

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE MEDICINA VETERINÁRIA

Nariely Martins de Souza

Mutagênese computacional da proteína transportadora de glicina 2, expressa pelo gene  
*SLC6A5* em bovinos da raça Belgian Blue

Uberlândia - MG  
2023

Nariely Martins de Souza

Mutagênese computacional da proteína transportadora de glicina 2, expressa pelo gene  
*SLC6A5* em bovinos da raça Belgian Blue

Monografia apresentada à coordenação do curso graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

Uberlândia - MG  
2023

Nariely Martins de Souza

Mutagênese computacional da proteína transportadora de glicina 2, expressa pelo gene *SLC6A5* em bovinos da raça Belgian Blue

Monografia aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista no curso de graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia.

**APROVADA EM 20 DE JUNHO DE 2023**

Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

(Instituto de Química / IQ-UFU)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Amanda Marchi Maiorano

(Faculdade de Medicina Veterinária / FAMEV-UFU)

Prof. Dr. Guedmiller Souza de Oliveira

(Instituto de Química / IQ-UFU)

**Uberlândia - MG  
2023**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais Joaquim e Graciele, por todo apoio, cuidado, carinho e amor que me proporcionaram durante toda a vida e principalmente nos últimos cinco anos durante a graduação, sempre trabalharam para me proporcionar o melhor e para que eu pudesse me dedicar integralmente a faculdade e aos meus sonhos. Minha gratidão eterna, por acreditarem em mim, por me amparar nos momentos difíceis, por me ajudarem a encontrar a luz no final do túnel, que por muitas vezes vocês foram os meus olhos. Obrigada pela paciência diária. Vocês me ensinaram a encarar os desafios da vida de cabeça erguida, haja o que houver, e se levantar depois de uma derrota. Serei grata eternamente.

Quero agradecer aos meus irmãos Ido Gediel e Lucymeire, e ao meu sobrinho Pietro Asaph por todo cuidado, amor e apoio incondicional durante todos esses anos, obrigada pelo incentivo e paciência diária, por sempre estarem a disposição em todos os momentos para me ajudar. Vocês são meu pilar para enfrentar os desafios diários, obrigada por cada mínimo gesto.

Agradeço também a minha amiga querida Patrícia e meu amigo querido Leandro, pelo incentivo de todos os dias, pelo apoio incondicional. Obrigada por estarem comigo nessa caminhada e por sempre acreditarem em mim.

Também quero agradecer aos amigos que fiz ao longo da graduação, pessoas incríveis, dedicadas, sonhadoras e que juntos chegaremos ao fim de mais um ciclo e nos tornaremos colegas de profissão, para além de amigos.

Aos meus familiares que estiverem comigo nessa jornada, que mesmo de longe sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir meus sonhos.

Por fim, quero agradecer aos meus professores que durante a graduação me deram oportunidade ímpares em participar de estudos, trabalhos e eventos científicos, em especial que agradecer ao meu orientador Professor Dr. Eduardo de Faria pela oportunidade e por aceitar o desafio de orientar um aluno de uma área distante da Química. Obtive muitos aprendizados com a área de química computacional e durante todo o processo de desenvolvimento desse projeto. Foi uma honra trabalhar com você e com o Professor Dr. Guedmiller. A vocês, a minha gratidão.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Localização do resíduo de SER479 (representação Licorice) em interação com o íon Na <sup>+</sup> . A proteína está na representação new cartoon, no software VMD. ....	18
<b>Figura 2</b> – Gráfico RMSD (Raiz Quadrada do Desvio Médio Quadrático) em função do tempo de simulação. ....	19
<b>Figura 3</b> – Estrutura sobrepostas das proteínas mutantes 1 e mutante 2 respectivamente .....	20
<b>Figura 4</b> – Estrutura da proteína nativa depois da simulação de Dinâmica Molecular ilustrando a conservação da estrutura secundária da enzima. ....	20
<b>Figura 5</b> – Raiz da Distância Mínima Quadrática Média da proteína Nativa, Mutante 1 e da Mutante 2, durante 20 ns de simulação. ....	21
<b>Figura 6</b> – Representação gráfica do Raio de Giro das proteínas ao longo da simulação.....	22
<b>Figura 7</b> – Diagrama de Ramachandran com a representação das proteínas nativa a), Mutante 1 b) e Mutante 2 c )......	23

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DM** – Dinâmica molecular

**DMC I** – Distonia muscular congênita do tipo I

**DMC II** – Distonia muscular congênita do tipo II

**GLYT2** – Glycine transporter 2 (Transportadora de glicina tipo 2)

**OPLS-AA** - Optimized Potentials for Liquid Simulations - All Atom (Potenciais Otimizados para Simulações Líquidas - Todos os Átomos)

**RMSD** - Root Mean Square Deviation (Raiz quadrada do desvio quadrático médio)

**RMSdist** - Root Mean Square Distance (Raiz da Distância Mínima Quadrática Média)

**RG** – Radius of Gyrate (Raio de Giro)

## RESUMO

Atualmente, uma das raças de grande destaque da bovinocultura de corte européia conhecida como Belgian Blue é acometida por defeitos genéticos recessivos que resultaram em mutações ligadas a distúrbios musculares que geram preocupações quanto ao bem-estar e sanidade do animal, bem como perdas econômicas. Para melhor entendimento dos distúrbios musculares causados por mutação, este estudo buscou abordar a distonia muscular congênita (DMC II), um distúrbio pouco estudado e conhecido na ciência animal, que acomete bezerros ainda nas primeiras horas, também foram realizados estudos interdisciplinares para compreender os efeitos de mutação genética em outras espécies. No contexto atual, os estudos genéticos se tornaram um pilar fundamental para a seleção animal e melhoramento genético, uma vez que se tem desenvolvido novas ferramentas e métodos para diagnosticar genes de interesse da produção animal, além de contribuir com estudos dinâmicos para maior compreensão do genoma e suas funções, e influência nos organismos. Este estudo, estendeu-se sobre metodologias de grandes áreas da genética, como a genética molecular e mutagênese, aplicada ao melhoramento genético animal para avaliar o efeito de mutação por endogamia em rebanho de bovinos da raça Belgian Blue. Para tanto, a partir de técnicas de Modelagem Molecular foram realizadas duas mutações na proteína transportadora de glicina 2 (GLYT2) e submetidas a Dinâmica Molecular com tempo de simulação de 20ns e foi verificada alterações significativas na conformação, flutuação, estabilidade e flexibilidade proteica o que impactaria nas funções enzimáticas.

**Palavras-chave:** Distúrbios. Transportadora de glicina 2. Mutações. Dinâmica molecular. Genética.

## ABSTRACT

Actually, one of the most prominent breeds of European beef cattle known as Belgian Blue is affected by recessive genetic defects that have resulted in mutations linked to muscle disorders that raise concerns about the animal welfare, health, reproduction, as well as economic losses. For a better understanding of muscle disorders caused by mutation, this study sought to address congenital muscular dystonia (DMC II), a disorder that is little studied and known in animal science, which affects calves in the early hours, interdisciplinary studies were also carried out to understand the effects of genetic mutation in other species. In the current context, genetic studies have become a fundamental pillar for animal selection and genetic improvement, since new tools and methods have been developed to diagnose genes of interest to animal production, in addition to contributing to dynamic studies for a better understanding of the genome and its functions and influence on organisms. This study extended over methodologies from large areas of genetics, such as molecular genetics and mutagenesis, applied to animal genetic improvement to evaluate the effect of mutation by inbreeding in bovine herds. For that, using Molecular Modeling techniques, two mutations were performed in the glycine transporter protein 2 (GLYT2) and subjected to Molecular Dynamics with a simulation time of 20ns and were verified significative changes in the protein conformation, fluctuation, stability and flexibility, resulting in an enzymatic functionality.

**Keywords:** Disorders. Glycine transporter type 2. Mutations. Molecular dynamics. Genetics.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>3.1 Glicina</b> .....	12
<b>3.2 Transportador de glicina tipo II</b> .....	13
<b>3.3 Seleção e melhoramento genético animal</b> .....	14
<b>3.4 Genética molecular</b> .....	15
<b>3.5 Mutagênese</b> .....	16
<b>3.5 Simulação computacional e experimentação <i>in silico</i></b> .....	16
<b>4.1 Amostragem do espaço conformacional utilizando simulações de Dinâmica Molecular</b> .....	17
<b>5.1 Análise estrutural da proteína nativa e suas mutações</b> .....	18
<b>6 - Conclusão</b> .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

A endogamia consiste no acasalamento de indivíduos com algum grau de parentesco, sendo a principal causa de baixa variabilidade genética dentro do rebanho, entretanto, é viável obter resultados positivos a partir desse sistema de acasalamento. Contudo, é necessário conhecer os graus de consanguinidade e o desempenho dos animais selecionados, desse modo, é possível obter padronização e fixação de características desejáveis, além de assegurar a uniformidade do rebanho.

Ao utilizar o sistema de acasalamento consanguíneo, deve-se considerar que haverá a diminuição da variabilidade genética e o aparecimento de fenótipos indesejáveis como consequência de homozigose. Portanto, é importante compreender que a consanguinidade não cria nenhum gene deletério ou letal na população, mas verifica-se que a endogamia leva a um aumento de pares de genes em homozigose, e a ocorrência de diversas anomalias congênitas que se manifesta apenas em homozigose recessiva (KOURY FILHO, 2002), como no caso da distonia muscular congênita do tipo II.

A distonia muscular congênita (DMC II) em bovinos Belgian Blue se assemelha à mioclonia congênita (tremores congênitos) dos bovinos Hereford, em que todos os bezerros com DMC têm episódios de contraturas musculares generalizadas, no entanto exames sugerem dois fenótipos distintos para DMC I e DMC II. Os bezerros que manifestam DMC I geralmente morrem dentro de algumas semanas como resultado de complicações respiratórias. Já os bezerros que expressam a DMC II sofrem episódios graves de mioclonia por via acústica ou estimulação tátil e morrem poucas horas após o nascimento (CHARLIER, et al., 2008).

O locus da DMC II em bovinos, está localizado no cromossomo 29, englobando 13 genes. O sequenciamento do gene *SLC6A5*, demonstrou indícios de mutação, sendo o gene que codifica a proteína GlyT2 (UniProtKB: Q9Y345), tendo como função a manutenção de um reservatório pré-sináptico de neurotransmissores em sinapses glicinérgicas (GOMEZA, et al., 2003). Em humana, mutações de troca (missense), sem sentido (nonsense) e mudança no quadro de leitura (frameshift) no gene *SLC6A5* estão associados com o distúrbio neurológico intitulado hiperecplexia autossômica recessiva (OMIM 149400).

Uma análise genética revelou mutações em vários genes de proteínas pós-sinápticas envolvidas na neurotransmissão glicinérgica, incluindo as subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta$  do receptor de glicina (GlyR), gefirina (PDB: 2F7S) e colibistina (PDB: 4MT7) (ROBERT et al., 2008). Todavia, pesquisas indicam que as mutações no gene que codifica o transportador pré-sináptico de glicina GlyT2 é a segunda principal causa de distonia muscular congênita tipo II em bovinos (DMC II) e hiperecplexia humana (ROBERT et al., 2008). Diante dos estudos apresentados,

pode-se avaliar a importância de estudos em genética quantitativa e molecular para os programas de melhoramento e seleção genética de rebanhos bovinos, além da adoção de um sistema criterioso para a utilização do método de acasalamentos endogâmicos.

Dessa forma, é possível estimar os ganhos genéticos, econômicos e produtivos, e prever perdas no sistema de produção. Ademais, descrever e conhecer os efeitos da mutação no gene *SLC6A5* causador de DMC II e outras doenças genéticas neurodegenerativas em bovinos, a nível molecular, proporcionará informações esclarecedoras acerca de distúrbios genéticos em bovinos.

A simulação computacional é um fator chave para estudos em genética molecular dando profundidade em pesquisas sobre mutações e seus efeitos, uma vez que a ferramenta com estudos moleculares é capaz de indicar diferenças sutis o que não é possível avaliar com diagnósticos clínicos (ROBERT et al, 2008).

Desse modo, conciliar técnicas desenvolvidas pela genética molecular juntamente com modelagem computacional poderá proporcionar maiores esclarecimentos sobre mutações, identificar e estudar os genes de influência, ao mesmo tempo que contribuirá com estudos genômicos no melhoramento genético animal, bem como na seleção de indivíduos.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi descrever o comportamento da mutação T809C ocorrida no gene *SLC6A5* que codifica a proteína (GLYT2) na raça bovina Belgian Blue, a partir de ferramentas de simulação computacional, com finalidade de proporcionar conhecimento molecular sobre a proteína mutante, sua conformação, interação, determinação da estrutura, uma vez que a GLYT2 é uma proteína importante de função estrutural conhecida. Bem como, verificar a viabilidade do uso de Dinâmica molecular para estudo em genética molecular.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

Os bovinos da raça Belgian blue são animais nativos da Bélgica, se destacam por apresentarem musculatura dupla. Atualmente, animais desta raça representam 50% do rebanho Belga, 61% dos bovinos Azul Belga está na região da Valônia e 39% na parte flamenga da Bélgica (BELGIAN BLUE GROUP, 2023). Estes pertencem à subespécie *Bos taurus taurus*, sendo um gado europeu de alta produtividade (MORAES, 2016). No século XIX, touros da raça Shorthorn, do Reino Unido, foram enviados para a Bélgica visando o cruzamento entre as raças,

com expectativa de aumentar o ganho em musculatura. Entre 1920 e 1960, o animal resultante do cruzamento entre o gado belga e o Shorthorn cumpria a demanda por leite e carne (MORAES, 2016).

Com o objetivo de produzir mais carne para o mercado, foram criados programas de avaliação genética para selecionar os melhores animais para serem reprodutores e fixar a característica de dupla musculatura nos rebanhos. Os animais que apresentavam maior desenvolvimento de musculatura, foram selecionados para cruzamento, dessa forma ocasionando os animais que conhecemos atualmente.

Os bovinos da raça Belgian Blue localizados no norte da Europa para qual são destinados a produção de carne por apresentarem alto desempenho, são selecionados pelos programas de mestiçagem, fazendo com que ocorra sua expansão em todo o mundo. Atualmente, os animais Belgian blue estão presentes na França, Holanda, Grã-Bretanha, Irlanda, Dinamarca, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, México e também no Brasil (MORAES, 2016).

O gado Belgian Blue possui uma das maiores taxas de deposição de musculatura, sendo essa uma das principais características de importância na produção animal. De acordo com Arthur (1995), bovinos com dupla musculatura são conhecidos por terem características superiores de carcaça, comparado ao *Bos taurus indicus*, isso se deve principalmente à hipertrofia generalizada da musculatura, finura dos ossos, menor potencial para acumular gordura e menor trato digestivo.

No Brasil, a raça é comumente utilizada para a produção de carne e normalmente são cruzados com zebuínos (bovinos originários da Índia) com a finalidade de aumentar o rendimento de carcaça e a produção de carne. Para Perdigão e Roquete (2007), em seus estudos que fomentava avaliar a produtividade em utilizar touros Belgian Blue e Charolês em cruzamento com vacas comerciais na região de Évora (Portugal), demonstraram que há diferenças de peso ao desmame próximo dos 28kg, quando comparados com a raça Charolês. Esta diferença representa acréscimo de peso vivo ao desmame de cerca de 15% (Perdigão e Roquete, 2007).

### **3.1 Glicina**

A glicina é um aminoácido não essencial codificado pelo código genético, com função fundamental na composição fisiológica dos organismos de mamíferos. Pode ser encontrada em grande quantidade em proteínas estruturais, como o colágeno e a queratina, podendo também

ser encontrada em alimentos como feijão, milho e alimentos de origem animal (APRISON E DALY 1978). A glicina é um composto de estrutura simples que exerce importante função no sistema nervoso central, atuando como neurotransmissor e inibidor, nas vias glicinérgicas do cérebro, espinha, e retina, a glicina atuando como um neurotransmissor inibitório clássico e participando no processamento motor e sensoriais, permitindo movimento, visão e audição (WERMAN, *et al.* 1967, APRISON E DALY 1978, APRISON, 1990, CORTES E PALACIOS 1990, DALY 1990, POURCHO E GOEBEL 1990, WENTHOLD E HUNTER 1990).

Os resíduos de glicina podem ser armazenados no interior hidrofóbico das proteínas. Isto permite flexibilidade na dobragem de proteínas com capacidade para formação de hélices e permite flexibilidade na disposição dos receptores (SERRANO, L. *et al.*, 1992). A modulação dos resíduos de glicina fornece uma estrutura base para mudanças conformacionais dentro ou próximo a domínios da membrana celular, necessários para funções como transporte e sinalização (LI E DEBER, 1992). Os canais de íons são poros proteicos dentro da membrana celular que transferem íons ao longo de um gradiente eletroquímico, são necessários e desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade celular (HILLE BI, 1978).

A atividade biológica de algumas moléculas pode ser alterada pela adição ou remoção de um resíduo de glicina. A modulação de resíduos de glicina fornece uma estrutura base para transições conformacionais dentro ou adjacentes para domínios de membrana necessários para funções como transporte ou sinalização em canais iônicos (HALL, 1998).

### **3.2 Transportador de glicina tipo II**

GlyT2 é uma proteína transportadora da família SLC6 de neurotransmissores dependentes de sódio e cloretos (DE JUAN -SANZ, J. *et al.*, 2013). Esta família inclui um transportador adicional de glicina, GlyT1, bem como os transportadores para GABA, dopamina, norepinefrina e outros transportadores. Estas são glicoproteínas de membrana com uma disposição estrutural de 12 segmentos na transmembrana e funcionam como transportadores ativos secundários acoplados ao gradiente Na<sup>+</sup> mantido pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, uma proteína que está diretamente associado com GlyT2 (DE JUAN -SANZ, J. *et al.*, 2013).

De acordo com Rees *et al.*, (2006), o sequenciamento de SLC6A5 para casos de DMC II revelou uma mutação missense (T809C) no exon 4, resultando numa substituição de um resíduo de leucina (L270P) no terceiro domínio de membranas de GlyT2.

### 3.3 Seleção e melhoramento genético animal

O objetivo do melhoramento genético, em geral, é alcançar melhores níveis de produção e qualidade do produto dependendo do sistema de produção e das exigências do mercado. Para atingir esse objetivo, é necessário controlar algumas das características que os animais apresentam: adaptabilidade, eficiência reprodutiva, vitalidade, peso corporal, taxa de crescimento, qualidade da carcaça e da carne são algumas dessas características (ROSA, *et al.* 2013). O desempenho individual dos animais é o resultado do ambiente e da genética. Alto nível de produtividade e retorno econômico são alcançados através de melhoramento juntamente às condições ambientais e a composição genética dos animais (CARNEIRO JUNIOR, 2009).

As características morfológicas, fisiológicas e comportamentais compõem o fenótipo (P) do animal, ou seja, são os aspectos que determinam a aparência do animal e podem ser observados e mensurados. O genótipo (G) é a constituição genética do indivíduo, para tal a mãe e o pai contribuem com 50% de seus genes, no entanto, para que esses genes sejam expressos é necessário um ambiente (E) favorável e adequado. Em resumo, para que se tenha a expressão do fenótipo em um indivíduo ou rebanho é preciso que haja interação entre genótipo e ambiente (GxE), de maneira que o ambiente seja favorável para que esses genes sejam expressos (ROSA *et al.* 2013). Todas essas interações podem ser compreendidas pela seguinte equação 1:

$$P = G + E + G \times E$$

De acordo com Rosa, *et al.* (2013), o ambiente envolve todos os fatores não genéticos que contribuem, positivamente ou negativamente, para a expressão fenotípica, desse modo, pode-se subentender que, inclui os efeitos proporcionados pelo próprio produtor, diretamente, aos animais ou no sistema produtivo, cuidados com a sanidade, nutrição, manejo (dos solos, das pastagens e dos animais) e as tomadas de decisão de administração do negócio são alguns dos fatores ambientais que podem influenciar no fenótipo. Logo, o ambiente é um fator que o homem não pode controlar em sua infinita variação e poucas são as situações que podem ser controladas, mas geralmente requer alto valor de investimento.

Partindo do ponto de vista da importância do ambiente para o melhoramento genético, escolher os animais que melhor se adaptam a um determinado clima é o ponto chave para se obter bons resultados, para isso é importante as avaliações genéticas, uma vez que essas análises vão indicar quais são os melhores animais mais bem adaptados e que vão passar por um

processo de seleção para serem reprodutores que passaram tais características a próxima geração (ROSA, *et al.* 2013).

A seleção animal consiste na seleção dos pais para a próxima geração e a determinação da intensidade da sua utilização na reprodução. Neste caso, o objetivo é aumentar a frequência dos alelos que favorecem a eficiência econômica do sistema de produção, alterando, em última análise, a constituição genética da população (ROSA, *et al.* 2013). Ademais, possui a vantagem de ser menos dispendioso do que outras fases do ciclo de reprodução, de modo que a seleção proporciona benefícios cumulativos no rebanho. De modo que a superioridade genética dos pais é repassada aos filhos e assim a geração seguinte.

### **3.4 Genética molecular**

A identificação dos processos químicos dos genes possibilitou conhecer os fenômenos biológicos por meio das leis da física e química, ideia defendida por Erwin Schrodinger em 1944 (RIBEIRO, 2014).

Segundo Regitano (2004), a genética molecular conseguiu um avanço significativo desde a exploração do DNA. Esse avanço possibilitou o desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e função do material genético, de equipamentos com capacidade para análise automatizada de grande quantidade de amostras, de métodos estatísticos e de ferramentas de informática, resultando na ciência conhecida como genômica (REGITANO, 2004).

A Genômica é a área da ciência que tem como objetivo o estudo do genoma. Pesquisas genômicas envolvem mapeamento genético, sequenciamento de genes ou de genomas completos de organismos selecionados, organização dos resultados em bancos de dados acessíveis e desenvolvimento de aplicações para os dados genômicos em áreas de interesse como Biologia, Medicina e Zootecnia (MENEZES, *et al.*, 2013). A genômica é uma importante área que vem auxiliando em pesquisas para novos tratamentos médicos, identificando milhares de novos alvos biológicos (locais de ação farmacológica) que podem contribuir para o desenvolvimento de medicamentos, vacinas e diagnósticos (GARCIA, 2006).

Além da Genômica, estudos com proteômica que utiliza de técnicas que separam e identificam, como a eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática para analisar o proteoma aparente em células, tecidos ou pelo organismo em um dado momento, a análise proteômica permite determinar, quantificar e avaliar o tipo de modificações pós-traducionais sofridas pelas proteínas incluídas em diversos processos, possibilitando a evidências de novos alvos terapêuticos e moléculas bioativas (FARIA-PINTO, *ET AL.*, 2015).

Ademais, os estudos moleculares proporcionam um vasto conhecimento para a compreensão da estrutura, função e impacto dos conjuntos de átomos que formam pequenas moléculas, como os aminoácidos, sendo a unidade fundamental das proteínas e os nucleotídeos, a unidade fundamental do DNA e RNA, o conhecimento desses mecanismos pode auxiliar no desenvolvimento de ferramentas (GARCIA, 2006).

### **3.5 Mutagênese**

Esforços têm sido dedicados para analisar danos causados no DNA e quais os mecanismos biológicos são utilizados para reparar tais anomalias, uma vez que o resultado desses danos leva a inserção de mutações no DNA como consequência. O processo pelo qual as mutações são produzidas é referido como mutagênese (ERROL, et al., 2005). Quando a mutagênese que ocorre sem tratamento do organismo com um exógeno, o mutagênico é referido como mutagênese espontânea (ERROL, et al., 2005).

Um conjunto particularmente importante de termos aplica-se a mutações de substituição de base que afetam o código de proteínas de uma região genômica. As mutações do tipo substituição (*Missense*) são aquelas que alteram o códon de um aminoácido originando em outro aminoácido. Mutações do tipo sem sentido (*Nonsense*), mudam o códon de um aminoácido para um dos três códons de paragem (*stop condons*): TAG, TAA, ou TGA, (ERROL, C. et al., 2005).

### **3.5 Simulação computacional e experimentação *in silico***

A simulação computacional busca através de métodos e modelos matemáticos prever e descrever processos físicos, químicos e biológicos, aplicados a softwares. Esse tipo de modelo computacional proporciona maior confiabilidade na tomada de ações acerca de um experimento, auxilia no desenvolvimento de hipóteses, na solução para resultados (DISNER, 2019).

Atualmente, com o avanço das tecnologias a comunidade científica e toda sociedade tem debatido a importância da simulação computacional e suas limitações. A principal hipótese levantada gira em torno se a experimentação *in silico* é uma ferramenta que pode substituir a experimentação *in vivo*, uma vez que os debates em relação a experimentação com animais e as leis de bem-estar animal se tornaram uma pauta contemporânea (DISNER, 2019).

Além disso, o modelo computacional tem se difundido entre as diferentes áreas de pesquisa, por apresentar maior viabilidade econômica, operacional e por via burocrática.

## 4. METODOLOGIA

Para estudos da proteína em questão, foram usadas técnicas de Modelagem Molecular, em particular a metodologia de Dinâmica Molecular. Como modelo inicial, foi utilizado a proteína humana SC6A5\_HUMA (UniProtKB: Q9Y345) identificada na base de dados UniProt, em função de que essa proteína está presente no organismo de todos os mamíferos e ainda não há registro cristalográfico dessa proteína em bovino.

Os resíduos utilizados para o estudo foram; SERINA (S479) e LEUCINA (L649) estando localizado no sítio 1 que está em interação com o íon  $\text{Na}^+$ , o mecanismo de transporte dos membros de NSS (Neurotransmissores transportadores de sódio) é dependente do cotransporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (PEREZ-SILES et al., 2011; SUBRAMANIAN et al., 2016).

As mutações da proteína GLYT2 foram realizadas utilizando o software de visualização gráfica MOLDEN (SCHAFTENAAR, Vlieg e VRIEND, 2017), no qual foi possível visualizar e realizar mutações nos resíduos de SERINA e LEUCINA *in loco*. Posteriormente, submetemos as estruturas a dinâmica molecular com duração de 20ns (20 nanosegundos) para verificar possíveis alterações de conformação, flutuação, estabilidade e flexibilidade. Todas as análises de resultados foram geradas a partir do software GROMACS (ABRAHAM; VAN DER SPOEL; LINDAHL; HESS, 2015) e VMD (HUMPHREY, DALKE E SCHULTEN, 1996).

### 4.1 Amostragem do espaço conformacional utilizando simulações de Dinâmica Molecular

A simulação de sistemas moleculares requer a geração de conformações estatisticamente representativas (FRENKEL e SMIT, 2001). A caracterização adequada da dinâmica estrutural das proteínas estudadas exige estruturas adequadas ao meio em que elas foram inseridas. Sendo assim, foi utilizado o método de Dinâmica Molecular (DM), o qual recorre à integração das equações clássicas de movimento, determinando assim, a velocidade e a aceleração das partículas do sistema em um dado instante do tempo (FRENKEL e SMIT, 2001). Isto permitiu obter informações sobre o comportamento dinâmico, dependente do tempo, dos átomos individuais envolvido no sistema (FRENKEL e SMIT, 2001).

As propriedades macroscópicas de interesse (como a pressão, o volume, a temperatura, entre outros) foram obtidas aplicando-se técnicas de mecânica estatística a partir dos dados microscópicos providos da simulação (VAN DER SPOEL, D. et al. 2005).

A proteína transportadora de glicina 2 nativa e mutantes foram solvatadas por moléculas de água explícita do tipo tip4p (BERENDSEN, 1987). Cada sistema teve sua energia

minimizada por 10.000 passos de simulação do tipo *steepest descent* e este foi extensivamente relaxado com dinâmica molecular com o objetivo de se atingir o equilíbrio termodinâmico. A trajetória obtida a partir da DM foi de 20 ns para análise de resultados.

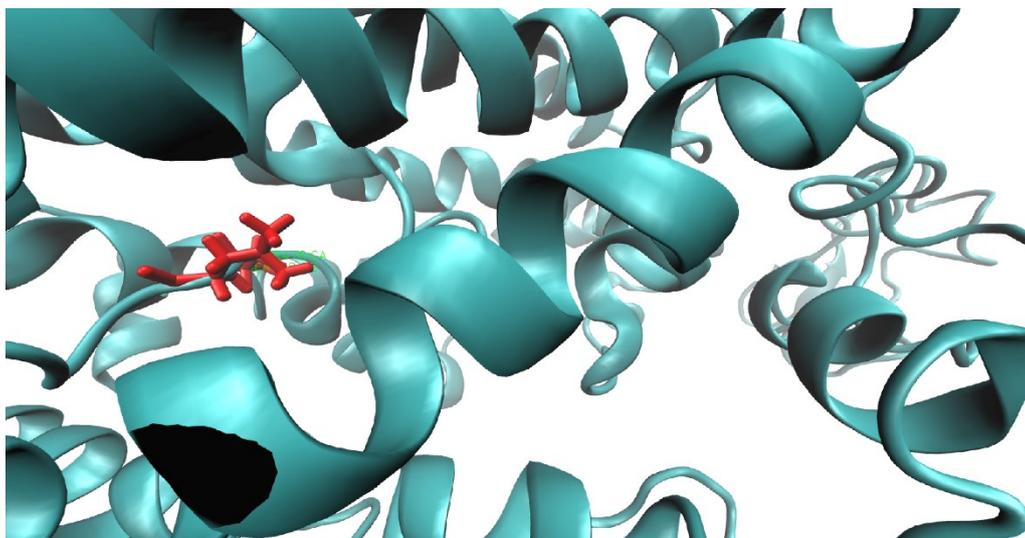
Todas as simulações conduzidas neste projeto foram realizadas utilizando-se o campo de força OPLS-AA (DAMM, W., *et al.*, 1955). Todas a Dinâmica Molecular e suas análises foram realizadas utilizando o conjunto de pacotes computacionais gratuitos inseridos no GROMACS (ABRAHAM; VAN DER SPOEL; LINDAHL; HESS, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise estrutural da proteína nativa e suas mutações

A estrutura cristalográfica da proteína GLYT2 foi ilustrada na Figura 1, sendo destacada a região onde se encontram os resíduos que foram modificados para estudo neste trabalho (serina em vermelho).

**Figura 1** - Localização do resíduo de SER479 (representação Licorice) em interação com o íon Na<sup>+</sup>. A proteína está na representação new cartoon, no software VMD.



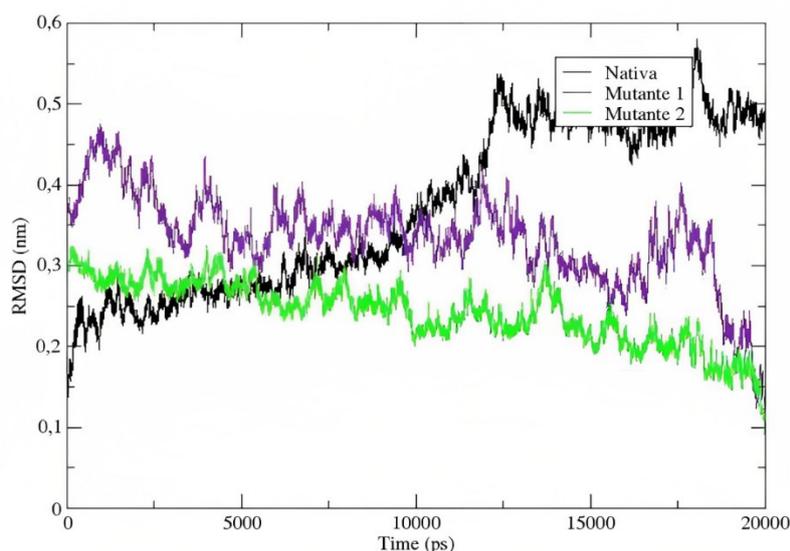
Para avaliar alterações de conformação e estabilidade as proteínas nativa e mutantes foi realizado o cálculo de RMSD, apresentado na Figura 2. A Raiz Quadrada do Desvio Médio Quadrático (RMSD, do inglês Root Mean Square Deviation) é uma medida utilizada para

quantificar a diferença conformacional das proteínas com relação à sua estrutura inicial (em sobreposição) (KIRCHMAIR et al., 2008). Quanto menor o valor do RMSD, mais similar é a estrutura em comparação com a estrutura de referência. Contudo, valores elevados do RMSD indicam uma maior diferença conformacional entre as proteínas comparadas (KIRCHMAIR et al., 2008).

O gráfico de RMSD demonstrou diferenças, e similaridades entre as proteínas nativa e mutantes 1 e 2. A proteína mutante 1 e mutante 2 apresentaram similaridade à proteína nativa no período inicial de simulação até aproximadamente 1000 ps de simulação. Posteriormente, as estruturas foram se diferenciando, ao final da simulação as proteínas mutantes obtiveram valores de desvio próximos a 0,15 nm e a proteína nativa demonstrou um desvio elevado próximo a 0,50 nm.

Portanto, foi possível verificar baixa similaridade quanto a conformação estrutural e estabilidade entre as proteínas nativa, mutante 1 e mutante 2.

**Figura 2**– Gráfico RMSD (Raiz Quadrada do Desvio Médio Quadrático) em função do tempo de simulação.

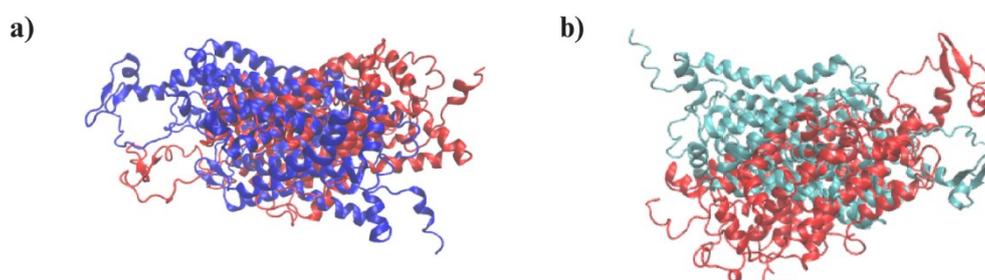


De acordo com estudos de Doss et al., (2012) que avaliou a estabilidade e conformação de mutações que afetam a proteína *FGFR1—A*. As proteínas nativa (*3RHX*) e mutantes (*V513G*, *V607M*, *P7222*), foram submetidas ao cálculo do RMSD que evidenciou que as estruturas da proteína nativas e suas mutantes permaneceram próximas até 200 ps, a partir de 2000 ps até o

final, o mutante P722S apresentou uma grande variação em relação às outras estruturas, atingindo um RMSD máximo de cerca de 0,35 nm por volta de 3600 ps. Ao longo da análise, o modelo mutante P722S mostrou a maior variação, enquanto o modelo mutante V607M exibiu uma variação intermediária, e o modelo nativo e mutante V513G mostraram a menor variação, dessa forma concluiu que as mutações podem afetar o comportamento dinâmico da proteína mutante, como é o caso observado desse trabalho.

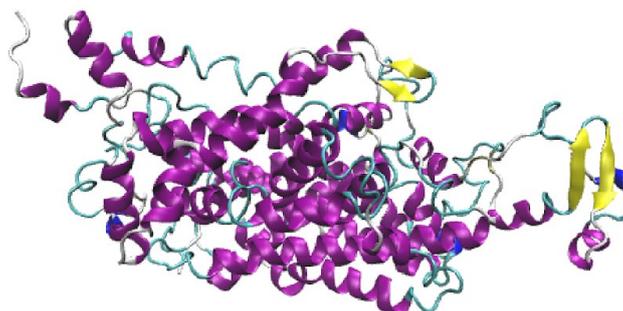
Para representar a mudança na estrutura das proteínas, a Figura 3 mostra a sobreposição das estruturas antes e depois da simulação por DM de 20 ns. Em azul e verde respectivamente, é representado a estrutura inicial das proteínas mutantes, em vermelho as estruturas depois de 20 ns da Dinâmica molecular.

**Figura 3** – Estrutura sobrepostas das proteínas mutantes 1 e mutante 2 respectivamente



De forma geral, apesar da proteína nativa apresentar maior desvio da estrutura inicial, a mesma não perdeu as estruturas secundárias, como pode ser visualizado na comparação da estrutura da proteína nativa após a dinâmica molecular de 20 ns (Figura 4).

**Figura 4** – Estrutura da proteína nativa depois da simulação de Dinâmica Molecular ilustrando a conservação da estrutura secundária da enzima.

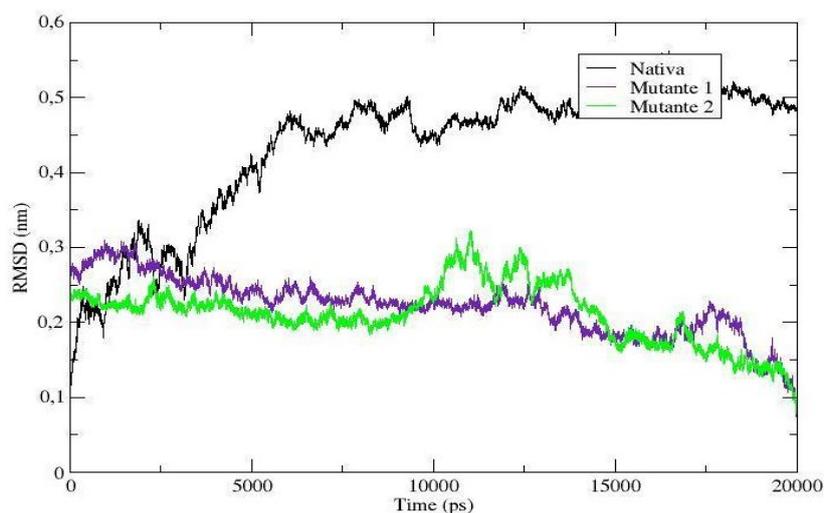


O RMSD continua sendo a medida mais utilizada para determinar a similaridade estrutural, pois não há ambiguidade na determinação da relação entre átomos. Isso ocorre porque o alinhamento envolve a mesma estrutura em diferentes quadros da simulação. Com essa relação estabelecida, o alinhamento rígido padrão realiza rotações e translações em uma das estruturas, minimizando o RMSD e obtendo um alinhamento adequado (MARTINEZ, 2015).

Para analisar com mais detalhes os resultados do RMSD, as estruturas das proteínas nativa e mutante 1 e mutante 2 foram submetidas a um cálculo de RMSDist (Raiz da Distância Mínima Quadrática Média) para verificar alterações quanto a movimentos de translação das proteínas.

Os resultados demonstraram que a proteína nativa apresentou uma movimentação exponencial durante a simulação (Figura 5), tendo maior disposição de translação, em relação às proteínas mutantes 1 e 2 que demonstraram baixa mobilidade. Como é de se esperar, haja visto que a proteína nativa tem um papel de ser uma proteína de transporte.

**Figura 5** – Raiz da Distância Mínima Quadrática Média da proteína Nativa, Mutante 1 e da Mutante 2, durante 20 ns de simulação.



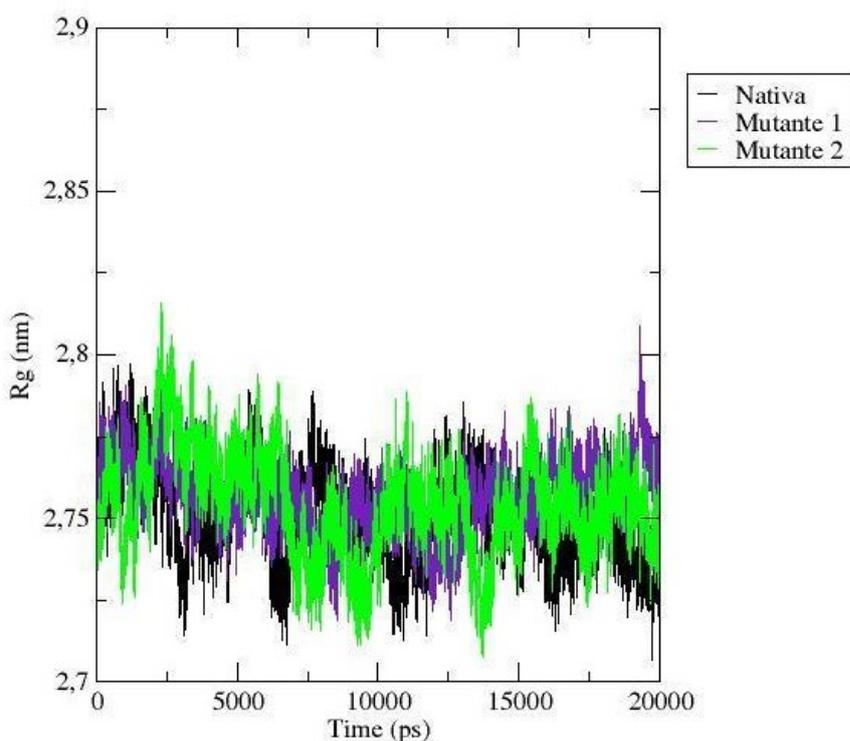
Além disso, para analisar a capacidade de compactação (níveis baixos) e expansão (níveis altos), foi realizado o cálculo do raio de giro (figura 6). O raio de giro (do inglês *radius of gyrate* ou *Rg*) pode ser usado para avaliar a compactação da proteína e monitorar alterações conformacionais (LOBANOV et al., 2008). Quanto menor o valor do raio de giro, mais compacta é a estrutura da proteína (LOBANOV et al., 2008).

A Figura 6 apresenta os resultados do cálculo do *Rg*, onde a proteína nativa apresentou maior grau de compactação aproximadamente 2,7nm, enquanto a mutante 1 apresentou maior

grau de expansão chegando a 2, nm, a mutante 2 sofreu muitas oscilações durante a simulação compactando e expandindo, ao final sendo mais expansiva próximo a 2,75 nm.

Como neste trabalho, Rituraj (2014) avaliou um receptor KIT do tipo nativa e um mutante (D816H), ambos foram analisados o Raio de Giro, onde a região EAL da mutante apresentou um Rg médio de 1,28 nm, enquanto a região EAL do tipo nativo apresentou um valor médio de Rg de 1,23 nm. Os dados do Rg da região EAL mostrou uma conformação expandida dessa região na mutante KIT em comparação com o tipo nativo.

**Figura 6** – Representação gráfica do Raio de Giro das proteínas ao longo da simulação.

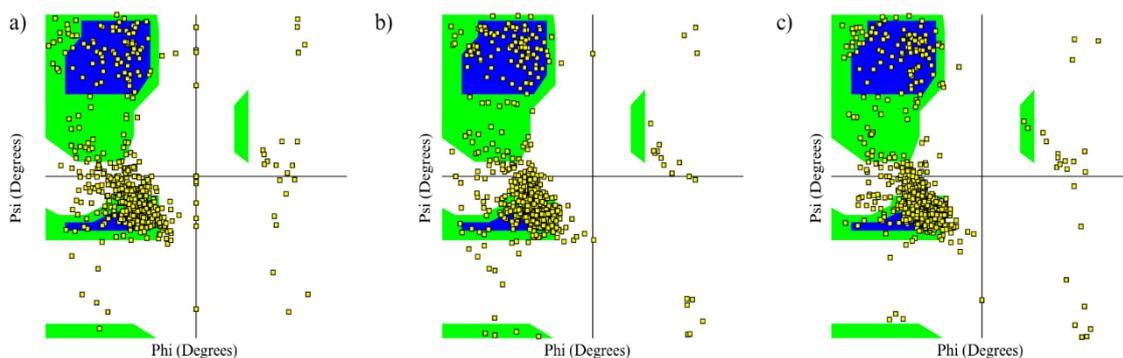


Além disso, para finalizar as análises conformacionais das proteínas estudadas, foi realizado o diagrama de Ramachandran. Esse diagrama abrange os ângulos phi e psi, sendo aspecto teórico crucial para prever o espaço conformacional natural e qualidades de estruturas secundárias da proteína, os ângulos torcionais são formados pelo ângulo Phi e Psi de cada aminoácido (MURALI E SANJEEV, 2022).

Um diagrama de Ramachandran é uma representação gráfica utilizada para visualizar as regiões preferenciais energeticamente favoráveis dos ângulos diedros do esqueleto proteico em relação aos resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da proteína (MODELAGEM COMPARATIVA, 2018). Os aminoácidos foram representados em amarelo, as regiões

favoráveis foram em azul e as regiões permissíveis em verde e as não permissíveis em branco (figura 7). Desse modo, observa-se que a maior parte dos aminoácidos estão localizados em regiões permissíveis e favoráveis e portanto, não existe diferenças significativas entre as estruturas proteicas nativas e mutantes.

**Figura 7** – Diagrama de Ramachandran com a representação das proteínas nativa a), Mutante 1 b) e Mutante 2 c).



## 6 - Conclusão

As proteínas mutantes apresentaram queda de flutuação o que está associada à baixa movimentação durante o tempo de simulação, podendo ser considerado um indicio de enrijecimento e perda de flexibilidade estrutural que por consequência pode ocasionar no comprometimento das funções proteicas de uma proteína de transmembrana como a transportadora GLYT2. Esse trabalho verificou a viabilidade do uso de dinâmica molecular como uma ferramenta de auxílio para estudos em genética molecular com ênfase em mutações, ômicas, seleção e melhoramento genético aplicado à produção animal, uma vez que mutações estão se tornando tendência de estudo em populações animais, bem como as mutações que provocam distonia muscular congênita e também causam musculatura dupla em bovinos Belgian Blue.

## 7 – Referências

AMBAR – hub. 2022. Disponível em: <https://amberhub.chpc.utah.edu/> . Acesso em: 05 jun. 2023.

APRISON, M. H; DALY, E. C. Biochemical aspects of transmission at inhibitory synapses; the role of glycine. **Advances in Neurochemistry**, n. 3, p. 203-295, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8240-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8240-3_5). Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8240-3\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8240-3_5). 06 jun. 2022.

APRISON, M. H. The discovery of the neurotransmitter role of glycine. In Glycine Neurotransmission. *In*: OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. (ed.) **New York: John Wiley and Sons**, p. 1-24, 1990.

ARTHUR, P. Double muscling in cattle: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 8, p. 1493, 1995. DOI: 10.1071/AR9951493. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/cp/ar9951493>. Acesso em: 06 jun. 2022.

**Belgian Blue Group. The solution.** 2023. Disponível em: <https://www.belgianbluegroup.com/?lang=en>. Acesso em: 09 jun.2023.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. The missing term in effective pair potentials. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 6269–6271, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1021/j100308a038>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/j100308a038>. Acesso em: 06 jun. 2022.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 83, p. 157–163, 2012. DOI: 10.7213/estud.biol.7329. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/estudosdebiologia/article/view/22914/22015>. Acesso em: 06 jun. 2022.

CARNEIRO JÚNIOR, J. M. Melhoramento Genético Animal. **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia**, v. 11, p. 197–208, 2009. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/661781>. Acesso em: 06 jun. 2022.

CHARLIER, C. et al. Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. **Nature Genetics**, v. 40, n. 4, p. 449–454, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.96>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.96>. Acesso em: 06 jun. 2022.

CORTES, R.; PALACIOS, J. M. Autoradiographic mapping of glycine receptors by [3H] strychnine binding, In Glycine Neurotransmission. *In*: OTTERSEN, O. P.; STORM-

DALY, E. C. The biochemistry of glycinergic neurons, In Glycine Neurotransmission. *In*: OTTERSEN, O. P.; STORM- MATHISEN, J. (ed) **New York: John Wiley and Sons**. p. 25-66, 1990. Disponível em: <https://eurekamag.com/research/033/727/033727056.php>. 22 jul. 2022.

DAMM, W.; FRONTERA, A.; Tirado–Rives, J.; Jorgensen, W. L. OPLS all-atom force field for carbohydrates. **Journal of Computational Chemistry**. v. 18, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199712\)18:16<1955::AID-JCC1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199712)18:16<1955::AID-JCC1>3.0.CO;2-L).

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-987X%28199712%2918%3A16%3C1955%3A%3AAID-JCC1%3E3.0.CO%3B2-L>. Acesso em: 06 jun. 2022.

DE JUAN-SANZ, J., *et al.* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a new interacting partner for the neuronal glycine transporter GlyT2 that downregulates its expression in vitro and in vivo. **Journal of Neuroscience**. n. 33, p. 14269–14281, 2013.

DISNER, G. R. (2019). **Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil**. *Evidência*, 19(2), 259–274. <https://doi.org/10.18593/eba.v19i2.20964>. Disponível em: <https://periodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/20964>. Acesso em: 05 jun. 2023.

DOSS, C. G et al. **Screening of mutations affecting protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis**. *Applied & translational genomics* n.3, vol. 1, p.37-43. 2012. DOI:10.1016/j.atg.2012.06.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27896051/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

FARIA-PINTO, P. et al., **Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações**. *HU Revista*, Juiz de Fora, v. 41, n. 3 e 4, p. 101-111, jul./dez. 2015. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/09/1808/2482-14380-1-pb.pdf>. Acesso em: 05 jun.2023.

FRANCA, E. F. **Molecular characterization of biopolimers in solution by computational simulation**. 2009. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6117?show=full>. Acesso em: 06 jun. 2022.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation (Computational Science Series)** Academic press, v. 1, 2001.

GOMEZA, J. *et al.* Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. **Neuron**. v. 40, p. 7971–806, 2003. DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00673-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14622583/>. Acesso em: 06 jun. 2022.

HALL, J. C. Review: Glycine. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, n. 6, p. 393–398, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1177/0148607198022006393> . Disponível em: <https://aspenjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1177/0148607198022006393>. Acesso em: 06 jun. 2022.

HUMPHREY, W. DALKE, A. E SCHULTEN, K. **VMD - Visual Molecular Dynamics**. Journal of Molecular Graphics. vol. 14, p. 33-38. 1996. Disponível em: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Acesso em: 02 jun. 2023.

HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, v. 22, n. 2, p. 283–294, 1978. DOI: 10.1016/S0006-3495(78)85489-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/656545/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

KIRCHMAIR, J., MARKT, P., DISTINTO, S. *et al.* **Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—What can we learn from earlier mistakes?**. The Journal of Computer-Aided Molecular Design. n.22, p. 213–228. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9163-6> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10822-007-9163-6>. Acesso em: 29 jun. 2023.

KOURY FILHO, W. **Mitos e realidade sobre consangüinidade ou endogamia**. Revista ABCZ, vol. 2, n.10, 2002. Disponível em: <https://www.brasilcomz.com/assets/uploads/downloads/mitos-e-realidade-sobre-consanguinidade-ou-endogamia-william-koury-filho-2002-ftcu.pdf>. Acesso em: 27 de Jun. 2023.

LANIADO, M. E.; ABEL P. D.; LALANI, E. N. Ion channels: New explanations for old diseases. **British Medical Journal**. v. 315, p. 1171-1172, 1997. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A20033314/AONE?u=googlescholar&sid=googleScholar&xid=f778b773>. Acesso em: 20 jul. 2022.

LI, S. C.; DEBER, C. M. **Glycine and  $\beta$ -branched residues support and modulate peptide helicity in membrane environments**. **FEBS Letters**, v. 311, n. 3, p. 217–220, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81106-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81106-V). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001457939281106V>. Acesso em: 22 jul. 2022.

LOBANOV, M.Y., BOGATYREVA, N.S. & GALZITSKAYA, O.V. **Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness**. *Molecular Biology*. vol. 42, p. 623–628. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893308040195>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026893308040195#citeas>. Acesso em: 29 jun. 2023

MAO, Z.; DAVIS, R. L. **Eight different types of dopaminergic neurons innervate the Drosophila mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity**. **Frontiers in neural circuits**. v. 3, 2009. DOI: 10.3389/neuro.04.005.2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19597562/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MATHISEN, J. (ed) **New York: John Wiley and Sons**, p. 240- 263, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(85\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0361-9230(85)90038-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0361923085900383>. Acesso em: 20 jul. 2022

**Modelagem comparativa - Aula pratica.** UFMG. 2018. Disponível em: [http://www.biodados.icb.ufmg.br/pinguim/stuff/Tutorial\\_Modelagem.pdf](http://www.biodados.icb.ufmg.br/pinguim/stuff/Tutorial_Modelagem.pdf). Acesso em: 29 jun. 2023

NIETO, L. M. et al. **Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte.** *In:* Critérios de seleção. p. 109–122, 2013. Disponível em: [https://cloud.cnpgc.embrapa.br/geneplus30/files/2018/07/Cap10\\_Criterios\\_Sele%C3%A7%C3%A3o.pdf](https://cloud.cnpgc.embrapa.br/geneplus30/files/2018/07/Cap10_Criterios_Sele%C3%A7%C3%A3o.pdf). Acesso em: 22 jul. 2022.

MURALI, A. SANJEEV, K. **Capítulo 28 - Envisaging the conformational space of proteins by coupling machine learning and molecular dynamics.** *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods.* Academic Press. p.467-475. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90264-9.00028-3>. Acesso em: 05 jun. 2023.

RITURAJ PUROHIT. **Role of ELA region in auto-activation of mutant KIT receptor: a molecular dynamics simulation insight.** *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* vol.32 n.7, p. 1033-1046. 2014. DOI: 10.1080/07391102.2013.803264. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/07391102.2013.803264?scroll=top&needAccess=true&role=tab>. Acesso em: 29 jun. 2023.

ROSA, A. N. *et al.* Melhoramento genético aplicado em gado de corte. (ed) **Programa Geneplus-Embrapa.** Brasília. Embrapa, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/980414/melhoramento-genetico-aplicado-em-gado-de-corte-programa-geneplus-embrapa>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MENEZES, G. R. O. *et al.* Genômica Aplicada ao Melhoramento Genético de Gado de Corte. **Melhoramento Genético Aplicado em Gado de Corte**, p. 214–225, 2013. Disponível em: [https://cloud.cnpgc.embrapa.br/geneplus30/files/2018/07/Cap17\\_GenomicaAplicada.pdf](https://cloud.cnpgc.embrapa.br/geneplus30/files/2018/07/Cap17_GenomicaAplicada.pdf). Acesso em: 22 jul. 2022.

PAULUSSI, K. S.; NOGUEIRA, G. DE P.; QUEIROZ, L. H. **Viabilidade do nascimento de bezerros da raça nelore com mutação no gene da miostatina obtidos por congénia.** p. 70, 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vtt-216933>. 22 jul. 2022.

PERDIGÃO, A. ROQUETE, C. **Análise produtiva da utilização de touros BBB e Charoleses**

**em vacadas comerciais.** Revista de Ciências Agrárias, vol. 30, n.1, p. 190-197, 2007. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/15394> Acesso em: 22 jul. 2022.

PÉREZ-SILES, G.; MORREALE, A. *et al.* Molecular Basis of the Differential Interaction with Lithium of glycine Transporters GLYT1 and GLYT2. **Journal of Neurochemistry.** v. 118, n. 2, p. 195–204, 2011. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07309.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21574997/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

POURCHO, R. G. AND GOEBEL, D. J. **Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine containing neurons in the retina.** In Glycine Neurotransmission. *In:* OTTERSE, O. P; STORM-MATHISEN, J. (ed) New York: John Wiley and Sons. p. 355- 389, 1990.

REES, M. I. *et al.* **Mutations in the human GlyT2 gene define a presynaptic component of human startle disease.** Nature Genetics. v. 38, p. 801–806, 2006. DOI: 10.1038/ng1814. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204411/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

RIBEIRO, M. C. M. Genética Molecular/ Maria Cecília Menks Ribeiro. 1. 2. ed. **reimp.Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC,** 2014. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Gen%C3%A9tica-Molecular.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2022.

ROBERT J, H.; MAYA, T.; KIRSTEN, H.; MARK, I. R. **The genetics of hyperekplexia: more than startle!.** Cell press. v. 24, n. 9, p. 439–447, 2008. DOI: 10.1016/j.tig.2008.06.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18707791/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

ROSA, A. N. *et al.* Melhoria genética aplicado em gado de corte. (ed) **Programa Geneplus-Embrapa.** Brasília. Embrapa, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/980414/melhoramento-genetico-aplicado-em-gado-de-corte-programa-geneplus-embrapa>. Acesso em: 22 jul. 2022.

SCHMIDT, M. W. *et al.* General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry,** v. 14, n. 11, p. 1347–1363, 1993. DOI:

<https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.540141112>. Acesso em: 22 jul. 2022.

SERRANO, L. *et al.* Effect of alanine versus glycine  $\alpha$  – helices on protein stability. **Nature**. n. 356, p. 453-455, 1992. DOI: 10.1038/356453a0 Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1557131/>. Acesso em: 22 de jun. 2022.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**. v. 19, p. 1-32, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00894-012-1667-x#citeas>. Acesso em: 22 jul. 2022.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.20291>. Acesso em: 21 jun. 2022.

WANG, K. H.; PENMATSA, A.; GOUAUX, E. Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. **Nature**. v. 521, n. 7552, p.322-7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14431>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature14431>. Acesso em: 22 jul. 2022.

WENTHOLD, R. J.; AND HUNTER, C. **Immunocytochemistry of glycine and glycine receptors in the central auditory system**. In Glycine Neurotransmission, *In*: OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. (ed) New York: John Wiley and Sons. p. 391-415, 1990. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/43853427>. Acesso em: 22 jul. 2022.

WERMAN, R.; DAVIDOFF, R. A.; APRISON, M. H. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. **Nature**. n. 214, p. 681-683, 1967. DOI: 10.1038/214681a0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4292803/>. Acesso em: 22 jul. 2022.