos fragmentos foram realizadas por intermédio de eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, corado com solução de nitrato de prata 0,2%.

Tabela 2. Sítios de corte das enzimas de restrição e padrão de corte para genotipagem.

| Gene | Endonuclease | Sítio de corte | Tamanho do fragmento (pb) | | |
|-------------------------------------------------|---------------|--------------------------|---------------------------|---------|---------------|
| | | | Amplificado (PCR) | Alelo | Alelo |
| <i>IGF-1</i> (D26119)* SNP g.5752 G>C | <i>HaeIII</i> | 5'GG↓CC3' 3'CC↓GG5' | 363 pb | A - 363 | B - 234/99/30 |
| <i>NFI-C2</i> (GQ169554)* SNP 44654G>A | <i>BstNI</i> | 5'CC↓WGG3' 3'GGW↓CC5' | 233 pb | G - 233 | A - 179/49/5 |

*Acesso da sequência gênica no *GeneBank* (Banco de dados internacional)

3.4 Sequenciamento

Para o sequenciamento das regiões específicas de cada gene em caprino, foram utilizados 40µL de amplificado (obtido por PCR) de diferentes animais selecionados de forma aleatória e correspondendo a cada genótipo observado, os quais foram enviados para a empresa *Macrogen INC, Seul Korea* (<http://www.macrogen.com/eng/>) para purificação e sequenciamento automático de acordo com a técnica de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977). As sequências geradas foram comparadas entre si e com a sequência depositada no *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST (ALTSZUL et al., 1997) e *ClustalW2*, disponível em www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2.

O objetivo do sequenciamento foi a confirmação da identidade do gene, devido ao fato de podermos estar amplificando um gene diferente do esperado, e com o sequenciamento se tem uma confiabilidade, além da confirmação dos polimorfismos já descritos e outros possíveis polimorfismos.

3.5 Análise Estatística

Uma vez identificados os polimorfismos nos genes *IGF-1* e *NFI-C2*, a associação destes polimorfismos com as características produção de leite, produção (kg) e teor (%) dos constituintes do leite (gordura, proteína, lactose e extrato seco total), duração da lactação e contagem de células somáticas foi realizada através do procedimento GLM do SAS[®] (2002), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + g_j + e_{ij}, \text{ em que:}$$

Y_{ij} é o valor genético do animal i de genótipo j para cada característica avaliada; μ é a média geral; g_j é o efeito do genótipo j dos genes *IGF-1* ($j = AA, AB, BB$) e *NFI-C2* ($j = AA, AG, GG$) e e_{ij} é o efeito aleatório do resíduo.

As estimativas dos valores genéticos das características avaliadas foram obtidas por Rego (2014) através de um modelo animal unicaracterístico. O aplicativo utilizado foi o REMLF90, descrito por Misztal (2002), que utiliza a metodologia de máxima verossimilhança restrita (REML) e o algoritmo de Maximização da Esperança (EM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Gene *IGF-1*

4.1.1 Amplificação da região de interesse do gene *IGF-1* por PCR

A partir dos *primers* divulgados por Liu et al. (2010) e seu respectivo protocolo, o fragmento de PCR equivalente ao gene *IGF-1* foi amplificado de maneira adequada a partir do DNA genômico extraído das amostras de sangue de caprinos. Os fragmentos observados apresentaram o tamanho de acordo com o esperado para a região gênica de caprinos, com 363 pb (Figura 5), e como pode ser visto na figura, apresentaram tamanho uniforme, não havendo polimorfismo no tamanho do amplificado. A região avaliada refere-se ao éxon 4 e região parcial do íntron 4, onde neste último, foi encontrado um SNP de interesse (*GenBank* D26119), identificado por Liu et al. (2010), localizado no íntron 4.

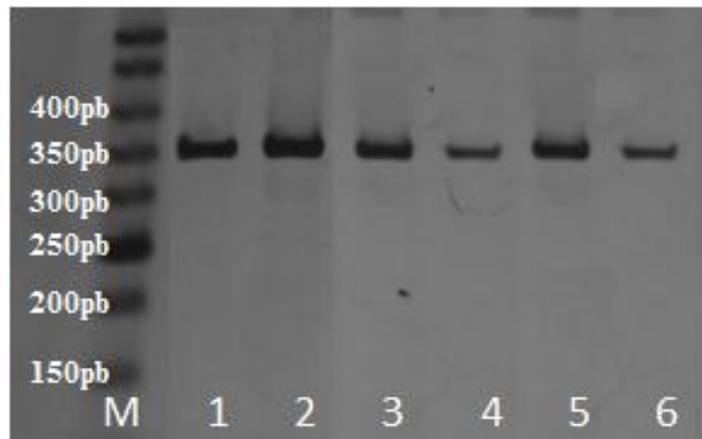


Figura 5. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base. Canaletas de 1 a 6 = fragmentos amplificados de aproximadamente 363 pb correspondentes ao íntron 4 do *IGF-1*.

4.1.2 PCR-RFLP

Houve o reconhecimento das sequências pela enzima *HaeIII*, com sítio de corte GG↓CC e o consequente corte dos fragmentos de produtos de PCR obtidos para o gene *IGF-1*. A mutação detectada refere-se a transversão G>C na posição 5752 (*GenBank* D26119).

O esquema do padrão de corte (Figura 6) mostra o padrão de bandas, os fragmentos de 234, 99 e 30 pb (alelo B), e o fragmento sem a clivagem, de 363 pb, correspondendo ao alelo A.

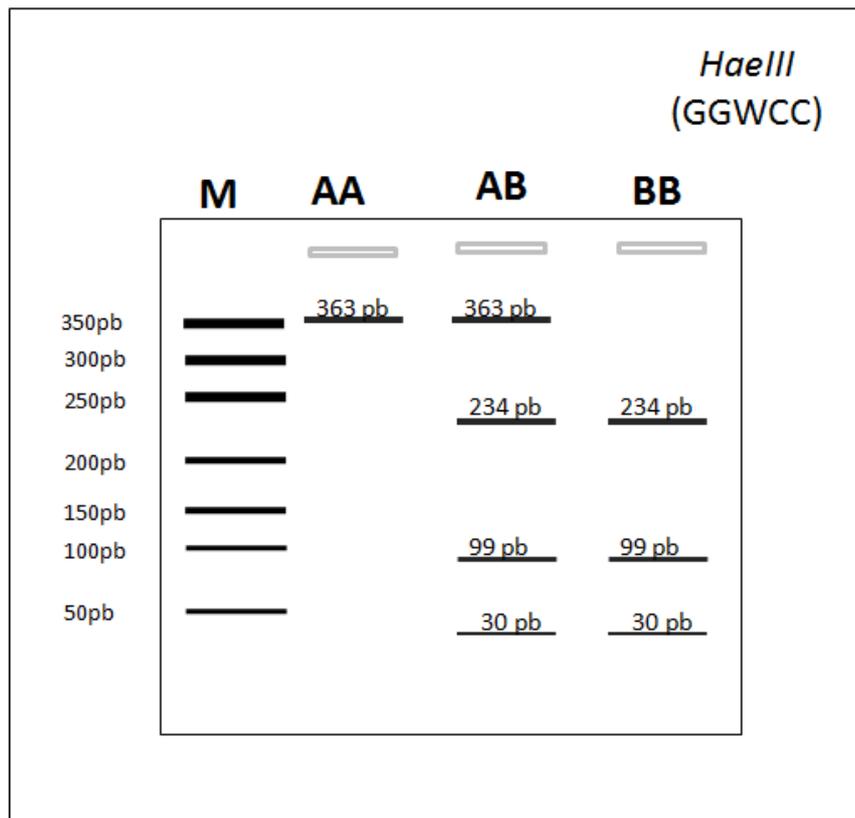


Figura 6. Figura esquemática mostrando o padrão de bandas dos alelos A e B, obtidos após digestão com a enzimas *HaeIII*, para o gene *IGF-1*. M = marcador de peso molecular de 50 pb; AA = genótipo homocigoto para o alelo A que não apresenta região de corte; AB = genótipo heterocigoto no qual ocorre a clivagem do fragmento em duas regiões, originando três fragmentos e o alelo A permanece intacto; BB = genótipo homocigoto para o alelo B com duas regiões de corte.

O padrão de cortes da enzima no gel pode ser observado na figura 7. Destacando que a banda menor (30 pb) não aparece nitidamente nas amostras referentes aos animais homocigotos com o corte da enzima (genótipo BB). No trabalho de Liu et al. (2010) os genótipos foram identificados em gel de agarose, o que resultou em um padrão diferente do encontrado neste trabalho, ou seja, os referidos autores não identificaram a presença da banda de 30 pb, de forma que os fragmentos encontrados pelos autores apresentaram os tamanhos de 264 e 99 pb.

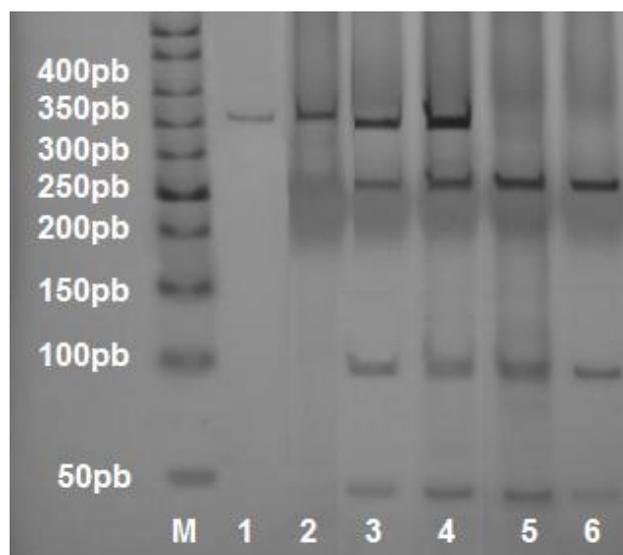


Figura 7. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata dos produtos de digestão pela enzima *HaeIII* do gene *IGF-1*. Canaleta 1 = produto da PCR; 2 = animal homocigoto (AA), 3 e 4 = animais heterocigotos (AB), 5 e 6 = animais homocigotos (BB); M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base.

Do total de 168 animais avaliados, 5 foram identificados como AA, 20 AB e 143 BB, com as frequências alélicas e genóticas no rebanho em estudo apresentadas na Tabela 3. O teste χ^2 mostrou que a distribuição dos genótipos não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada ($\chi^2 = 11,89$ e $P < 0,05$).

Tabela 3. Frequências alélicas e genóticas do SNP identificado no gene *IGF-1* por *HaeIII* PCR-RFLP.

| Genótipo | N | Frequência genotípica | Frequência Alélica | |
|----------|-----|-----------------------|--------------------|---------|
| | | | Alelo A | Alelo B |
| AA | 5 | 0,03 | 0,09 | 0,91 |
| AB | 20 | 0,12 | | |
| BB | 143 | 0,85 | | |

No trabalho de Liu et al. (2010) em que este mesmo polimorfismo foi identificado em duas raças de cabras chinesas, Xinjiang e Nanjiang cashmere, as frequências alélicas apresentaram-se distribuídas de forma diferente, com 0,4 para o alelo A e 0,6 para o B (raça Xinjiang) e 0,6 para o alelo A e 0,4 para o B (raça Nanjiang cashmere). No entanto, foi proposta associação com outras características, relacionadas à produção de cashmere, mas que não foram significativas ($P > 0,05$).

Szewczuk et al. (2011) a partir da constatação de vários casos descritos, em que a frequência de um alelo é nula ou quase nula para diferentes polimorfismos referentes a algumas regiões do gene *IGF-1*, concluem que uma possível justificativa para esses resultados é a de que ocorre uma forte limitação pela baixa frequência de um alelo raro, cujo efeito do locus é mascarado por outro com efeitos positivos ou negativos mais fortes. E assim a

mutação é considerada como marcador somente quando ligado a polimorfismos que se encontram perto ou na mesma região regulatória do gene.

4.1.3 Sequenciamento

Por intermédio do sequenciamento de fragmentos amplificados (363pb) das amostras referentes à cada genótipo, foi possível confirmar que se tratava de um fragmento do gene *IGF-1* de caprino.

O alinhamento das sequências caprina e bovina mostrou um grau de identidade de 99%, mostrando uma alta similaridade entre sequências das diferentes espécies (Figura 8).

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 660 bits(357) | 0.0 | 361/363(99%) | 0/363(0%) | Plus/Plus |
| Capra 1 | CACAGCGTATTATCCCACCTCTAAAACCTAGGCCCTCTCTCTGATTTGAACAGACAAGCCAC | 60 | | |
| Bos 1 | CACAGCGTATTATCCCACCTCTAAAACCTAGGCCCTCTCTCTGATTGGAAACAGACAAGCCAC | 60 | | |
| Capra 61 | GGGGTACGGCTCGAGCAGTCCGAGAGCGCCCCAGACAGGAATCGTGGATGAGTGCTGCTT | 120 | | |
| Bos 61 | GGGGTACGGCTCGAGCAGTCCGAGAGCGCCCCAGACAGGAATCGTGGATGAGTGCTGCTT | 120 | | |
| Capra 121 | CCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTGCGCCTCTCAAGCCACCAAGTC | 180 | | |
| Bos 121 | CCGGAGCTGTGATCTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTGCGCCTCTCAAGCCACCAAGTC | 180 | | |
| Capra 181 | AGCCCGCTCAGTCCGTGCCACGCGCCACACCGACATGCCAAGGCTCAGAAAGTAAGCCC | 240 | | |
| Bos 181 | AGCCCGCTCAGTCCGTGCCACGCGCCACACCGACATGCCAAGGCTCAGAAAGTAAGCCC | 240 | | |
| Capra 241 | ACCAGGGCCGGCGGTGAGGGTGGCCATCTTCGCGAGATCTGAGTTATGCGGCTGAAGCA | 300 | | |
| Bos 241 | ACCAGGGCCGGCGGTGAGGGTGGCCATCTTCGCGAGATCGGAGTTATGCGGCTGAAGCA | 300 | | |
| Capra 301 | ACTTAGTAGCAGCAGCATCCGAATAGTAATTAATACCCTCATAGACTTCTGGCTCATAGT | 360 | | |
| Bos 301 | ACTTAGTAGCAGCAGCATCCGAATAGTAATTAATACCCTCATAGACTTCTGGCTCATAGT | 360 | | |
| Capra 361 | GTC 363 | | | |
| Bos 361 | GTC 363 | | | |

Figura 8. Resultado do alinhamento entre as sequências de bovino (Numero de Acesso: emb|HG797647.1) (*Bos taurus*) e caprino (*Capra hircus*). Na imagem pode ser observada a sequência do fragmento composto pelo íntron 4 caprino e o sítio de corte da enzima (em caixa preta).

A comparação das sequências geradas pelas diferentes amostras possibilitou observar a existência de uma transversão (C/G), caracterizando um polimorfismo do tipo SNP dentro do íntron 4 do gene *IGF-1* na posição que corresponde ao nucleotídeo 265 da sequência de caprino. A figura 9 mostra o alinhamento da sequência disponível no *Genbank* com as das amostras, com o sítio de corte e uma das bases com a variação mostrada pelo não pareamento, enquanto que o outro sítio não está mostrado devido ao pareamento de 99% entre elas. O polimorfismo correspondente ao heterozigoto, resultando dessa transversão é mostrado na figura 10, representado pelos dois picos correspondentes as bases C e G em alturas próximas.

```

3321 ACCAGGGGCGGC GGTGAGGGTCGGCSATCTTCGCGAGATCTGAGTTATGCGGCTGAAGCA 120
3501 ACCAGGGGCGGC GGTGAGGGTCGGCCATCTTCGCGAGATCTGAGTTATGCGGCTGAAGCA 120
genbank ACCAGGGGCGGC GGTGAGGGTCGGCCATCTTCGCGAGATCTGAGTTATGCGGCTGAAGCA 120
3685 ACCAGGGGCGGC GGTGAGGGTCGGSCATCTTCGCGAGATCTGAGTTATGCGGCTGAAGCA 120
*****

```

Figura 9. Resultado do alinhamento entre as seqüências de diferentes amostras e a seqüência do Genbank (D 26119). A transversoão G/C é mostrada pela letra S em um dos sítios de corte, onde não houve pareamento.

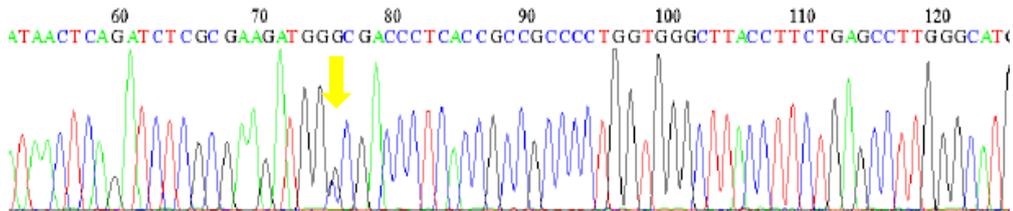


Figura 10. Eletroferograma mostrando resultado de sequenciamento pelo método de Sanger et al. (1977) do fragmento amplificado pelo par de primers correspondente ao íntron 4, destacando a transversoão G/C em um dos sítios de corte, indicada pela seta amarela. Cada base é representada por uma cor: A= Verde, G= Preto, C= Azul, T= Vermelho.

4.1.4 Análise estatística

Os resultados da associação do polimorfismo identificado no gene *IGF-1* (genótipos AA, AB e BB) com os valores genéticos preditos para cada uma das características produtivas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Resumo da ANOVA para as características avaliadas em função dos genótipos do gene *IGF-1*.

| Efeitos dos genótipos AA, AB e BB | | | |
|------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Característica | QM genótipo | QM residual | p-valor |
| Produção total de leite (kg) | 78,9868 | 1478,3662 | 0,95 |
| Extrato seco total (kg) | 3,4381 | 13,2771 | 0,77 |
| Gordura (kg) | 0,1390 | 1,0495 | 0,87 |
| Lactose (kg) | 0,7938 | 2,3304 | 0,71 |
| Proteína (kg) | 0,3743 | 0,8876 | 0,65 |
| Extrato seco total (%) | 0,0174 | 0,0983 | 0,84 |
| Gordura (%) | 0,0062 | 0,0263 | 0,79 |
| Lactose (%) | 0,0006 | 0,0101 | 0,94 |
| Proteína (%) | 0,0144 | 0,0175 | 0,44 |
| Dlact | 112,1179 | 80,0885 | 0,25 |
| CCS | 0,0021 | 0,0014 | 0,22 |

Dlact = duração da lactação, CCS = contagem de células somáticas

O polimorfismo identificado no gene *IGF-1* não apresentou associação significativa com as características estudadas (tabela 4), apesar da sua importância em diferentes processos, em relação a produção de leite e seus constituintes para as duas raças em que o polimorfismo foi analisado. Esse resultado pode ser específico para as características avaliadas, podendo haver relação do polimorfismo em questão com outras que não foram avaliadas, como pode ter ocorrido também pela menor frequência apresentada por um dos alelos, nesse caso o alelo A (0,11), o que dificulta a verificação de seu efeito. Ainda assim, é recomendado a verificação dos efeitos do polimorfismo e sua validade em outras raças, uma vez que pode haver diferenças entre raças e rebanhos.

Duas mutações identificadas no íntron 4 do gene *IGF-1* (g.1617 G>A e g.5752 G>C - D26119.2), sendo a segunda a mesma avaliada neste trabalho (posição 5752 no *GenBank* D26119), foram associadas com produção de leite e tamanho do corpo em 708 indivíduos de duas raças de cabras leiteiras chinesas (Guanzhong e Xinong Saanen). Para a Xinong Saanen, o genótipo heterozigoto apresentou maior tamanho corpóreo ($P < 0,05$) enquanto que o genótipo CC (nomeado BB neste trabalho, como no de Liu et al., 2010), maior produção de leite durante as duas lactações analisadas ($P < 0,05$). No entanto, as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo nesta raça foram menores em relação as demais, 0,08 (CC), 0,43 (CG) e 0,49 (GG), e 0,30 e 0,70 dos alelos C e G, respectivamente (Deng et al., 2010).

Como justificado por esse mesmo autor, o SNP identificado não pode ser uma mutação causal, uma vez que está localizado em uma das regiões de íntrons, sugerindo que poderia estar ligado a uma outra mutação na região de codificação ou regiões reguladoras de um gene onde se encontra uma mutação para características de produção.

Os íntrons têm sido demonstrados afetarem a eficiência da transcrição de numerosos genes de uma variedade de organismos, sendo apontados exemplos de sua participação e importância de sua remoção pelo spliceossomo influenciando etapas do metabolismo do

RNAm, tais como a iniciação da transcrição do gene, edição e poliadenilação do pré-RNAm, exportação nuclear e a tradução. Seu papel no aumento da expressão dos genes em eucariotos também é discutido, apesar de não ser necessário obrigatoriamente para o mesmo (Bergman, 2001).

4.2 Gene *NFI-C2*

4.2.1 Obtenção dos fragmentos por PCR

Utilizando os *primers* divulgados por Wang et al. (2011) e seu protocolo, o fragmento de PCR correspondente ao gene *NFI-C2* foi amplificado de maneira satisfatória a partir do DNA genômico, resultando em um fragmento de 233 pb (Figura 11).

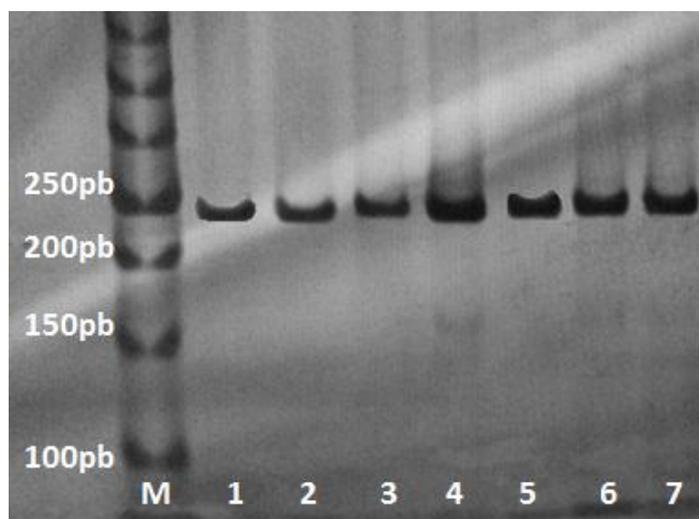


Figura 11. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata. M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base. Canaletas de 1 a 7 = fragmentos amplificados de aproximadamente 233 pb correspondentes ao éxon 5 do *NFI-C2*.

O gene *NFI-C2* em caprinos localiza-se no cromossomo 7, composto por 10 éxons. A região avaliada refere-se ao éxon 5 e parcial região codificante (CDS), pois nesta região foi detectado um SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) de interesse (*GenBank* GQ169554), o SNP 44654G>A (*GenBank* g. NC_007305), correspondendo a posição 51, identificado por Wang et al. (2011).

Como os outros locais de corte não são polimórficos e a única região polimórfica está dentro deste fragmento de 233 pb, ou seja, provavelmente não houve variação no padrão de corte nessas outras regiões, neste caso não contém informação adicional para analisar os resultados, Wang et al. (2011) reduziu o fragmento de tamanho total de 485 pb para o comprimento de 233 pb (1-233 pb) para a avaliação exclusiva do polimorfismo citado.

4.2.2 PCR-RFLP

Para os fragmentos de PCR amplificados houve corte pela enzima *Bst*NI (sítio de corte CC↓WGG), detectando um polimorfismo correspondendo a transição G>A na posição 51 na sequência de referência depositada no *GenBank* GQ169554, fazendo com que ocorra a

substituição do aminoácido 17 no fator de transcrição, onde o aminoácido glicina é substituído pela serina.

O esquema do padrão de corte (Figura 12) mostra os dois sítios de restrição gerando três fragmentos diferentes, de 179, 49 e 5 pb (alelo A) enquanto que o fragmento sem a clivagem, de 233 pb, corresponde ao alelo G, nomeados como no trabalho de referência (WANG et al., 2011).

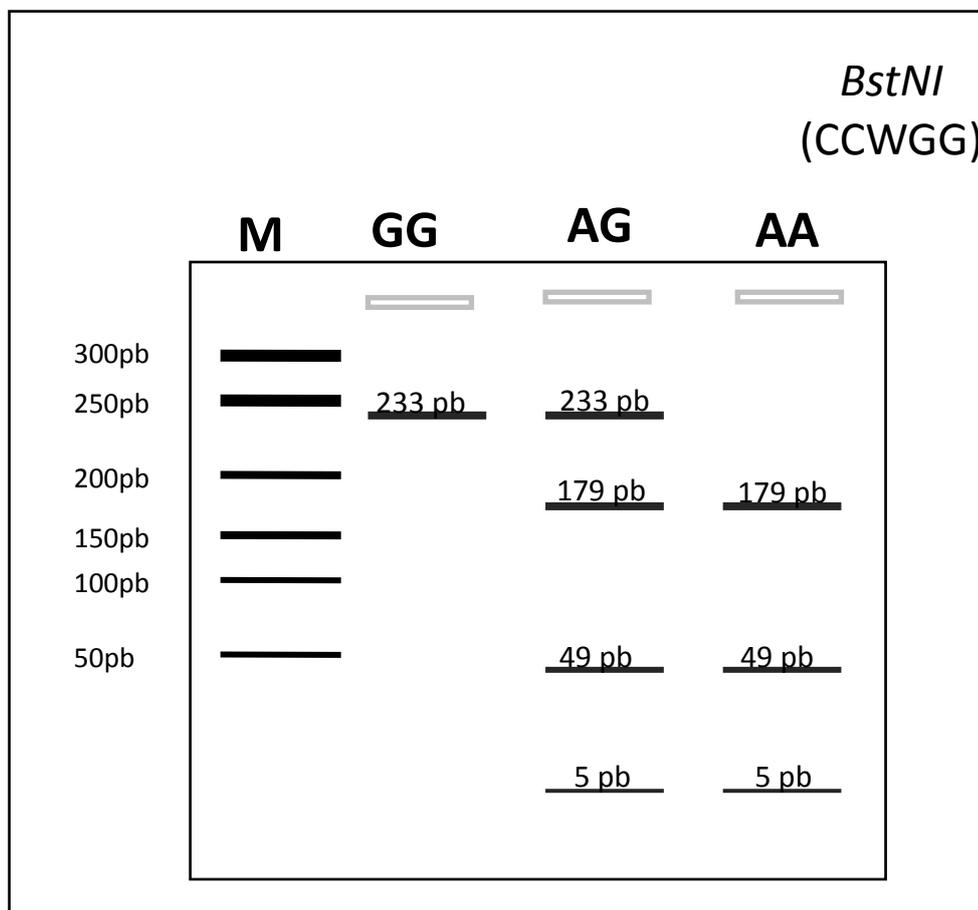


Figura 12. Esquema do padrão de bandas dos alelos A e G, obtidos após digestão com a enzimas *BstNI*, para o gene *NFI-C2*. M = marcador de peso molecular de 50 pb; (GG) = genótipo homozigoto para o alelo G que não apresenta região de corte; (AG) = genótipo heterozigoto no qual ocorre a clivagem do alelo A em duas regiões, originando três fragmentos e o alelo G permanece intacto; (AA) = genótipo homozigoto para o alelo A com os dois cortes.

Na figura 13 pode ser observado o padrão de corte da enzima no gel. Destacando que as bandas menores (49 e 5 pb) não aparecem.

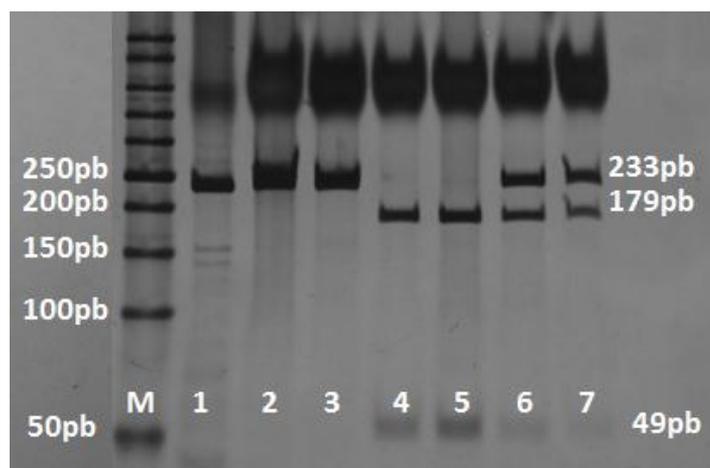


Figura 13. Gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata dos produtos de digestão pela enzima *Bst*NI do gene *NFI-C2*. Canaleta 1 = produto da PCR; 2 e 3 = animais homozigotos (GG), 4 e 5 = animais homozigotos (AA), 6 e 7 = animais heterozigotos (AG); M = Marcador de peso molecular (50 pb, Ludwig Biotecnologia); pb = pares de base.

Do total de 197 animais avaliados, 46 animais foram identificados como AA, 77 AG e 74 GG, com as frequências alélicas e genotípicas na Tabela 5. O teste χ^2 mostrou que a distribuição dos genótipos não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada ($\chi^2 = 8,04$; $P < 0,05$).

Comparando as frequências alélicas com as obtidas no trabalho de Wang et al. (2011), em duas das três raças foram bem próximas, 0,45 (A) e 0,55 (B) para a Xinong Saanen e 0,50 (A) e 0,49 (B) para a Guanzhong, confirmando também que a frequência do alelo mutante foi semelhante ao do tipo selvagem em cabras leiteiras, o que implica que o gene *NFI-C2* é menos conservado para o locus *EcoRII*. Enquanto que a outra raça (Xinjiang cashmere branca) foi a que mais diferiu, sendo 0,17 para o alelo A e 0,82 para o alelo G.

Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas do SNP G/A identificado no gene *NFI-C2* por *Bst*NI PCR-RFLP.

| Genótipo | N | Frequência genotípica | Frequência Alélica | |
|----------|----|-----------------------|--------------------|---------|
| | | | Alelo A | Alelo G |
| AA | 46 | 0,23 | 0,43 | 0,57 |
| AG | 77 | 0,39 | | |
| GG | 74 | 0,38 | | |

4.2.3 Análise estatística

Os resultados da associação do polimorfismo identificado no gene *NFI-C2* (AA, AG e GG) com os valores genéticos preditos para cada uma das características produtivas estão apresentados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Resumo da ANOVA para as características avaliadas em função dos genótipos do gene *NFI-C2*.

| Efeitos dos genótipos AA, AG e GG | | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|----------------|
| Característica | QM genótipo | QM residual | p-valor |
| Produção total de leite (kg) | 544,6554 | 1645,2359 | 0,718 |
| Extrato seco total (kg) | 3,7329 | 14,5869 | 0,775 |
| Gordura (kg) | 0,3894 | 1,2067 | 0,7256 |
| Lactose (kg) | 0,8600 | 2,4649 | 0,706 |
| Proteína (kg) | 0,3155 | 0,9719 | 0,723 |
| Extrato seco total (%) | 0,1740 | 0,1129 | 0,217 |
| Gordura (%) | 0,0355 | 0,0308 | 0,318 |
| Lactose (%) | 0,0049 | 0,0111 | 0,641 |
| Proteína (%) | 0,1161 | 0,0185 | 0,002** |
| Dlact | 90,9624 | 89,5722 | 0,364 |
| CCS | 0,0039 | 0,0015 | 0,082 |

** Significativo a 1%.

O polimorfismo identificado no gene *NFI-C2* apresentou associação significativa com a porcentagem de proteína do leite ($P < 0,01$), entretanto não houve associação com as demais características. Houve, no entanto, uma tendência de associação ($P = 0,082$) para a contagem de células somáticas, como pode ser visto na tabela 6.

O genótipo AA apresentou a média dos valores genéticos maior que o genótipo GG, apesar de sua frequência ser a menor em comparação com os demais. Sendo assim, o genótipo AA está associado ao maior teor de proteína no leite do que o GG, enquanto que o genótipo heterozigoto não diferiu dos homozigotos (Tabela 7).

Tabela 7. Associação dos genótipos do gene *NFI-C2* com as médias da porcentagem de proteína no leite e o erro padrão.

| Genótipos | N | Médias \pm Erro Padrão * |
|-----------|----|----------------------------|
| AA | 46 | 0,0641 \pm 0,020 a |
| AG | 77 | 0,0240 \pm 0,015 a b |
| GG | 74 | -0,0244 \pm 0,016 b |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Médias e erro padrão dos valores genéticos.

No trabalho de Wang et al. (2011) este mesmo polimorfismo foi identificado em três raças de cabras chinesas, porém não foi encontrada associação significativa com a produção

de leite ($P > 0,05$). Resultado semelhante ao achado neste trabalho para a produção total de leite. A ausência de associação do polimorfismo com a produção de leite ao mesmo tempo em que foi verificada associação significativa com o teor de proteína pode indicar para uma ferramenta alternativa na seleção de um leite rico em proteína, sem prejudicar a seleção para a produção total de leite. Isto tem sido um desafio para a seleção tradicional, uma vez que as estimativas da correlação genética entre estas características são predominantemente negativas (Brito et al., 2011).

De acordo com Mukhopadhyay et al. (2001), algumas isoformas NF1 específicas podem estar relacionadas a ativação da transcrição de genes específicos da glândula mamária que codificam proteínas do leite, como o gene *WAP*, que codifica a proteína acídica do leite.

Outro gene em que a ligação do NF1-C2 no promotor mostrou expressão paralela aos níveis de expressão da proteína NF1-C2 quando aumentados e diminuídos, é o do gene *CEL*, que codifica a enzima carboxil éster lipase, uma proteína que facilita a absorção de gordura, interagindo com o elemento de ligação no seu promotor com uma maior afinidade do que as outras isoformas NF1 (MURTAGH et al., 2003).

De acordo com Wang et al. (2011), o *NF1C2* pode estar relacionado a ativação da transcrição de genes específicos da glândula mamária que codificam proteínas do leite, como os genes *WAP* e *CEL*. Logo, a ativação destes genes pode ser uma das causas da associação encontrada no presente trabalho entre o polimorfismo no gene *NF1C2* e a porcentagem de proteína no leite de cabras, sugerindo um maior efeito do fator NF1-C2 sobre estes genes (*WAP* e *CEL*), nos animais de genótipo AA.

5 CONCLUSÃO

O polimorfismo no íntron 4 identificado no gene *IGF-1* não apresenta associação significativa com as características produtivas avaliadas no rebanho estudado.

O polimorfismo identificado no gene *NFI-C2* localizado no éxon 5 apresenta associação significativa com a porcentagem de proteína do leite de cabras, com o genótipo AA associado ao maior teor de proteína no leite, podendo assim ser testado e validado como marcador genético com potencial para ser utilizado na seleção e melhoramento em rebanhos de caprinos leiteiros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMANN, H.; WENDLER, W.; WINNACKER, E. L. Transcriptional activation by CTF proteins is mediated by a bipartite low-proline domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 9, p. 3901–3905, 1994.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. et al.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p.3389-3402, 1997.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 130–138, 2001.

APT, D.; LIU, Y.; BERNARD, H. U. Cloning and functional analysis of spliced isoforms of human nuclear factor I-X: interference with transcriptional activation by NFI/CTF in a cell-type specific manner. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 19, p. 3825–3833, 1994.

BAUMRUCKER, C. R.; ERONDU, N. E. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 5, n. 1, p. 53–64, 2000.

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

BERGMAN, J. The functions of introns: From junk DNA to designed DNA. **Molecular Biology**, v. 53, n. 3, 2001.

BONAKDAR, E.; RAHMANI, H. R.; EDRISS, M. A.; SAYED TABATABAEI, B. E. IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. **Genetics and molecular research**, v. 9, n. 3, p. 1726–1734, 2010.

BRITO, L. F.; SILVA, F. G.; MELO, A. L. P.; CAETANO, G. C.; TORRES, R. A.; RODRIGUES, M. T.; MENEZES, G. R. O. Genetic and environmental factors that influence production and quality of milk of Alpine and Saanen goats. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3794-3802, 2011.

BRYONY, S. WISEMAN AND ZENA WERB. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 2002.

BUNN, R. C.; FOWLKES, J. L. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 14, n. 4, p. 176–181, 2003.

BURDON, T.; SANKARAN, L.; WALL, R. J.; SPENCER, M.; HENNIGHAUSEN, L. Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development: Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 11, p. 6909–6914, 1991.

CHAUDHRY, A Z.; LYONS, G. E.; GRONOSTAJSKI, R. M. Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 208, n. 3, p. 313–325, 1997.

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

CHIKHIRZHINA, G. I.; AL-SHEKHADAT, R. I.; CHIKHIRZHINA, E. V. Transcription factors of the NF1 family: Role in chromatin remodeling. **Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 342–356, 2008.

CHRISTOPOULOS, P. F.; MSAOUEL, P.; KOUTSILIERIS, M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.

COLES, C.; CONDIE, A; CHETTY, U.; STEEL, C. M.; EVANS, H. J.; PROSSER, J. P53 Mutations in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 52, p. 5291–5298, 1992.

D'ERCOLE, A J.; APPLEWHITE, G. T.; UNDERWOOD, L. E. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. **Developmental biology**, v. 75, n. 2, p. 315–328, 1980.

DARNELL JR., J. E. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. **Nature**, v. 297, p.365-371, 1982.

DAUGHADAY, W. H. Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. **Nature**, v. 235, p. 107, 1972.

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

DAVIS, M. E.; SIMMEN, R. C. M. Genetic Parameter Estimates for Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration and Performance Traits in Angus Beef Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 2, p. 317–324, 1997.

DEKKER, J.; OOSTERHOUT, J. A VAN; VLIET, P. C. VAN DER. Two regions within the DNA binding domain of nuclear factor I interact with DNA and stimulate adenovirus DNA replication independently. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 8, p. 4073–4080, 1996.

DENG, C.; MA, R.; YUE, X.; LAN, X.; CHEN, H.; LEI, C. Association of *IGF-1* gene polymorphisms with milk yield and bozy size in Chinese dairy goats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 266-270, 2010.

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

DUAN, C. Yhe insuline-like growth factor system and its biological actions in fish. **American Zoologic**, v. 37, p. 491–503, 1997.

FLINT, D. J.; TONNER, E.; ALLAN, G. J. Insulin-like growth factor binding proteins: IGF-dependent and -independent effects in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 5, n. 1, p. 65–73, 2000.

FORSYTH, I. A. The insulin-like growth factor and epidermal growth factor families in mammary cell growth in ruminants: action and interaction with hormones. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 6, p. 1085–1096, 1996. Elsevier.

FROESCH, E. R.; BUERGI, H.; RAMSEIER, E. B.; BALLY, P.; LABHART, A. Antibody-Suppressible and Nonsuppressible Insulin-Like Activities in Human Serum and Their Physiologic Significance. an Insulin Assay With Adipose Tissue of Increased Precision and Specificity. **The Journal of clinical investigation**, v. 42, n. 11, p. 1816–1834, 1963.

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

FRYSTYK, J. Free insulin-like growth factors - Measurements and relationships to growth hormone secretion and glucose homeostasis. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 14, n. 5, p. 337–375, 2004.

FURLONG, E. E. M.; KEON, N. K.; THORNTON, F. D.; REIN, T.; MARTIN, F. Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution: Involution-enhanced occupation of a twin NF1 binding element in the testosterone-repressed prostate message-2/clusterin promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29688–29697, 1996.

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

GRONOSTAJSKI, R. M. Roles of the NFI / CTF gene family in transcription and development. **Gene**, v. 249, p. 31–45, 2000.

GRÜNDER, A.; QIAN, F.; EBEL, T. T.; MINCHEVA, A.; LICHTER, P.; KRUSE, U.; SIPPEL, A. E. Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor Nuclear Factor One. **Gene**, v. 304, n. 1-2, p. 171–181, 2002.

HIR, H. L.; NOTT, A.; MOORE, M. J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. **Elsevier, trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 215-220, 2003.

HU, X.; GAO, Y.; FENG, C.; LIU, Q.; WANG, X.; DU, Z.; WANG, Q.; LI, N. Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. **Genetics**, v. 136, p. 371–386, 2009.

HWA, V.; OH, Y.; ROSENFELD, R. G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 6, p. 761-787, 1999.

HYNES, N. E.; WATSON, C. J. Mammary gland growth factors: Roles in normal development and in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, 2010.

II, E.; NACHWEIS, P.; LI, M.; CHEN, H. A novel EcoR II PCR-RFLP detecting genetic variation of goat NF1-C2 gene and its association with milk yield **Archiv Tierzucht (Brief Report)**. , v. 54, p. 224–226, 2011.

INOUE, T.; TAMURA, T. A.; FURUICHI, T.; MIKOSHIBA, K. Isolation of complementary DNAs encoding a cerebellum-enriched nuclear factor I family that activates transcription from the mouse myelin basic protein promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 19065–19070, 1990.

JOHANSSON, E. M.; KANNIUS-JANSON, M.; BJURSELL, G.; NILSSON, J. The p53 tumor suppressor gene is regulated in vivo by nuclear factor 1-C2 in the mouse mammary gland during pregnancy. **Oncogene**, v. 22, n. 38, p. 6061–6070, 2003.

JOHANSSON, E. M.; KANNIUS-JANSON, M.; GRITLI-LINDE, A.; BJURSELL, G.; NILSSON, J. Nuclear factor 1-C2 is regulated by prolactin and shows a distinct expression pattern in the mouse mammary epithelial cells during development. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 4, p. 992–1003, 2005.

JONES, K. A.; KADONAGA, J. T.; ROSENFELD, P. J.; KELLY, T. J.; TJIAN, R. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. **Cell**, v. 48, n. 1, p. 79–89, 1987.

JUUL, A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. **Growth Hormone & IGF research**, v. 13, p. 113-170, 2003.

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

KANNIUS-JANSON, M.; LIDBERG, U.; HULTÉN, K.; GRITLI-LINDE, A.; BJURSELL, G.; NILSSON, J. Studies of the regulation of the mouse carboxyl ester lipase gene in mammary gland. **Biochemistry**, v.336, p 577-585, 1998.

KANNIUS-JANSON, M.; JOHANSSON, E. M.; BJURSELL, G.; NILSSON, J. Nuclear factor 1-C2 contributes to the tissue-specific activation of a milk protein gene in the differentiating mammary gland. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17589–17596, 2002.

KIM, T. K.; ROEDER, R. G. Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4170–4174, 1994.

KIPLAGAT, S. K.; LIMO, M. K.; KOSGEY, I. S. Genetic Improvement of Livestock for Milk Production. **Milk Production Advanced Genetic Traits, Celular Mechanism, Animal Management and Health**, p. 77–96, 2012.

KRUSE, U.; SIPPEL, A. The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding Splice variants between vertebrates species. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 860-865, 1994.

- LATCHMAN, D., S. **Eukaryotic transcription factors**. Elsevier. 4^a edition, 2002.
- LATCHMAN, D., S. **Eukaryotic transcription factors**. Elsevier. 5^a edition, 2004.
- LEROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J. L.; BUTLER, A. The somatomedin hypothesis: 2001. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 1, p. 53–74, 2001.
- LEROITH, D.; ROBERTS, C. T. The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Letters**, v. 195, n. 2, p. 127–137, 2003.
- LIDMER, A-S.; KANNIUS, M.; LUNDBERG, L.; BJURSELL, G.; NILSSON, J. Molecular cloning and characterization of the mouse carboxil ester lipase gene and evidence for expression in the lactating mammary gland. **Genomics**, v. 29, p. 115-122, 1995.
- LIN, J.; YU, Q.; ZHANG, Q.; YANG, Q. Construction of mammary gland specific expression plasmid pIN and its expression in vitro and in vivo. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 27, p. 6946–6955, 2012.
- LIU, W. J.; GUANG-XIN, F.; YI, F.; KE-CHUAN, T.; XI-XIA, H.; XIN-KUI, Y.; MOU, W.; HUI, Y.; YONG-ZHENG, H.; JING-JING, X.; YA-PING, X.; SHI-GANG, Y.; HONG, C. The polymorphism of a mutation of IGF-1 gene on two goat breeds in China. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 4, p. 790-794, 2010.
- LODHI, M. A.; YE, G.; WEEDEN, N. F. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species an *Ampelopsis*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 1, p. 6-13, 1994.
- MERMOD, N.; O'NEILL, E. A; KELLY, T. J.; TJIAN, R. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. **Cell**, v. 58, n. 4, p. 741–753, 1989.
- MIKAWA, S.; YOSHIKAWA, G.; AOKI, H.; YAMANO, Y.; SAKAI, H.; KOMANO, T. Dynamic aspects in the expression of the goat insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene: diversity in transcription and post-transcription. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 87–92, 1995.
- MILLER, B. H.; GORE, A. C. Alterations in hypothalamic insulin-like growth factor-I and its associations with gonadotropin releasing hormone neurones during reproductive development and ageing. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, n. 8, p. 728–736, 2001.
- MISZTAL, I. **REMLF90 manual**, 2002. Disponível em <<http://nce.ads.uga.edu/~ignacy/numpub/blupf90/docs/remlf90.pdf>>.
- MOHAN, S.; KESAVAN, C. Role of insulin-like growth factor-1 in the regulation of skeletal growth. **Current Osteoporosis Reports**, v. 10, n. 2, p. 178–186, 2012.
- MONGET, P.; MARTIN, G. B. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 12 Suppl 1, p. 33–52, 1997.

MONTALDO, H. H.; MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 1–7, 1998.

MORIYAMA, S.; AYSON, F. G.; KAWAUCHI, H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n.8, p. 1553-1562, 2000.

MUKHOPADHYAY, S. S.; WYSZOMIERSKI, S. L.; GRONOSTAJSKI, R. M.; ROSEN, J. M. Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 20, p. 6859–6869, 2001.

MURTAGH, J.; MARTIN, F.; GRONOSTAJSKI, R. M. The nuclear factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 8, n. 2, p. 241–254, 2003.

NAGATA, K.; GUGGENHEIMER, R. A; ENOMOTO, T.; LICHY, J. H.; HURWITZ, J. Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 21, p. 6438–6442, 1982.

NAGATA, K.; GUGGENHEIMER, R. A; HURWITZ, J. Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 20, p. 6177–6181, 1983.

NILSSON, J.; BJURSELL, G.; KANNIUS-JANSON, M. Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 15, p. 5663-5674, 2006.

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

PHILPOTT, M. P.; SANDERS, D.; KEALEY, T. Cultured human hair follicles and growth factors. **The Journal of investigative dermatology**, v. 104, n. 5 Suppl, p. 44S–45S, 1995.

PLATH-GABLER, A.; GABLER, C.; SINOWATZ, F.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 39–48, 2001.

POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505–518, 2004.

QIAN, F.; KRUSE, U.; LICHTER, P.; SIPPEL, A. Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C and X) for the human transcription factor nuclear factor I by fish. **Genomics**, v. 28, p. 66-73, 1995.

REGO, R.S. **Polimorfismo no Gene que Codifica a β -lactoglobulina e Associação com Características de Produção em Caprinos Leiteiros**. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

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

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2365–2369, 1976.

ROSEN, C. J. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications. **Clinical chemistry**, v. 45, n. 8 Pt 2, p. 1384–1390, 1999.

ROULET, E.; ARMENTERO, M. T.; KREY, G.; CORTHÉSY, B.; DREYER, C.; MERMOD, N.; WAHLI, W. Regulation of the DNA-binding and transcriptional activities of *Xenopus laevis* NFI-X by a novel C-terminal domain. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 10, p. 5552–5562, 1995.

RUPP, R. A.; KRUSE, U.; MULTHAUP, G.; GOBEL, U.; BEYREUTHER, K.; SIPPEL, A. E. Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 9, p. 2607–2616, 1990.

SACHDEV, D.; YEE, D. The IGF system and breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 8, n. 3, p. 197–209, 2001.

SALMON, W. D. J.; DAUGHADAY, W. H. Sulfation factor, a serum component mediating the action of growth hormone in stimulating incorporation of sulfate into cartilage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 733 (abstract), 1956.

SALMON, W. D. JR.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, v. 149, p. 825-836, 1957.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTORO, C.; MERMOD, N.; ANDREWS, P. C.; TJIAN, R. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 218–224, 1988.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

SCHWERIN, M.; BROCKMANN, G.; VANSELOW, J.; SEYFERT, H. M. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. **Archiv Tierzucht Dummerstorf**, v. 38, p. 21-31, 1995.

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

SERIWATANACHAI, D.; CHAROENPHANDHU, N.; SUTHIPHONGEHAI, T.; KRISHNAMRA, N.; Prolactin decreases the expression ratio of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin in human fetal osteoblast cells. **Cell Biology International**, v. 32, p. 1126-1135, 2008.

SHARMA, A.; DUTT, G.; SIVALINGAM, J.; SINGH, M. K.; PATHODIYA, O. P.; KHADDA, B. S.; DIXIT, S. P. Novel SNPs in IGF1, GHR and IGFBP-3 genes reveal significant association with growth traits in Indian goat breeds. **Small Ruminant Research**, v. 115, n. 1-3, p. 7–14, 2013. Elsevier B.V.

SOARES, M. A. M.; RODRIGUES, M. T.; MOGNOL, G. P.; RIBEIRO, L. F. C.; SILVA, J. L. C.; BRANCALHÃO, R. M. C. Polymorphism of α_{s1} -casein gene in a dairy goat herd in the southeastern region of Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 1026-1032, 2009.

STEELE-PERKINS, G.; BUTZ, K. G.; LYONS, G. E.; ZEICHNER-DAVID, M.; KIM, H. J.; CHO, M.; GRONOSTAJSKI, R. M. Essential Role for NFI-C / CTF Transcription-Replication Factor in Tooth Root Development. **Society**, v. 23, n. 3, p. 1075–1084, 2003.

SUPAKORN, C.; PRALOMKARN, W. Genetic Polymorphisms of Growth Hormone (GH), Insulin - like Growth Factor 1 (IGF-1) and Diacylglycerol Acyltransferase 2 (DGAT-2) Genes and Their Effect on Birth Weight and Weaning Weight in Goats. **The Philippine Agricultural Scientist**, v. 96, n. 1, p. 18–19, 2013.

SZEWCZUK, M.; ZYCH, S.; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E. Association between IGF1 / TasI polymorphism and milk traits of Polish Holstein Friesian cows Zusammenfassung. **Archiv Tierzucht**, v. 54, p. 10–17, 2011.

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

WENZELIDES, S.; ALTMANN, H.; WENDLER, W.; WINNACKER, E. L. CTF5--a new transcriptional activator of the NFI/CTF family. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 12, p. 2416–2421, 1996.

WISEMAN, B. S.; WERB, Z. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 2002.

XIANG-DONG, Z. I.; XIAO-KUN, M. U.; JIAN-YUAN, L. U.; LI, M. A.; YONG, W. Polymorphisms of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I) genes in prolific Lezhi Black Goat: possible association with litter size. **Journal of Southwest University for Nationalities**, v. 40, p. 1–6, 2014.

YAZDANPANA, A.; ROSHANFEKR, H.; MIRZADEH, K.; MAMOUEI, M.; KHEDERZADEH, S. Polymorphism of Insulin-Like Growth Factor 1 Gene in Najdi Cattle Populations. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 300–306, 2013.

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

ZI, X. D.; MU, X. K.; WANG, Y. Variation in sequences and mRNA expression levels of growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I) and II (IGF-II) genes between prolific Lezhi black goat and non-prolific Tibetan goat (*Capra hircus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 187, p. 1–5, 2013.