



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*)  
da raça Crioula Lageana.**

**Vanessa Laus da Rosa**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Agronomia, no  
Centro de Ciências Agrárias, da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para obtenção do título de  
Engenheira Agrônoma.  
Orientador: Prof. Dr. André Ferreira Lima

Florianópolis - SC  
Novembro/2016

Vanessa Laus da Rosa

Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da  
raça Crioula Lageana.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Agronomia, no  
Centro de Ciências Agrárias, da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para obtenção do título de  
Engenheira Agrônoma.  
Orientador: Prof. Dr. André Ferreira Lima

Florianópolis - SC  
Novembro/2016

# **Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da raça Crioula Lageana**

Vanessa Laus da Rosa <sup>(1)</sup>\*

(demais autores a serem incluídos futuramente para envio do manuscrito)

<sup>(1)</sup> Acadêmica do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.\* Autor correspondente - Email:vanessalausr@gmail.com

## **Resumo:**

O gene do IGF-I (Fator I de Crescimento Semelhante à Insulina) é um bom candidato a marcador molecular de bovinos devido a sua relação com características de interesse econômico como funções de crescimento e precocidade sexual, podendo assim ser usado como ferramenta na seleção assistida em programas de melhoramento genético para a espécie. O objetivo desse trabalho foi identificar a possível existência de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos da Raça Crioula Lageana através da técnica PCR-RFLP com a enzima de restrição *Hinf*-I (Invitrogen). Foi realizada a extração do DNA de amostras de pelos da vassoura da cauda de 66 animais da raça Crioula Lageana de fazendas de criação localizadas na região do município de Lages em Santa Catarina. As análises foram conduzidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC. A extração de DNA foi realizada com uma adaptação da metodologia de PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico). A efetividade do procedimento foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e as amostras consideradas satisfatórias foram amplificadas por meio de PCR, posteriormente os fragmentos obtidos foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima anteriormente mencionada. Foram observados polimorfismos genéticos que originaram três padrões distintos de migração: VV, VS e SS, com frequências observadas iguais a 0,238, 0,587 e 0,175, respectivamente. Testes de aderência indicaram que as frequências para o alelo estudado não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que foi possível identificar polimorfismos para a região estudada do gene do IGF-I em animais da raça Crioula Lageana.

**Palavras-chave:** Precocidade, Seleção Assistida, PCR-RFLP, Marcadores Moleculares

## **Abstract**

The IGF-I gene (Insulin-like Growth Factor I) is a good candidate for bovine molecular marker due to its relation with characteristics of economic interest such as growth and sexual precocity functions, and can therefore be used as a tool in assisted selection in breeding programs for species. The aim of this work was to identify the possible existence of polymorphisms in the IGF-I gene in Crioula Lageana breed cattle using the PCR-RFLP technique with the restriction enzyme Hinf-I (Invitrogen). The DNA extraction of samples of broom hairs from the tail of 66 Crioula Lageana animals from farms located in the region of Lages' city in Santa Catarina was performed. The analyzes were conducted at the Animal Genetics Teaching and Research Laboratory (LEPGA), at the Agricultural Sciences Center of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis / SC. DNA extraction was performed with an adaptation of the PCI (phenol-chloroform-isoamyl alcohol) methodology. The effectiveness of the procedure was verified by agarose gel electrophoresis and the samples considered satisfactory were amplified by PCR technique, later the obtained fragments were submitted to PCR-RFLP technique using the aforementioned enzyme. Genetic polymorphisms were observed by three different migration patterns of DNA fragments after digestion: VV, VS and SS with observed frequencies equal to 0.238, 0.587 and 0.175, respectively. Chi square tests were performed indicating that the allelic frequencies are not under Hardy-Weinberg's equilibrium. The results obtained allows to conclude that was possible to identify genetic polymorphisms for the studied region on IGF-I hormone gene on animals from "Crioulo Lageano" breed.

**Keywords:** precocity, assisted selection PCR-RFLP, Molecular markers

## 1. Introdução

O rebanho bovino no Brasil conta com aproximadamente 215 milhões de cabeças, deste total, a bovinocultura de corte representa uma grande parcela de índices favoráveis na produção, consumo interno e volume exportado de carne (IBGE, 2016; ABIEC, 2016a). Segundo o Ministério da Agricultura (2016b), a expectativa é que até 2020 a produção brasileira de carne bovina supra até 44,5% do mercado mundial.

Os segmentos da bovinocultura de corte e de leite estão presentes em todos os estados brasileiros evidenciando tanto a importância econômica quanto a importância social da atividade para o país (MAPA, 2016a). Para que o país mantenha-se em destaque no mercado mundial a bovinocultura precisa estar em constante evolução, melhorando continuamente seus índices zootécnicos. Dia-a-dia ferramentas são criadas e aperfeiçoadas buscando aumentar a produção e eficiência da atividade, entre elas o desenvolvimento tecnológico nas áreas de genética, reprodução, saúde, nutrição e manejo animal (INDEPENDÊNCIA, 2010).

No Brasil já foram introduzidas e experimentadas diversas raças bovinas desde a época do descobrimento, raças trazidas pelos descobridores e raças importadas, inicialmente as taurinas (*Bos taurus*) e posteriormente as zebuínas indianas (*Bos indicus*) (PEIXOTO, 2010). O rebanho brasileiro atualmente é formado 80% por raças zebuínas, devido principalmente à rusticidade e adaptação da espécie ao ambiente de clima tropical predominante no país. Na região sul do Brasil as características edafoclimáticas caracterizadas por temperaturas mais baixas e pastagens de mais alto valor nutricional permitem a adaptação de raças taurinas (*Bos taurus*) como as continentais, que possuem grande potencial de ganho de peso, alto rendimento de carcaça e são produtoras de carnes mais nobres que as zebuínas (ABIEC, 2016b, EUCLIDES FILHO e EUCLIDES, 2010).

O Crioulo Lageano é uma raça de *Bos taurus* naturalizada no planalto Sul-brasileiro, especificamente na região do município de Lages, no estado de Santa Catarina. Essa raça se desenvolveu e foi naturalmente selecionada durante 300 anos sob condições adversas de clima e pastagem, tornando-se plenamente adaptada às condições ecológicas da região definidas por invernos rigorosos com incidência de geadas e pastagens provenientes de solos ácidos e pedregosos. (RANGEL *et al.*, 2004; MARIANTE, 1993).

Os animais da raça Crioula Lageana são caracterizados por seus longos chifres (existindo também a variedade mocha), porte avantajado e alta prolificidade. Nas

condições do planalto catarinense apresentam excelente produção leiteira, forte aptidão materna, facilidade no parto, resistência a determinadas enfermidades e a endo e ectoparasitas, adaptação às condições desfavoráveis de pastagem nas épocas críticas do ano além de grande longevidade. Mesmo sem ter sofrido longos períodos de seleção artificial a velocidade de crescimento do Crioulo Lageano se compara a da raça Charolês e é superior a do Nelore em condições de pastagem do Planalto Serrano Catarinense (PAYNE, 1970; RIBEIRO, 1993). Além disso, Veiga (2011) constatou que a raça Crioula Lageana possui características qualitativas de carne superiores as da raça Nelore, apresentando área de olho de lombo, escore de marmoreio e espessura de gordura subcutânea superiores.

O melhoramento animal é uma ciência e uma tecnologia de grande importância para aumentar a produtividade e eficiência das atividades pecuárias. Nas últimas décadas essa ferramenta tem sido favorecida pelo aprimoramento de tecnologias como o uso de marcadores moleculares que consistem em alterações na sequência de nucleotídeos do DNA entre indivíduos da mesma população, denominadas de polimorfismos (SALMAN et al. 2009). Esses polimorfismos podem estar associados a características de interesse e seu uso permite identificar o potencial genético de um animal antes da expressão de seu fenótipo (REGITANO E COUTINHO, 2001). A seleção assistida por marcadores traz grandes expectativas ao melhoramento animal uma vez que aumenta a precisão de predição dos métodos de seleção tradicionais reduzindo o intervalo entre gerações e consequentemente aumentando o ganho genético, permitindo a obtenção de resultados preferíveis, com melhor qualidade e menor variação dos produtos produzidos (GIL, 2012).

Entre os marcadores de DNA, os chamados genes candidatos têm sido utilizados com este propósito, em função da sua ligação a compostos como hormônios de conhecida função fisiológica. O IGF-I (Fator I de Crescimento Semelhante à Insulina) também conhecido como somatomedina C é um forte candidato a marcador molecular devido a sua relação com funções de crescimento e precocidade sexual. Esse gene, localizado no cromossomo 5 bovino é responsável pela síntese de um peptídeo composto por 70 aminoácidos pertencente à superfamília da insulina, que possui relação estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (JONES e CLEMMONS, 1995; BISHOP *et al.*, 1994; ANDOH, 2005). O IGF-I também age como mediador metabólico relacionado com o início da puberdade em novilhas (RADCLIFF *et al.*, 2004; BELTRAN, 2007).

A importação de raças exóticas e o cruzamento indiscriminado das mesmas acarretaram a redução do plantel de muitas raças crioulas como a Crioula Lageana que atualmente possui cerca de 3000 animais contra mais de 200 000 que já existiram na conquista do Planalto Serrano pelos bandeirantes no século XVIII e que perduraram até os primeiros anos do século XX (MARTINS, *et al.*, 2009). As características próprias dos produtos do Crioulo Lageano os tornam fortes candidatos a conseguir a certificação de origem valorizando ainda mais os produtos regionais. Projetos que caracterizem e melhorem a raça são importantes não só para conservação da mesma, mas também da natureza e da cultura de toda região onde ela se desenvolveu ameaçado por outras atividades que não condizem com a realidade e aptidões regionais (VEIGA, 2011).

Diante do apresentado o presente trabalho tem como objetivo geral identificar possíveis polimorfismos no gene IGF-I em animais da raça Crioula Lageana buscando viabilizar uma ferramenta aplicável, em termos populacionais, com vistas ao melhoramento genético da raça e da espécie em geral.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Coleta e preparação das amostras**

Neste trabalho, foram consideradas amostras de DNA obtidas dos folículos pilosos da cauda de 63 animais da raça Crioula Lageana pertencentes às propriedades localizadas na região do município de Lages/SC, nos anos de 2015 e 2016.

As amostras foram coletadas da vassoura da cauda dos animais adequadamente contidos no tronco. O excesso dos pelos de cada amostra foi cortado com tesoura e fios de cerca de 5 cm contendo os folículos pilosos foram acondicionados e devidamente identificados em sacos plásticos. Na preparação das amostras para posterior extração do DNA, foram cortados cerca de 40 folículos por animal, colocados em microtubos estéreis de 1,5 mL, identificados e armazenados em freezer -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

### **2.2. Análises laboratoriais**

Todas as análises laboratoriais do presente trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/SC.

### 2.3. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, adaptado de Lima (2003). Dentro de cada microtubo de 1,5 mL contendo os folículos foram adicionados 500 µL de solução TE-TWEEN [Tris 50 mM, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético), 1 mM, 0,5% Tween 20] e as amostras permaneceram incubadas em banho-maria a 65°C por 1 hora e 30 minutos com agitação manual periódica. Posteriormente foram adicionados 7 µL de proteinase K (20 µg/µL) incubando-se as amostras a 55°C por 6 horas realizando agitação por inversão a cada 30 minutos, depois as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por uma noite. Após esta etapa, foi adicionado 1 volume de solução PCI (fenol-clorifórmio-álcool isoamílico – 25:24:1) para 1 volume de amostra e os tubos passaram por vigorosa agitação por 10 segundos em agitador automático tipo vórtex. Em seguida foi feita centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 23°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo devidamente identificado, resultando em um volume final de aproximadamente 300 µL.

A precipitação do DNA foi feita com acetato de sódio 0,3 M na quantia de 1/10 do volume da amostra (cerca de 30 µL) e etanol absoluto gelado (1000 µL), sendo feita a mistura por inversão seguida de repouso durante 1 hora e 30 minutos a -20°C para então realizar uma centrifugação a 12.000 rpm por 25 minutos a 4°C. Finalmente foi descartado o sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida resuspendido em 100 µL de água ultra pura e armazenado a 4°C até o uso nas análises subsequentes. Para verificar a eficiência da metodologia da extração as amostras foram misturadas a 3 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,5%) com brometo de etídio, em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 50V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) e as imagens dos géis foram registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

### 2.4. Reação de Amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Foi desenhado um par de *primers* para amplificar uma região de aproximadamente 800 pares de bases correspondente à parte do Intron 4, Exon 5 e parte do Intron 5 do gene



do IGF-I bovino. Para desenhar os *primers* utilizaram-se informações de sequências disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (HG797641.1; HG797642.1; HG797643.1; HG797644.1; HG797645.1; HG797646.1; HG797648.1; HG797647.1). As sequências de nucleotídeos desenhadas foram: IGF-I – Forward 5' - CCT CAC CTG AAT GCG AGC C - 3', IGF-I - Reverse 5' - ATG TAC TGT GCG CCT CTC AA - 3'.

As reações de PCR foram feitas com volume final de 25 µL/amostra o qual continha aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada *primer*, tampão PCR 1X, 100 µM de dNTPS, 0,5 U de EqsyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech).

A reação foi conduzida em termociclador Biometra®, os ciclos de amplificação seguiram a seguinte programação: 95°C por 1 minuto para desnaturação, 56,8°C por 1 minuto para anelamento dos *primers*, 72°C por 1 minuto para extensão. Os ciclos foram repetidos 35 vezes e, após o término, as amostras foram mantidas a 4° C.

Para verificar o resultado da PCR uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi misturada a 3µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com brometo de etídio (0,05 µG/ml), utilizando tampão TBE 1X a 70V por aproximadamente 1 hora e 10 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

## 2.5. Técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Após o isolamento e a amplificação da região de interesse do gene do IGF-I pela PCR, as amostras foram submetidos à técnica de RFLP, que consiste na clivagem da molécula do DNA por enzimas de restrição, em sequências conhecidas que possuem geralmente de 4 a 6 nucleotídeos. A diferença de um par de bases entre os indivíduos pode criar ou extinguir um sítio de restrição em um determinado *locus* do genoma, gerando um polimorfismo. Dessa forma, se o DNA for digerido com a enzima de restrição adequada, o *locus* polimórfico pode ser identificado pela mudança no tamanho do fragmento do DNA (REGITANO e COUTINHO, 2001).

Neste trabalho, a aplicação da técnica de RFLP para tentar identificar polimorfismos foi realizada utilizando-se a enzima de restrição *Hinf*-I (Invitrogen) cuja sequência palindrômica do sítio de clivagem é 5'- G↓ANT C- 3', 3'- C TNA↑G - 5'. As digestões

foram realizadas em volume final de 20  $\mu\text{L}$ /amostra, contendo 10  $\mu\text{L}$  do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 5 unidades da enzima *Hinf*-I. O procedimento foi realizado em termociclador Biometra®, a digestão foi feita por 3 horas a 37°C depois 25 minutos a 70°C para inativação da enzima e finalmente 4°C para conservação das amostras até a análise.

Para visualização do resultado 10 $\mu\text{l}$  de cada amostra foram misturados a 5 $\mu\text{l}$  de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) para realização da eletroforese em gel de agarose (2,0%) com brometo de etídio (0,05  $\mu\text{G/ml}$ ), em tampão TBE 1X a 100V, por 1 hora e 10 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

## 2.6. Cálculos de frequências e teste de equilíbrio de Hardy e Weinberg

As frequências gênicas ( $x_i$  e  $x_j$ ) e genóticas ( $x_{ii}$ ,  $x_{ij}$  e  $x_{jj}$ ) obtidas foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados e estabelecidas com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n} \quad x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n}$$

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \quad x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n}$$

Onde:  $n_{ii}$ ,  $n_{jj}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homocigotos e heterocigotos observados nos alelos  $i$  e  $j$ , respectivamente;  $n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

Para testar a aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o software estatístico GENEPOP versão 3.1 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). As frequências genóticas esperadas, em equilíbrio, foram estimadas a partir da expansão do binômio descrito por Falconer e Mckay (1996):

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que:  $x_i^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo i;  $2x_i x_j$  = frequência esperada para heterozigotos ij;  $x_j^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

### 3. Resultados e discussão

O procedimento usado para extração do DNA genômico dos folículos pilosos dos bovinos mostrou-se eficiente como mostra a imagem foto documentada do gel (Figura1) na qual a primeira banda formada no padrão de migração mostra uma quantidade satisfatória de DNA extraído. Contudo a grande maioria das amostras apresentaram bandas arrastadas o que sugere sinais de degradação do DNA e a banda formada no fim do padrão e fortemente visível indica RNA (SALMAM e LAUREANO, 2006). Entretanto, a presença de RNA e DNA degradado não comprometeu as análises posteriores de PCR e RFLP.

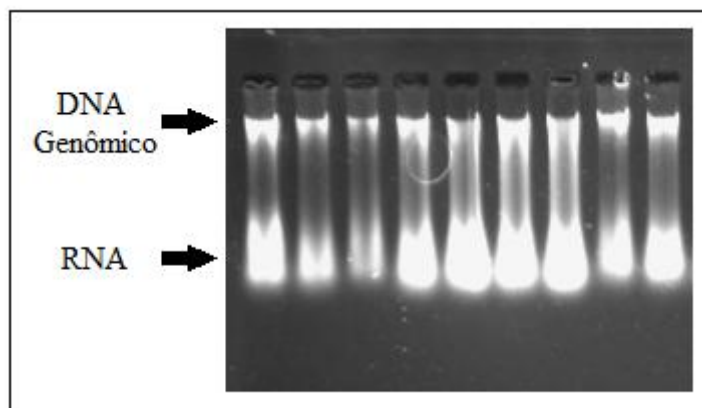


Figura 1. Exemplo de amostras de DNA extraído. Eletroforese em gel de agarose a 0,5%.

Para definir a melhor temperatura de anelamento dos *primers* foi realizado um teste de gradiente de temperatura usando 3 qualidades de amostras de DNA, A: boa, B: regular C: ruim. O gradiente utilizado foi de 51 a 56,8°C. Não ocorreu amplificação da amostra C (ruim) o que indica a inexistência ou insuficiência de DNA nesta. Já nas amostras viáveis, A e B, observaram-se melhores resultados nas temperaturas mais elevadas devido à menor formação de bandas inespecíficas (Figura 2).

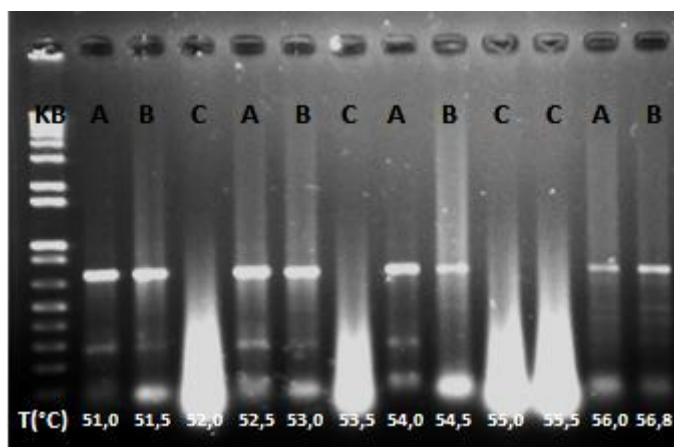


Figura 2. Teste de gradiente de temperatura para anelamento dos *primers*. Eletroforese em gel de agarose a 1%.

O resultado da PCR foi satisfatório apresentando uma banda bem definida com o fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 800pb, indicando o funcionamento dos *primers* desenhados para a região estudada (Figura 3).

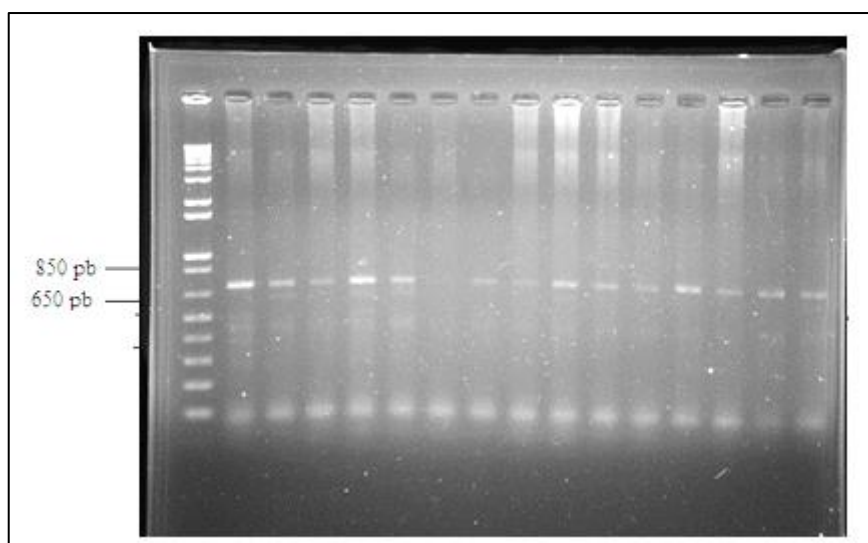


Figura 3. Resultado da PCR com indicação do fragmento do gene do hormônio IGF-I amplificado. Eletroforese em gel de agarose 2%.

Os fragmentos amplificados na PCR posteriormente digeridos pela enzima *Hinf-I* na técnica de RFLP permitiram, após a eletroforese em gel de agarose, a identificação de 3 padrões de migração das bandas distintos: dois homozigotos (VV, SS) e um heterozigoto (VS), conforme ilustra a Figura 4. Tal resultado caracteriza a existência de polimorfismo na região do gene do IGF-I analisada com a utilização da enzima supracitada.

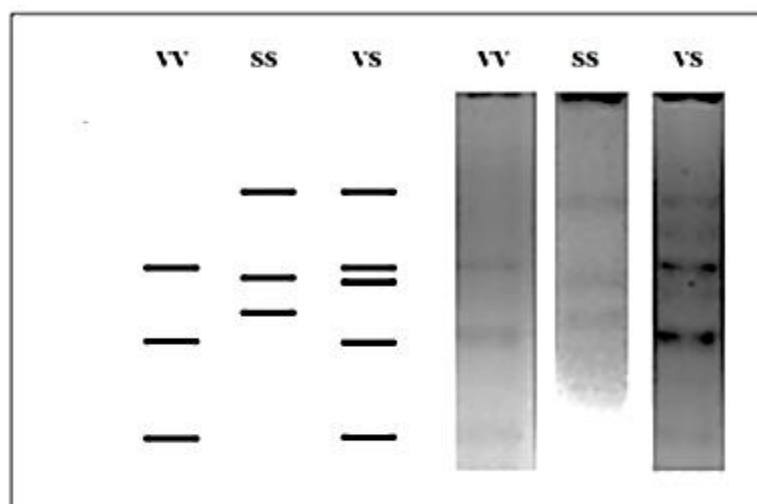


Figura 5. Eletroforograma representativo dos diferentes padrões de bandas observados no resultado da técnica PCR-RFLP com utilização da enzima *Hinf-I*.

As respectivas frequências gênicas e genóticas obtidas entre os 63 animais avaliados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Frequências gênicas e genóticas observadas e calculadas.

	Genótipos observados			Frequências alélicas <sup>ns</sup>
	VV	VS	SS	
<b>Frequência</b>	0.238	0.587	0.175	f (V) = 0,532
<b>n</b>	15	37	11	f (S) = 0.468

<sup>ns</sup> = não significativo para teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg  $\chi^2$  a 5% de significância

Os resultados obtidos com o teste de  $\chi^2$  indicam que as frequências observadas na região estudada nos animais avaliados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isto pode ser atribuído tanto a efeitos de seleção natural quanto a seleção artificial dos animais genotipados, o que contribui para alterações nas frequências alélicas a cada geração na população de animais da raça Crioula Lageana. Isto pode ser um indicativo de variabilidade genética na população, fato que, se comprovado futuramente por associações dos genótipos obtidos a informações fenotípicas para características de interesse, viabilizarão a seleção assistida pelos marcadores em programas de melhoramento da raça.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que foi possível identificar polimorfismos para a região estudada do gene do IGF-I em animais da raça Crioula Lageana.

#### 5. Referências bibliográficas

(a) ABIEC (São Paulo/ SP). **5 motivos para valorizar a pecuária bovina do Brasil**. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1378#.WBn8hfkrIdU> >. Acesso em: 02 nov. 2016.

(b) ABIEC (São Paulo/ SP). **Rebanho bovino brasileiro**. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/3\\_rebanho.asp](http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp)>. Acesso em: 31 out. 2016.

ANDOH, T. Development of Non-Radioisotopic Immunoassay Systems for Measuring Flounder IGF-I. **Zoological Science**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1023-1030, set. 2005. Zoological Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.22.1023>.

BELTRAN, M. P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.

BISHOP, D. K.; WATTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **Journal of Animal Science**. v. 72, p. 2703-2708, 1994.

EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P. B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. Cap. 2. p. 11-38.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Longman Press, London, UK, 1996, 4.ed.

GIL, F. M. M. **Polimorfismo no gene do hormônio grelina em búfalas (*Bubalus bubalis*) e sua associação com produção e qualidade do leite**. 2012. 57f. Dissertação (Doutor) – Curso de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista ‘Julio de Mesquita Filho’, FCAV, Jaboticabal, 2012.

IBGE. **Pesquisa pecuária municipal**. Brasília: IBGE, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 31 out. 2016.

INDEPENDÊNCIA. A pecuária de gado de corte, e o ciclo da pecuária. Relações com investidores. **Ri independência**. 26 abr. 2010.

JONES J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev.** n. 16, p. 3-34, 1995.

LIMA, S. P. G. **Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino, em rebanhos Nelore selecionados para o peso pós-desmama.** Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético Animal Universidade Estadual Paulista, FCAV, 2003.

(a) MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

(b) MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

MARIANTE, A. da S. **Conservação de bovinos Crioulos no Brasil. In: Evaluación y elección de biotipos de acuerdo a los sistemas de producción,** ed. Por Juan P. Puignau. Montevideo: IICA-PROCISUR, 368p,1993.

MARTINS, C. E. N.; QUADROS, S. A.; TRINDADE, J. P. P.; QUADROS, F. L. F.; COSTA, J. H. C.; RADUENZ, G. Forma e função em vacas Braford: o exterior como indicativo de desempenho e temperamento. **Archivos de Zootecnia,** Córdoba, v.58, n. 223, p. 425-433. 2009.

PAYNE, W. Y. A. **Cattle production in the tropics.** London: Longman, v. 1, 1970.

PEIXOTO, A. M. Raças de bovino de corte que interessam no Brasil. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de Corte.** Piracicaba: FEALQ, 2010. Cap. 4. p. 55-73.

RADCLIFF, R. P.; VANDEHAAR, M. J.; KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B. K.; TUCKER, H. A.; LUY, M. C. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science,** v. 87, p. 1229-1235, 2004.

RANGEL, P. N.; ZUCCHI, M. I.; FERREIRA, M. E. **Genetic similarity among Brazilian cattle breeds (Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras).** Pesq. Agro. Bra., v. 39, p. 97-100, 2004.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. GENEPOP version 3.1d: Population genetics software for exact test and ecumenism. **Journal of Heredity.** v.86, p.248-249, 1995.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

RIBEIRO, J. A. R. **Gado Crioulo Lageano, uma alternativa sustentada para as pastagens naturais do Planalto Catarinense.** In: Simpósio da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Anais. Rio de Janeiro, p. 245-262, 1993.

SALMAM, A. K. D.; LAUREANO, M. M. M. **Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pelo de bovinos**. Embrapa Rondônia, Circular técnica, v. 87, 2006.

SALMAN, A. K. D.; POLAINA, F. G.; MALAGO, W. J. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **Revista eletrônica de Veterinária**, v.10, n.2, p.1-17, 2009.

VEIGA, T. F. **Raça Crioula lageana: estudo de características de carcaça e relação entre morfologia e intervalo entre partos**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2011.