

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO**

**POLIMORFISMOS EM GENES QUE INFLUENCIAM  
CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE ECONÔMICO EM OVINOS**

Catherine Cecilia Walker Rossato

CAMPO GRANDE, MS

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**POLIMORFISMOS EM GENES QUE INFLUENCIAM**  
**CARACTERÍSTICAS DE INTERESSE ECONÔMICO EM OVINOS**

Catherine Cecilia Walker Rossato

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria da Graça Morais

Coorientadora: Dra. Andréa Alves do Egito

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato  
grosso do Sul, como requisito à obtenção do  
título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2020

Certificado de aprovação

Catherine Cecilia Walker

Polimorfismos em genes que influenciam características  
de interesse econômico em ovinos

Polymorphisms in genes that influence traits  
of economic interest in sheep

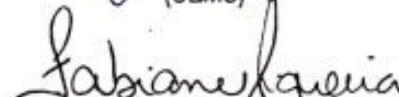
Tese apresentada à  
Universidade Federal de Mato Grosso  
do Sul, como requisito à obtenção do  
título de Doutora em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 11-02-2020

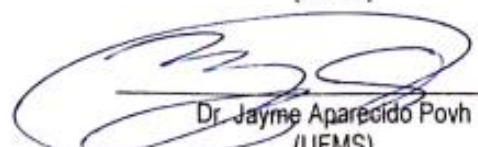
BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria da Graça Morais  
Orientadora (UFMS)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. André Luiz Julien Ferraz  
(UEMS)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Fabiane Siqueira  
(EMBRAPA)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Henrique Jorge Fernandes  
(UEMS)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jayme Aparecido Povh  
(UFMS)

*A Deus, nosso Pai, acima de tudo. Aos meus amados pais **João** e **Rosemeire** e a minha querida irmã **Ingrid**; aos meus queridos avós: **Oldemar** e **Cilésia**, **Moacir** (in memorian) e **Meire**; e ao meu amado esposo **Caio**.*

*Com amor e carinho, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de todas as coisas.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Morais, exemplo de retidão e dedicação profissional, meus sinceros agradecimentos pela orientação, motivação, confiança e financiamento do projeto de pesquisa.

À minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Andrea Alves do Egito, pela sua fundamental participação em minha orientação, pela confiança depositada e aos ensinamentos transferidos durante todos os anos de trabalho em laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pela oportunidade oferecida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMS, pelos conhecimentos ministrados durante o curso.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos ao decorrer do projeto de pesquisa.

À EMBRAPA Gado de Corte, pela infraestrutura laboratorial e financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Dr. Gelson Luís Dias Feijó pelas contribuições na realização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas sugestões para o aperfeiçoamento desta tese.

Aos colegas de mestrado e doutorado, pelos laços de amizade firmados durante o período do curso e pela contribuição em várias etapas. Em especial, a Thalles Policarpo Carvalho de Lima, Francielle da Silva Oliveira, Isabella Blecha, Thiago Gonsalo e Arianna Urquiza, companheiros de laboratório e de momentos especiais.

Às colegas Mayara Mitiko Yoshihara Carneiro, Andréa Roberto Duarte Lopes Souza, Natália da Silva Heimbach, Pâmila Carolini Gonçalves da Silva e Bruna Biava, colaboradoras na realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos. À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e Embrapa Gado de Corte pelas oportunidades e pela infraestrutura cedida.

A todos que contribuíram de alguma forma para o êxito do trabalho.

*“Toda ascensão exige esforço, adaptação  
e sacrifício. Toda queda resulta em  
prejuízo, desencanto e recomeço.  
Trabalha-te interiormente, vencendo  
limite e obstáculo, não considerando os  
terrenos vencidos, porém, fitando as  
paisagens ainda a percorrer.”*

*Joanna de Ângelis*

## Resumo

ROSSATO, C. C. W. **Polimorfismos em genes que influenciam características de interesse econômico em ovinos.** 2020. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Observa-se nos últimos anos grandes esforços da pesquisa para incorporar informações moleculares aos programas de melhoramento genético e acelerar o progresso de várias espécies. A utilização de ferramentas moleculares associadas ao melhoramento genético pode garantir novos avanços qualitativos e quantitativos, a médio e longo prazo no rebanho ovino brasileiro. Esta tese tem como objetivo analisar marcadores moleculares do tipo “SNP” (*Single Nucleotide Polymorphism*) localizados em genes selecionados por sua relação com características de desempenho, carcaça, qualidade de carne, perfil lipídico e adaptabilidade em ovinos, visando obter informações úteis para implementação em programas de melhoramento genético. Para tanto, foram realizados estudos de associação entre os polimorfismos e os fenótipos relacionados à carcaça, qualidade de carne, rendimento de cortes, composição de ácidos graxos da carne e características de crescimento. Em dois estudos foram genotipados 151 animais para 30 SNPs, utilizando-se a técnica de *SNaPshot*®. No primeiro estudo, os polimorfismos *ACACA\_1* (rs420069625), *CAPN\_1* e 2 (rs428593688 e rs160945890), *CAST\_3* (rs421224227), *CTSB\_1* (rs161888250), *DGATI\_1* (rs410015353), *EDGI\_2* (rs159669780), *UCP2\_1* (rs160723758), *MC1R\_1* (rs409651063) apresentaram associação significativa com as características de carcaça e rendimento de cortes. Por sua vez, o segundo estudo avaliou a associação entre os polimorfismos e os dados de composição lipídica da carne, onde encontrou-se que os SNPs *ACACA\_1* (rs420069625), *DGATI\_1* (rs410015353), *GHR\_1* (rs161146164), *FASN\_1* (rs161102729) estavam relacionados com a variação do perfil de lipídios no lombo e no pernil de ovinos. O terceiro estudo foi dedicado às características de crescimento, utilizando-se dados fenotípicos de 236 ovinos. Os animais foram genotipados para 15 SNPs, utilizando-se a técnica de *SNaPshot*®. Os genótipos dos polimorfismos *ATPIAI\_1* (rs599122362), *GDF8\_1* (rs119102826), *GHRL\_1* (rs428757090) e *LEP\_1* (rs424488761) influenciaram o peso e ganho médio diário de ovinos. Estes dados têm o potencial de colaborar no melhoramento genético de ovinos de corte, porém, como as associações dos polimorfismos podem variar entre populações/raças, esses achados precisam ser confirmados em outros estudos utilizando populações independentes.

**Palavras-chave:** SNP, qualidade de carne, características de carcaça, perfil lipídico, crescimento, cordeiros.

## *Abstract*

ROSSATO, C. C. W. *Polymorphisms in genes that influence traits of economic interest in sheep*. 2020. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Great research efforts have been observed in recent years to incorporate molecular information into genetic improvement programs and accelerate the progress of several species. The use of molecular tools associated with genetic improvement can guarantee new qualitative and quantitative advances, in the medium and long term, in the Brazilian sheep herd. This thesis aims to analyze molecular markers of the “SNP” type (Single Nucleotide Polymorphism) located in genes select for their relation with traits such as performance, carcass, meat quality, lipid profile and adaptability in sheep, in order to obtain useful information for implementation in genetic improvement programs. Therefore, studies of association were carried out between polymorphisms and the phenotypes related to carcass, meat quality, cut yields, fatty acid composition of the meat and growth traits. In two studies, 151 animals were genotyped for 30 SNPs, using the SNaPshot® technique. In the first study, the polymorphisms *ACACA\_1* (rs420069625), *CAPN\_1* (rs428593688), *CAPN\_2* (rs160945890), *CAST\_3* (rs421224227), *CTSB\_1* (rs161888250), *DGATI\_1* (rs410015353), *EDGI\_2* (rs159669780), *UCP2\_1* (rs160723758), *MC1R\_1* (rs409651063) showed significant association with carcass and cut yields traits. However, the second study evaluated the association between the polymorphisms and the data of lipid composition of the meat, where it was found that the SNPs *ACACA\_1* (rs420069625), *DGATI\_1* (rs410015353), *GHR\_1* (rs161146164), *FASN\_1* (rs161102729) were related to the variation of the lipid profile from the loin and leg of the sheep. The third study was dedicated to the growth traits, using phenotypic data of 236 sheep. The animals were genotyped for 15 SNPs, using the SNaPshot® technique. The genotypes of the polymorphisms *ATPIAI\_1* (rs599122362), *GDF8\_1* (rs119102826), *GHRL\_1* (rs428757090) e *LEP\_1* (rs424488761) influenced the weight and average daily gain of sheep. These data have the potential to contribute to the genetic improvement of beef sheep, however, as the associations of polymorphisms may vary between populations/breeds, these findings need to be confirmed in other studies using independent populations.

**Keywords:** SNP, meat quality, carcass traits, lipid profile, growth, lambs.



## Lista de tabelas

### INTRODUÇÃO

- Tabela 1.** Localização cromossômica, funções biológicas e associações encontradas em genes candidatos relacionados a desempenho animal, características de carcaça, qualidade de carne, composição de ácidos graxos e adaptabilidade em bovinos e ovinos. 24

### ARTIGO 1

#### **POLIMORFISMOS NOS GENES *ACACA*, *CAPN*, *CAST*, *CTSB*, *DGATI*, *EDGI*, *GHRL*, *MC1R* e *UCP2* ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM OVINOS**

- Tabela 1.** Número de observações para cada avaliação realizada, média, desvio padrão e coeficiente de variação das características de carcaça e qualidade de carne avaliadas em ovinos cruzados. .... 63
- Tabela 2.** Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos cruzados. .... 64
- Tabela 3.** Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e P-value dos SNPs que apresentaram associações significativas com características de carcaça e qualidade de carne em ovinos cruzados. .... 65

### ARTIGO 2

#### **POLIMORFISMOS NOS GENES *ACACA*, *DGATI*, *FASN* e *GHR* AFETAM A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE DE OVINOS**

- Tabela 1.** Número de observações para cada ácido graxo avaliado, média das concentrações dos ácidos graxos medidos nos músculos *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* e *Semimembranosus* e seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação. .... 89
- Tabela 2.** Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos cruzados. .... 90
- Tabela 3.** Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e P-value dos SNPs que apresentaram associações significativas com a composição de ácidos graxos nos músculos *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* e *Semimembranosus* em ovinos cruzados. .... 91
- Tabela 4.** Coeficientes de correlação de Pearson realizado entre os ácidos graxos que apresentaram associados significativamente aos polimorfismos e características avaliadas na carcaça de ovinos cruzados. 92

### ARTIGO 3

#### **ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *ATPIA1*, *GDF8*, *GHRL* e *LEP* COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM OVINOS**

- Tabela 1.** Número de observações, média e seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação de características de crescimento em ovinos. .... 110

<b>Tabela 2.</b>	Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos. ....	111
<b>Tabela 3.</b>	Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e P-value dos SNPs que apresentaram associações significativas com as características de crescimento em ovinos.....	112

## APÊNDICES

<b>Tabela 1.</b>	Nome, localização cromossômica, identificação de depósito do polimorfismo detectado e as sequências dos <i>primers</i> de base única, orientação, tamanho e concentração utilizados no <i>mix 1</i> para os ensaios <i>SNaPshot</i> ®. ....	114
<b>Tabela 2.</b>	Nome, localização cromossômica, identificação de depósito do polimorfismo detectado e as sequências dos <i>primers</i> de base única, orientação, tamanho e concentração utilizados no <i>mix 2</i> para os ensaios <i>SNaPshot</i> ®. ....	114

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1. Revisão de Literatura.....	13
1.1. A ovinocultura de corte no Brasil.....	13
1.2. Desafios na produção de ovinos.....	14
1.3. Marcadores moleculares.....	15
1.4. Polimorfismo de nucleotídeo único e métodos de detecção.....	17
1.5. <i>SNaPshot</i> ®.....	18
1.6. Polimorfismos de DNA localizados em genes de interesse econômico.....	20
2. REFERÊNCIAS.....	28
<b>ARTIGO 1</b>	
<b>POLIMORFISMOS NOS GENES <i>ACACA</i>, <i>CAPN</i>, <i>CAST</i>, <i>DGATI</i>, <i>CTSB</i>, <i>EDG1</i>, <i>GHRL</i>, <i>MC1R</i> e <i>UCP2</i> ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM OVINOS</b> .....	37
1. Introdução.....	39
2. Material e Métodos.....	40
3. Resultados.....	45
4. Discussão.....	47
5. Conclusão.....	56
6. Referências.....	57
<b>ARTIGO 2</b>	
<b>POLIMORFISMOS NOS GENES <i>ACACA</i>, <i>DGATI</i>, <i>FASN</i> e <i>GHR</i> AFETAM A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE DE OVINOS</b> .....	66
1. Introdução.....	68
2. Material e Métodos.....	69
3. Resultados.....	75
4. Discussão.....	75
5. Conclusão.....	83
6. Referências.....	84
<b>ARTIGO 3</b>	
<b>ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES <i>ATPIA1</i>, <i>GDF8</i>, <i>GHRL</i> e <i>LEP</i> COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM OVINOS</b> .....	93
1. Introdução.....	95
2. Material e Métodos.....	96
3. Resultados.....	99
4. Discussão.....	100
5. Conclusão.....	105
6. Referências.....	106
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	113
<b>APÊNDICE</b> .....	114

## INTRODUÇÃO

Até o ano de 2050, o setor agropecuário possui o desafio de aumentar sua produção em 60% para alimentar a população mundial (FAO, 2014). Neste cenário, o consumo de carne, como fonte estratégica de proteína na dieta humana, deverá crescer substancialmente. Observando demanda de proteínas projetada para os próximos anos, o consumo de carne ovina possui potencial para crescer disputando espaço com as outras fontes.

Tendo em vista as oportunidades vislumbradas com o aumento da população nos próximos anos, a pesquisa e inovação desempenhará um papel fundamental no aumento da produtividade no setor agropecuário. Dessa forma, é possível inferir que a produção de ovinos enfrentará dois principais desafios: 1) aumentar a produção e a eficiência, visando a diferenciação e o valor agregado do produto oferecido; 2) aumentar a velocidade da adoção de tecnologias, a fim de consolidar-se no mercado com sucesso (MONTOSI et al., 2013).

Neste contexto, a ovinocultura de corte brasileira, ainda necessita estabelecer-se para ser mais rentável e competitiva frente aos outros setores e mercados (DECKER et al., 2016). Para a promoção do crescimento e desenvolvimento desta atividade, ações referentes ao manejo sanitário, nutricional e reprodutivo são fundamentais. Por outro lado, a melhoria dos genótipos é um dos fatores que mais merece atenção. O melhoramento genético de características produtivas traz mudanças cumulativas e eficazes, pois uma vez atendidos todos os requisitos de manejo, o que trará incremento para a produtividade é utilização de genótipos eficientes (LÔBO & LÔBO, 2007).

Aliado a isto, observa-se nos últimos anos grandes esforços da pesquisa concentrando-se em maneiras de incorporar informações moleculares para acelerar o progresso dos programas de melhoramento genético em várias espécies (MONTOSI et al., 2013). Com a evolução das ferramentas moleculares e a associação de marcadores com as características fenotípicas de interesse econômico, existem vários estudos com genes e regiões cromossômicas relacionadas ao desempenho animal, qualidade e propriedades nutricionais da carne, no sentido de uma melhor compreensão a respeito de seus efeitos na variabilidade existente entre os animais.

Diante do exposto, para que o país aumente a sua competitividade no setor da ovinocultura, é de grande valia que novas tecnologias sejam incorporadas aos futuros

programas de melhoramento a fim de produzir conhecimentos que irão garantir novos avanços qualitativos e quantitativos em médio e longo prazo no rebanho brasileiro.

Diante do exposto, esta tese tem como objetivo analisar marcadores moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) localizados em genes candidatos selecionados por sua relação com características de desempenho, carcaça, qualidade de carne, perfil lipídico e adaptabilidade em ovinos de corte.

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. A ovinocultura de corte no Brasil**

O Brasil possui aproximadamente um rebanho de 17,98 milhões cabeças de ovinos, sendo que a região Nordeste concentra 64,2% do efetivo nacional, seguida da região Sul com 23,7% (IBGE, 2018). Nos últimos anos, observou-se um crescimento dos rebanhos brasileiros, o que pode ser explicado pelo menos em parte, pelo aumento da demanda interna por carne ovina (COSTA et al., 2019).

Apesar de algumas mudanças observadas, a produtividade da ovinocultura de corte nacional ainda demonstra baixos índices. Os principais obstáculos observados são: sistemas de alimentação deficientes, baixa qualidade genética dos rebanhos, problemas sanitários e manejo reprodutivo deficiente (LÔBO & LÔBO, 2007).

No tocante a genética, diversas raças e tipos de ovinos vêm sendo introduzidos no Brasil com a intenção de promover o melhoramento da eficiência de produção (LÔBO et al., 2011). Entretanto, a ausência de ações integradas e o desenvolvimento de políticas sustentáveis não permitiram o alcance dos objetivos almejados. Assim, as muitas importações que ocorreram na tentativa de melhorar o desempenho das populações brasileiras, originaram os grupos genéticos que hoje encontramos no país: exóticos, naturalizados e mestiços, oriundo dos cruzamentos entre os dois primeiros, constituído por animais com composição genética conhecida e animais de composição genética desconhecida, chamadas Sem Raça Definida (SRD) (LÔBO et al., 2011).

Com o intuito de promover o melhoramento genético ovino no Brasil alguns programas de melhoramento como o executado pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO) em parceria com a Embrapa Pecuária Sul e o Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (Genecoc) da Embrapa Ovinos e Caprinos, colaboram com os criadores de ovinos interessados em melhorar a qualidade e a produtividade de seus animais, mas estes programas ainda tem alcance regional.

Como consequência dos gargalos tecnológicos e da falta de organização da cadeia produtiva, verifica-se a ausência de regularidade na oferta dos produtos, bem como abates tardios, que comprometem a qualidade das carcaças e limitam o acesso aos principais canais de comercialização, como frigoríficos e os supermercados (LÔBO & LÔBO, 2007; DECKER et al., 2016). Com isso, grande parte do mercado é suprida pela importação de carne, principalmente de países do Mercosul.

De acordo com pesquisa elaborada pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos, o consumo de carne ovina pelos brasileiros é de 0,4 kg/per capita/ano, frente a um consumo mundial de 2,5 kg/per capita/ano (ARCO, 2018). Embora seja observado um baixo consumo, o que é produzido pelo país é insuficiente para atender o mercado interno, e assim, cerca de 7000t/ano de carne *in natura* são importadas do Uruguai (DECKER et al., 2016). As importações são na maioria de cortes com osso, congelados e resfriados, além de cortes desossados. A entrada dessa carne é beneficiada pela valorização cambial, o que propicia ao país importar carne ovina a preços mais competitivos, além de obter menores custos de logística do que os produtos locais (VIANA, 2008).

## **1.2. Desafios na produção de ovinos**

No cenário mundial, a ovinocultura apresenta realidades muito contrastantes quanto às formas de produção e ao padrão de consumo. Países como Austrália e Nova Zelândia são reconhecidos por desenvolverem sistemas de produção de alta produtividade. Suas criações, embora sejam predominantemente baseadas em sistemas extensivos são bastante tecnificadas, sendo dedicadas a produção de carne e lã, o que leva esses países a controlar o mercado internacional desses produtos (VIANA, 2008).

A produção de ovinos na Europa e na América do Sul também está bem estruturada, com criações em confinamento e sob pastagens naturais (RODRÍGUEZ-ORTEGA, et al., 2018; MONTOSI, 2018). Na Europa destacam-se os rebanhos produtores de carne e leite, destinados à fabricação de queijos especiais e diferentes cortes cárneos; e, os países da América do Sul, como Chile, Argentina e Uruguai, possuem um rebanho numeroso, produzindo lã e carne de qualidade para o mercado internacional (VIANA, 2008; MORRIS et al., 2017). Em contraste, nas regiões áridas da Ásia, África e Oriente Médio, os ovinos são produzidos para fins variados (lã, carne, pele, gordura e leite), sendo também a base da subsistência para os criadores de pequeno porte (FERGUSON et al., 2017).

Apesar das discrepâncias entre as cadeias produtivas da carne ovina mundiais, existem muitos desafios em comum, envolvendo principalmente o aumento da eficiência e rentabilidade nas propriedades, melhorias na qualidade e no posicionamento deste produto no mercado. Do lado do consumidor, há uma preocupação crescente com

a sustentabilidade das produções, bem-estar animal, mas também com a qualidade e propriedades nutricionais da carne (MONTOSI et al., 2013). Dentre as iniciativas que podem colaborar na adequação dos sistemas de produção em busca da competitividade da ovinocultura, pode-se destacar o melhoramento genético associado à tecnologias como dos marcadores moleculares. A informação molecular agrega informações adicionais ao melhoramento tradicional, permitindo uma seleção mais precisa e/ ou mais rápida, com potencial para reduzir os intervalos entre gerações e aumentar o ganho genético (DEKKERS & HOSPITAL, 2002).

No Uruguai, por exemplo, há cerca de uma década existe um programa de melhoramento, incluindo informações moleculares voltadas à resistência genética a parasitas gastrointestinais em raças Corriedale e Merino (CIAPPESONI et al., 2011). Esta ferramenta foi adotada para ajudar a desvendar a grande variação genética existente na resistência a doenças, seja entre raças ou entre os animais e, conta ainda, com registro de protocolos sanitários e coleta de dados para colaborar no aumento de sua confiabilidade (MONTOSI et al., 2013). Neste mesmo país, um segundo projeto dedica-se ao estudo de associação de SNPs com caracteres de qualidade de carne e carcaça em ovinos (CIAPPESONI et al., 2011). Na Austrália e Nova Zelândia as informações moleculares incluídas em programas de melhoramento estão relacionadas com a prolificidade e resistência a doenças (DODDS et al., 2007; RUPP et al., 2016).

Além do mais, existem outras ferramentas disponíveis para aplicação de marcadores moleculares em programas de melhoramento de ovinos e que podem colaborar para o crescimento e consolidação da atividade. No Brasil, a certificação de pedigrees usando marcadores já é uma ação implementada pelo Ministério da Agricultura (MAPA). No entanto, pode-se destacar também a possibilidade da certificação de raças como uma estratégia para monitorar cruzamentos em registros genealógicos de raças; e, o rastreamento de produtos cárneos, como forma de selecionar características desejáveis, por exemplo, qualidade da carne, identificadas ao nível do produto final (McMANUS et al., 2010).

### **1.3. Marcadores moleculares**

Marcador molecular é um termo usado para se referir a uma variação específica na sequência de DNA entre indivíduos e que pode estar associada a certas



características fenotípicas (SINGH et al., 2014). Essas variações incluem inserções, exclusões, translocações e mutações pontuais.

Os marcadores baseados na detecção de mutações pontuais do tipo *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) e *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) e aqueles baseados na detecção de variações de repetições na sequência de DNA (microsatélites) foram os primeiros e mais utilizados marcadores de DNA nas décadas de 80 e 90 (SINGH et al., 2014).

Ainda nos anos 80, estas técnicas foram impulsionadas, com o desenvolvimento da técnica da reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), pois foi possível amplificar fragmentos específicos de DNA, aperfeiçoando e potencializando suas utilizações (MONTALDO & MEZA-HERRERA, 1998). Alguns destes marcadores são usados até hoje para estudos genéticos, por apresentarem metodologias de custo baixo e serem facilmente aplicados em laboratório (GUIMARÃES et al., 2009). Os microsatélites, por exemplo, foram rapidamente implementados em várias espécies e são utilizados ainda hoje na construção de mapas genéticos, nos testes de paternidade, nos estudos de diversidade, na conservação e no melhoramento assistido (GIUSTI et al., 2016).

É válido ressaltar que as tecnologias que envolvem os marcadores moleculares são muito dinâmicas e se aprimoram ano após ano, beneficiando-se cada vez mais do volume de novas informações de sequências de DNA disponíveis. Grande parte desses avanços foram possíveis graças a “popularização” do sequenciamento de DNA, que influenciou muito na descoberta de vários marcadores funcionais e na identificação de novos polimorfismos (GUIMARÃES et al., 2009).

O método de sequenciamento de Sanger foi um dos precursores na corrida para desvendar o material genético dos seres vivos. Na época em que foi criada, esta técnica era feita de forma rudimentar, onde, a sequência de bases do DNA era lida manualmente após a exposição das bases identificadas em um filme de raio-X (GIUSTI et al., 2016).

Posteriormente, foram desenvolvidos sequenciadores automáticos que, baseados ainda na técnica de Sanger, utilizam dideoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados por corantes fluorescentes distintos para a determinação da sequência dos fragmentos de DNA (GIUSTI et al., 2016). A informação gerada é então enviada ao computador e processada por *softwares* específicos para que, ao final da corrida eletroforética no

equipamento, os dados possam ser utilizados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta), e assim analisados.

Os dados gerados pelo sequenciamento de DNA revelaram o enorme número de variações existentes entre as sequências de indivíduos de uma mesma espécie (REGITANO & VENERONI, 2009). A presença abundante de um tipo de marcador, caracterizado pela mutação de uma única base nucleotídica nos genomas, foi determinante para que os chamados Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) se tornassem marcadores mais informativos e passassem a ser altamente explorado desde então (CAETANO, 2009).

#### **1.4. Polimorfismo de nucleotídeo único e métodos de detecção**

Os comuns de todos os marcadores são os Polimorfismos de Nucleotídeo Único, amplamente conhecidos pelo acrônimo “SNPs”, utilizados para definir as variações observadas na sequência de DNA (McINNES et al., 2016).

Os SNPs são responsáveis por cerca de 90% de todas as diferenças entre os indivíduos, sendo o recurso de variação genética para estudos populacionais e mapeamento do genoma mais utilizado na atualidade (FROHLICH et al. 2004). Além disso, estes polimorfismos são herdados de forma mais estável do que outros marcadores de DNA, tornando-os mais adequados como marcadores de seleção de longo prazo (KOOPEE & KOSHKOIYEH, 2014).

Um SNP ocorre quando um único nucleotídeo – A, T, C, ou G – é trocado por outro, resultando em diferenças no genoma entre indivíduos (JIANG, 2013). As mutações mais comuns são as transições, neste caso ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A/G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C/T); menos frequentes são as transversões, que ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C ou T/A ou G) (CAETANO, 2009). Os loci caracterizados pelos SNPs são bialélicos, ou seja, tem apenas dois alelos que correspondem a duas bases diferentes que ocupam uma localização específica no genoma (McINNES et al., 2016).

Estas modificações pontuais nas sequências de DNA podem ser encontradas tanto nas regiões do genoma que codificam proteínas (éxons) quanto nas não codificantes (íntrons) (ZHANG & HEWITT, et al., 2003). Parte destes polimorfismos

não altera a sequência de aminoácidos da proteína codificada, e assim, são denominados “sinônimos ou silenciosos”. Por algum tempo, assumiu-se de forma profusa que estes polimorfismos não exerciam nenhum efeito distinguível na função gênica ou no fenótipo do indivíduo com a mutação (SANTOS, 2008). Entretanto, alguns estudos sugerem que mutações sinônimas podem alterar a molécula de RNA e afetar sua estabilidade, o que resultaria em alteração ou redução da expressão e função das proteínas, podendo assim, influenciar diretamente os traços fenotípicos de um indivíduo (SAUNA et al., 2007).

Outro tipo de polimorfismo de base única – chamados de “não sinônimos” – podem alterar a sequência de aminoácidos, introduzir ou modificar um códon de parada, ou ainda, mudar um sítio de *splicing*, dependendo da localização que ocorrem no gene (McINNES et al., 2016). Portanto, estes SNPs podem refletir em diferenças funcionais significativas entre os indivíduos.

Em virtude das características supracitadas, os marcadores SNPs tem uma utilização muito variada, sendo, frequentemente, aplicados em estudos de associação e mapeamento genético, assim como em ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade, rastreabilidade, detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção (GIUSTI et al., 2016).

Por algum tempo, os métodos para análise dos marcadores SNP eram baseados tanto em PCR-RFLP, quanto no método de sequenciamento Sanger. Apesar da grande eficiência na detecção de SNPs essas metodologias, se comparadas com as metodologias atuais, são relativamente laboriosas e custosas. Com o desenvolvimento de novas técnicas, houve uma mudança substancial nesse cenário, tornando as análises mais acessíveis e mais rápidas, observando-se cada vez mais o avanço de chips de genotipagem de baixa, média e alta densidade, hibridização e PCR alelo-específico, ensaios Taqman, análises por pirosequenciamento e minisequenciamento, entre outros (KOOPEE & KOSHKOIYEH, 2014; ARAÚJO & CAETANO, 2016).

### **1.5. *SNaPshot*®**

Dentre as várias tecnologias para genotipagem de SNPs, está o kit comercial de reagentes Multiplex *SNaPshot*® (*Applied Biosystems*), um ensaio de extensão de

*primers* de base única (SBE - *Single Base Extension*), também conhecido como minisequenciamento (MEHTA et al., 2017). Esta metodologia permite a realização simultânea de múltiplas reações de extensão com *primers* SBE, para a análise de diferentes SNPs, sendo que o protocolo do fabricante recomenda a utilização de no máximo 10 *primers* por reação (ALVES et al., 2007). No entanto, com uma boa padronização, foi relatado o desenvolvimento de ensaios otimizados para a detecção de até 20 SNPs (MEHTA et al., 2017).

A metodologia consiste primeiramente, na amplificação por PCR multiplex das regiões contendo os SNPs de interesse e, em seguida, o produto de PCR é submetido a uma reação de *SNaPshot*®. Nesta reação são adicionados *primers* não marcados desenhados para emparelhar na extremidade 3' na base imediatamente justaposta ao local do SNP. Dessa forma, durante os ciclos de extensão, um único dideoxynucleotídeo (ddNTP), complementar ao SNP e marcado com fluorescência, é incorporado pela polimerase (ARGAC et al., 2009).

Os ddNTPs são similares aos nucleotídeos comuns, mas com uma diferença importante: não há um grupo hidroxila na posição 3' do carbono da pentose. Em um nucleotídeo comum, o grupo 3' hidroxila atua como um "gancho", permitindo que um novo nucleotídeo seja adicionado à cadeia existente (AVISSAR et al., 2018). Uma vez que um ddNTP é adicionado à sequência, não há hidroxila disponível e nenhum outro nucleotídeo pode ser adicionado. A extensão do fragmento termina com a adição do ddNTP, sendo que cada um emite um comprimento de onda diferente, que é traduzido em uma cor específica para cada base – A, T, C ou G (PATI et al., 2004; AVISSAR et al., 2018)

Dessa maneira, após a reação de *SNaPshot*® o produto é submetido a eletroforese capilar para detecção do ddNTP incorporado. Para efeito de individualização, a identificação dos *primers* SBE é feita pelo seu tamanho, por isso emprega-se usualmente, a adição de uma cauda não ligante (poli T, poli A, poli TC, etc.) ou então sequências que não são complementares a nenhuma região do genoma (FONDEVILA et al. 2017). Por fim, após a corrida, os genótipos serão obtidos por meio da análise dos eletroferogramas, onde a cor do pico corresponderá ao nucleotídeo específico da mutação e o local ocupado pelo pico corresponde ao seu tamanho, dado

pelo número de bases do *primer* adjacente ao SNP mais a sua cauda não ligante (PATI et al., 2004).

Esta técnica é bem difundida em análises forenses humanas, mas pode também ser utilizada na certificação e rastreabilidade, bem como na assistência ao melhoramento de características produtivas em espécies de interesse econômico (PARISET et al., 2006; SEVANE et al., 2011; FONDEVILA et al., 2017).

### **1.6. Polimorfismos de DNA localizados em genes candidatos de interesse econômico**

A aplicação de métodos tradicionais de melhoramento genético permite a obtenção de animais com alta eficiência produtiva. Estes sistemas são baseados em modelos que assumem um grande número de genes com pequenos efeitos individuais na expressão do fenótipo e enfatizam os efeitos gênicos médios (efeitos aditivos) sobre suas interações (MONTALDO & MEZA-HERRERA, 1998). Em resumo, a base é prever os valores genéticos dos animais por meio de modelos, utilizando informações fenotípicas e de parentesco (DODDS et al., 2007).

Com base no desempenho fenotípico, foram obtidos avanços importantes para as características produtivas em diferentes espécies, porém algumas limitações deste método tornaram-se evidentes com o tempo (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008). O melhoramento tradicional tem sua eficiência reduzida para características que são difíceis de medir (escore de células somáticas, eficiência alimentar), para algumas características que têm baixa herdabilidade, ou então que só podem ser avaliadas tardiamente (resistência a doenças, fertilidade, qualidade de carne, entre outras) (KOOPEE & KOSHKOIYEH, 2014). Assim, as informações geradas pelos marcadores moleculares podem reduzir estas limitações, trazendo benefícios como a diminuição no intervalo de gerações e um incremento da resposta à seleção (DEKKERS et al., 2007).

As ferramentas moleculares já são usadas de maneira difusa para auxiliar na seleção de algumas características controladas por poucos genes de grande efeito e, estão presentes em diferentes testes comerciais de DNA de ovinos oferecidos no mundo, dentre eles o *Genmark* (EUA), *TransBIOTech* (Canadá), *Catapult* (Nova Zelândia) e

*Orchid Biosciences* (Reino Unido) (Dodds et al., 2007). Os marcadores empregados nestes testes estão ligados à alta prolificidade (*booroola, inverdale ou galway*), aumento da massa muscular (*callipyge e carwell*) ou resistência/susceptibilidade ao *scrapie* (*PNRP*) (McMANUS et al., 2010).

Contudo, a maioria das características economicamente importantes na produção animal são complexas, sendo influenciadas: por múltiplos genes de grande e/ou de pequeno efeito individuais; pelas regiões cromossômicas conhecidas como *Quantitative Trait Loci* (QTL) dispersas no genoma; e, por uma gama de fatores ambientais (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008). Dessa forma, a aplicação da informação molecular destas características em programas de melhoramento requer muito mais cuidado e investigações mais aprofundadas.

Atualmente, as características poligênicas têm sido estudadas, principalmente por abordagens genômicas, utilizando milhares de SNPs distribuídos no genoma para identificar e mapear as regiões QTL (MOGHADDAR et al., 2017). Em 2008, após a publicação da primeira versão do genoma ovino, o *OvineSNP50 BeadChip* desenvolvido pela empresa norte americana *Illumina*, começou a ser comercializado contendo mais de 50 mil marcadores SNPs que cobrem intervalos de aproximadamente 46 kb do genoma (REGITANO & VERONI, 2009). Desde então, os *chips* de genotipagem em larga escala estão colaborando com as pesquisas para a dissecação genética das características produtivas na espécie.

Além dessa metodologia, vários genes ligados a produção animal foram descobertos nas últimas décadas devido a uma abordagem conhecida como “genes candidatos”, a qual se baseia no conhecimento prévio da ação biológica do gene para avaliar os SNPs encontrados dentro do mesmo e, utilizá-los em estudos de associação com os fenótipos (COUTINHO et al., 2010). Quando esta abordagem é utilizada de forma isolada apresenta várias limitações, mas pode ser muito útil no entendimento da interação e das redes genéticas que envolvem as características de interesse econômico que vêm sendo descobertas.

A atuação de vários genes ligados ao desempenho animal, características de carcaça, qualidade de carne, composição de ácidos graxos e termotolerância em ovinos, foram melhor compreendidas com base na associação de SNPs em genes candidatos com dados fenotípicos (Tabela 1). Somado a isto, numerosos estudos de associação

com características produtivas já realizados em bovinos, podem servir como base de conhecimento para guiar novas pesquisas em ovinos (DODDS et al., 2007).

Alguns dos genes candidatos que foram identificados pela sua contribuição no desempenho animal, nas características de carcaça e de carne em ovinos e bovinos são: *CAST*, que codifica a enzima calpastatina; *CAPN*, que codifica as enzimas calpaínas; *LEP*, que codifica a proteína leptina; *DGATI*, que codifica a enzima diacilglicerol aciltransferase 1; e, o gene miostatina, também conhecido como o fator de crescimento e diferenciação 8 (*GDF8*).

Foram relatadas associações dos genes *CAST* e *CAPN* com eficiência de crescimento muscular e a qualidade de carne, destacando-se a associação de polimorfismos de *CAST* com aumento no rendimento de cortes da carne ovina (BICKERSTAFFE et al., 2008; MOHAMMADI et al., 2008). Polimorfismos de *CAST* e *CAPN* também apresentaram influência em desempenho animal, com efeito no peso ao sobreano (DEHNAVI et al., 2016) e ganho médio diário (NASSIRY et al., 2006, KHAN et al., 2012), respectivamente. Além disso, o complexo proteolítico cálcio-dependente calpaína/calpastatina é o principal sistema relacionado com a maciez, pois está envolvido na degradação das proteínas miofibrilares e desempenham um papel essencial na proteólise *pós-mortem* (WIPPLE & KOOHMARAIE, 1992). Em bovinos, os polimorfismos destes dois genes têm sido correlacionados com maciez de carne (BARENDSE, 2003; WHITE et al., 2005; CASAS et al., 2006).

A leptina é um hormônio proteico produzido e secretado predominantemente pelos adipócitos, participando da regulação da ingestão de alimentos, balanço energético e deposição de gordura (SCHENKEL et al., 2009). Em bovinos, o gene *LEP* está relacionado com crescimento e características de carcaça, em especial com a deposição de gordura na carcaça (BOUCHER et al., 2005; LARA et al., 2012). Na espécie ovina, os polimorfismos encontrados no gene *LEP*, têm sido relacionados a características como peso ao nascimento, peso á desmama (TAHMOORESPUR et al., 2010; HAJIHOSSEINLO et al., 2012) e peso ao sobreano (SHOJAEI et al., 2011).

A enzima diacilglicerol aciltransferase catalisa a etapa final da síntese de triglicerídeos e, em bovinos, a associação do gene *DGATI* com a proporção de gordura na carne foi reportada pela literatura (SPELLMAN et al., 2002; THALLER et al., 2003;

WU et al. 2005). Na espécie ovina, um polimorfismo identificado no gene *DGATI*, foi associado com a gordura intramuscular e maciez (XU et al., 2008).

A miostatina desempenha um papel inibidor importante durante o desenvolvimento muscular e pode também regular a adipogênese (GONZALEZ-CADAVID & BHASIN, 2004). A descoberta de que uma mutação no gene *GDF8* provoca musculatura dupla em diferentes espécies, coloca-o na condição de gene candidato para a regulação da massa do músculo esquelético e do crescimento muscular e, portanto, um dos reguladores da produção de carne de ovinos (KIJAS et al., 2009).

No tocante aos genes candidatos relacionados à adipogênese, pode-se destacar os genes: *ACACA*, que codifica a enzima acetil-CoA carboxilase  $\alpha$ ; *SCD1*, que codifica a enzima estearoil-CoA dessaturase; *FASN*, que codifica a enzima ácido graxo sintase; *FABP3*, que codifica a proteína ligante 3 de ácidos graxos. Existem poucos estudos associando estes genes às variações do perfil de ácidos graxos encontradas nas carnes ovinas, nota-se, porém, que as pesquisas se concentram na investigação do conteúdo lipídico no leite.

Dentre as características de interesse econômico, podem ser destacadas também àquelas ligadas a termolerância e adaptabilidade produtiva frente a diferentes condições climáticas. Os genes *HSP90*, *HSPB8* e *ATPIA1*, devido a sua função biológica ligada à citoproteção e estabelecimento do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, vêm sendo associados com a resposta celular ao estresse térmico em mamíferos, principalmente relacionados a tolerância ao calor (LIU et al., 2010; CHAROENSOOK et al., 2012; VERMA et al., 2016; SINGH et al., 2017).

Dado o exposto, verifica-se que existem inúmeras ferramentas disponíveis para aplicação de marcadores moleculares. Ressalta-se, entretanto, que para que isso aconteça, além dos esforços da pesquisa para tornar a integração de informações moleculares mais precisa e confiável, é necessário ter uma base eficiente e segura para a coleta de dados, com registro genealógico padronizado e sistematização de dados de produção, além da maior adesão aos programas de melhoramento genético para o rebanho brasileiro. Sem isto, as técnicas moleculares terão pouco impacto na produção nacional de ovinos.



**Tabela 1.** Localização cromossômica, funções biológicas e associações encontradas em genes candidatos relacionados a desempenho animal, características de carcaça, qualidade de carne, composição de ácidos graxos e adaptabilidade em bovinos e ovinos.

Símbolo do Gene	Nome do gene	Localização Cromossômica	Funções	Associações encontradas
<b>Genes relacionados ao desempenho, características de carcaça e qualidade de carne</b>				
<i>ADRB3</i>	$\beta$ -adrenergic receptor/ Receptor $\beta$ -adrenergico	<b>Ovinos:</b> 26 <b>Bovinos:</b> 27	Regulação do balanço energético	<b>Ovinos:</b> Peso ao nascimento, proporção de gordura na carcaça (FORREST et al., 2007).
<i>CAPN</i>	Calpain/ Calpaína	<b>Ovinos:</b> 14 <b>Bovinos:</b> 29	Atividade Proteolítica ( <i>turnover</i> proteico)	<b>Ovinos:</b> Peso ao 1º ano (DEHNAVI et al., 2016). Aumento no rendimento de cortes cárneos (BICKERSTAFFE et al., 2008) <b>Bovinos:</b> Maciez (WHITE et al., 2005).
<i>CAST</i>	Calpastatin/ Calpastina	<b>Ovinos:</b> 5 <b>Bovinos:</b> 7	Atividade Proteolítica ( <i>turnover</i> proteico), Inibidor específico da Calpaína	<b>Ovinos:</b> Ganho médio diário (NASSIRY et al., 2006, KHAN et al., 2012). <b>Bovinos:</b> Maciez (BARENDSE et al. 2007).
<i>CTSB</i>	Cathepsin B/ Catepsina B	<b>Ovinos:</b> 2 <b>Bovinos:</b> 8	Atividade Proteolítica	<b>Ovinos e Bovinos:</b> Somente associações com características reprodutivas. No entanto, em suínos são relatadas associações com o rendimento de carcaça, peso de cortes, espessura de gordura subcutânea e ganho médio diário (RUSSO et al., 2002).
<i>DGATI</i>	Diacylglycerol Acyltransferase /Diacilglicerol aciltransferase 1	<b>Ovinos:</b> 9 <b>Bovinos:</b> 14	Síntese de triglicerídeos	<b>Ovinos:</b> Gordura intramuscular, maciez (XU et al. 2009); Espessura de gordura subcutânea, aumento na proporção de gordura na carcaça e deposição de gordura na cauda (MOHAMMADI et al., 2013). <b>Bovinos:</b> Aumento na proporção de gordura na carcaça e intramuscular (SORENSEN et al., 2006; THALLER et al., 2003).
<i>GDF8</i>	Myostatin/ Miostatina	<b>Ovinos:</b> 2 <b>Bovinos:</b> 2	Hipertrofia Muscular	<b>Ovinos:</b> Musculosidade da carcaça (KIJAS et al., 2007). <b>Bovinos:</b> Fenótipo da musculatura dupla; aumento da área de olho de lombo e proporção de músculo na carcaça (SELLICK et al., 2006).

<i>GH</i>	Growth hormone/Hormônio do crescimento	<b>Ovinos: 11</b> <b>Bovinos: 19</b>	Regulação do crescimento corporal	<b>Bovinos:</b> Ganho de peso (CURI et al., 2006; THOMAS et al., 2007); Espessura de gordura (THOMAS et al., 2007); Peso ao sobreano (PEREIRA et al., 2005); Peso vivo de abate (CURI et al., 2006).
<i>GHR</i>	Growth hormone receptor/ Receptor do hormônio do crescimento	<b>Ovinos: 20</b> <b>Bovinos: 20</b>	Receptor transmembrana para o hormônio do crescimento	<b>Ovinos:</b> Ganho diário do nascimento a desmama (VALEH et al., 2009). <b>Bovinos:</b> Peso de carcaça (HALE et al., 2000); Eficiência alimentar (SHERMAN et al., 2008).
<i>GHRL</i>	Ghrelin/Grelina	<b>Ovinos: 19</b> <b>Bovinos: 22</b>	Regulação do metabolismo energético	<b>Bovinos:</b> Consumo alimentar residual, características de carcaça, peso corporal e ganho médio diário (SHERMAN et al., 2008; ZHANG et al., 2009; ZHANG et al., 2012).
<i>EDGI</i>	Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1/ Receptor acoplado à proteína G do esfingolípido endotelial 1	<b>Ovinos: 1</b> <b>Bovinos: 1</b>	Formação de vasos sanguíneos	<b>Ovinos:</b> Deposição de gordura na cauda (MOHAMMADI et al., 2016) <b>Bovinos:</b> Gordura intramuscular (YAMADA et al., 2009).
<i>FABP3</i>	Fatty acid binding protein 3/ Proteína de ligação a ácidos graxos 3	<b>Ovinos: 2</b> <b>Bovinos: 6</b>	Transporte de ácidos graxos	<b>Ovinos:</b> Gordura Intramuscular (GUO et al., 2014). <b>Bovinos:</b> Peso de carcaça e espessura de gordura (CHO et al., 2008).
<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1/ Fator de crescimento semelhante à insulina 1	<b>Ovinos: 3</b> <b>Bovinos: 5</b>	Regulação do crescimento corporal	<b>Ovinos:</b> Peso ao nascer, peso à desmama, peso ao 1º ano (TAHMOORESPUR et al., 2009). <b>Bovinos:</b> Peso à desmama (PEREIRA et al., 2005, RENYA et al., 2010); Peso ao sobreano (PEREIRA et al., 2005).
<i>LEP</i>	Leptin/Leptina	<b>Ovinos: 4</b> <b>Bovinos: 4</b>	Regulação do metabolismo energético	<b>Ovinos:</b> Peso á desmama (TAHMOORESPUR et al., 2010; HAJIHOSSEINLO et al., 2012); Peso pós-desmama (HAJIHOSSEINLO et al., 2012; SHOJAEI et al., 2011); Peso ao 1º ano (SHOJAEI et al., 2011). <b>Bovinos:</b> Proporção de gordura na carcaça (BUCHANAN et al., 2002); Ganho médio diário (KULIG et al., 2009), Consumo alimentar (LAGONIGRO et al., 2003).

<i>LOX1</i>	Lysyl oxidase/ Lisil oxidase	<b>Ovinos: 5</b> <b>Bovinos: 7</b>	Oxidação dos resíduos de lisina na elastina e no colágeno	<b>Bovinos:</b> Maciez (DRINKWATER et al., 2005); Espessura de gordura na garupa e peso a desmama (FONSECA et al., 2015).
<i>MEG3</i>	Maternally expressed 3	<b>Ovinos: 18</b> <b>Bovinos: 21</b>	Controle da expressão do gene <i>callipyge</i> (hipertrofia muscular)	<b>Ovinos:</b> Hipertrofia muscular, concentrada nos músculos <i>longissimus dorsi</i> e <i>semimembranosus</i> (TELLAM et al.,2012); Proporção de músculo na carcaça (COCKETT et al.,2005).
<i>UCP2</i>	Uncoupling proteins 2/ Proteína desacopadora 2	<b>Ovinos: 15</b> <b>Bovinos: 15</b>	Controle da temperatura corporal e regulação do balanço energético	<b>Ovinos:</b> Proporção de músculo na carcaça e rendimento de cortes (YANG, 2014). <b>Bovinos:</b> Proporção de músculo na carcaça, rendimento de carcaça, consumo de matéria seca (SHERMAN et al., 2008).
<b>Genes relacionados à Composição de ácidos graxos</b>				
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA Carboxylase $\alpha$ / Acetil-CoA Carboxilase $\alpha$	<b>Ovinos: 11</b> <b>Bovinos: 19</b>	Síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos de cadeia longa	<b>Bovinos:</b> Peso vivo, peso de carcaça e coloração (SHIN et al., 2011); Composição de ácidos graxos no <i>longissimus dorsi</i> (ZHANG et al.,2010).
<i>FASN</i>	Fatty acid synthase/ Ácido Graxo sintase	<b>Ovinos: 11</b> <b>Bovinos: 19</b>	Síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos de cadeia longa	<b>Ovinos:</b> Gordura intramuscular (Huang et al., 2006) <b>Bovinos:</b> Proporção de C18:0 e monoinsaturados (ZHANG et al., 2008); Peso vivo de abate e Peso de carcaça quente (REMPEL et al., 2012).
<i>SCD1</i>	Stearoil-CoA desaturase 1/ Estearoil-CoA dessaturase 1	<b>Ovinos: 22</b> <b>Bovinos: 26</b>	Catalisa a dessaturação de ácidos graxos de cadeia longa	<b>Bovinos:</b> Proporção de monoinsaturados na carne e marmoreio (TANIGUCHI et al., 2004); Teor de ácido linoleico conjugado (LI et al. 2011).
<b>Genes relacionados à Adaptabilidade</b>				
<i>ATPIA1</i>	Na+K+ ATPase $\alpha$ 1	<b>Ovinos: 1</b> <b>Bovinos: 3</b>	Gradiente eletroquímico de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> na membrana plasmática	<b>Bovinos e Ovinos:</b> Tolerância ao calor (LIU et al., 2010; KASHYAP et al., 2015).
<i>HSPB8</i>	Heat Shock Protein Family B/ Proteína de Choque Térmico Família B	<b>Ovinos: 17</b> <b>Bovinos: 17</b>	Regulação do crescimento celular e apoptose	<b>Bovinos:</b> Tolerância ao calor (VERMA et al., 2016).

<b><i>HSPB90</i></b>	Heat shock proteins 90/ Proteína de Choque Térmico 90	<b>Ovinos:</b> 20 <b>Bovinos:</b> 10	Regulação de apoptose celular	<b>Ovinos e Bovinos:</b> Tolerância ao calor (CHAROENSOOK et al., 2012; SINGH et al.,2017).
<b><i>MC1R</i></b>	Melanocortin 1 receptor/ Receptor de melanocortina 1	<b>Ovinos:</b> 14 <b>Bovinos:</b> 18	Participa da síntese de melanina	<b>Ovinos e Bovinos:</b> Cor da pelagem, Pigmentação da pele, casco e chifres (FONTANESI et al., 2010; ROUZAUD et al., 2000).

## 2. REFERÊNCIAS

- ALVES, D.M.T., PEREIRA, R.W., LEAL-BERTIOLI, S. C. M., MORETZSOHN, M., GUIMARÃES, P., BERTIOLI, D. Desenvolvimento e utilização de variações em um único nucleotídeo para o mapeamento de marcadores âncoras e de genes candidatos em *Arachis*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 2007.
- ARAÚJO, R. O. D., CAETANO, A. R. Low density genomic data for animal breeding: critical analysis and perspectives of the GoldenGate BeadXpress technology. **Ciência Rural**, v.46, n.11, p.2005-2011, 2016.
- ARGAC, D., BULBUL, O., SHAHZAD, M. S., ACAR, E., ALTUNCUL, H., FILOGLU, G. Optimization and validation of 10 mitochondrial DNA SNPs using SNaPshot Kit. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v.2, n.1, p.99-101, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS (ARCO). Como estimular o consumo de carne ovina? **Revista ARCO**, n.20, 2018.
- AVISSAR, Y., CHOI, J., DESAIX, J., JURUKOVSKI V., WISE, R., RYE C. **DNA Structure and Sequencing**. OpenStax College, Biology, 2018. Disponível em: <<http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@10.4>> Acesso em: maio de 2019.
- BARENDSE W., REVERTER A., BUNCH R.J., HARRISON B.E., BARRIS W. A validated whole-genome association study of eficiente food conversion in cattle. **Genetics** n. 176, p. 1893–1905, 200.
- BICKERSTAFFE, R.; GATELY, K.; MORTON, J.D. The association between polymorphic variations in calpain 3 with the yield and tenderness of retail lamb meat cuts. In: **Proceedings of 54th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finland**, p.1-4, 2008.
- BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.324, n. 5926, p.522-528, 2009.
- BOUCHER, D., PALIN, M. F., CASTONGUAY, F., GARIÉPY, C., POTHIER, F. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (*LEP*) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. **Canadian Journal of Animal Science**, v.86, p.31-35, 2006.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONS C.J, VAN KESSEL A.G., THUE T.D., WINKELMAN-SIM D.C. Association of a missense mutation in the bovine *leptin* gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genet Sel Evol** n.34, p.105–111, 2002.
- CASAS, E., WHITE, S.N., WHEELER, T.L., SHACKELFORD, S.D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D.G., CHASE J.R., C.C, JOHNSON, D.D., SMITH, T.P.L. Effects of calpastatin and u-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 520-525, 2006.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.64-71, 2009.

CIAPPESONI, G., GIMENO, D., CORONEL, F. **Evaluaciones genéticas en ovinos: situación actual y desafíos futuros**. In XV Congreso Latinoamericano de Buiatría/XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Centro Médico Veterinario de Paysandú, 2011.

CHAROENSOOK, R., GATPHAYAK, K., SHARIFI, A.R. Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. **Tropical Animal Health Production**, v.44, p.921-928, 2012.

CHO, S. PARK, T.S., YOON, D.H., CHEONG, H. S., NAMGOONG, S., PARK, B.L., KIM, H.B. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p. 29-34, 2008.

COCKETT, N.E., SMIT, M.A., BIDWELL, C.A., SEGERS, K., HADFIELD, T.L., SNOWDER, G.D., GEORGES, M., CHARLIER, C. The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. **Genetics Selection Evolution** v.37, n.1, p.S65, 2005.

COSTA, J.A.A.; REIS, F.A.; LUCENA, C.C. Atualização das demandas de pesquisa em ovinos de corte no Brasil Central. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**, n. 8, 2019

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

CURI, R.A., PALMIERI, D.A., SUGUISAWA, L., OLIVEIRA, H.N.D., SILVEIRA, A.C. LOPES, C.R Growth and carcass traits associated with *GHI/Alu I* and *POUIF1/Hinf I* gene polymorphisms in Zebu and crossbred beef cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.56-61, 2006.

DECKER, S.R.F., FERNANDES, D.A.C.; GOMES, M.C. Gestão competitiva na produção de ovinos. **Agropampa: Revista de Gestão do Agronegócio**, v.1, n.1, 2016.

DEHNAVI, E., AHANI AZARI, M., HASANI, S., NASSIRI, M., MOHAJER, M., KHAN AHMADI, A.R., SHAHMOHAMADI, L., YOUSEFI, S. Association between Yearling Weight and *Calpastatin* and *Calpain* Loci Polymorphism in Iranian Zel Sheep, **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.2, n.2, p.131-135, 2012.

DEKKERS, J.C.M. Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. **Journal Animal Breeding and Genetics**, 124, 331–341, 2007.

DEKKERS, J., HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, n.3, p.22–32, 2002.

DRINKWATER, R.D., LI, Y., LENANE, I., DAVIS, G.P., SHORTHOSE, R., HARRISON, B.E., RICHARDSON, K., FERGUSON, D., STEVENSON, R., RENAUD,

- J. AND LOXTON, I. Detecting quantitative trait loci affecting beef tenderness on bovine chromosome 7 near *calpastatin* and *lysyl oxidase*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.46, n.2, p.159-164, 2006.
- DODDS, K. G., MCEWAN, J. C., & DAVIS, G. H. Integration of molecular and quantitative information in sheep and goat industry breeding programmes. **Small Ruminant Research**, v.70, n.1, p.32-41, 2007.
- FERGUSON, D., LEE, C.; FISHER, A. (Ed.). **Advances in sheep welfare**. Woodhead Publishing, 2017.
- FONSECA, P.D.D.S., SOUZA, F.R., CAMARGO, G.M., GIL, F.M., CARDOSO, D.F., ZETOUNI, L., BRAZ, C., BOLÍGONO, A.A., BRANCO, R.H., LUCIA, G. E MERCADANTE, M.E. Association of *ADIPOQ*, *OLRI* and *PPARGCIA* gene polymorphisms with growth and carcass traits in Nelore cattle. **Meta Gene**, v.4, p.1-7, 2015.
- FONTANESI, L., BERETTI, F., RIGGIO, V., DALL'OLIO, S., CALASCIBETTA, D., RUSSO, V. E, PORTOLANO, B. Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus. **Small Ruminant Research**, v.91, p.200-207, 2010.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Estatísticas FAO**, 2007.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Food and Nutrition in Numbers**, 2014.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **OECD-FAO agricultural outlook 2012–2021**, 2012.
- FONDEVILA, M., BØRSTING, C., PHILLIPS, C., DE LA PUENTE, M., CARRACEDO, A., MORLING, N. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. **Forensic Science Review**, v.29, p.57-76, 2017.
- FORREST, R.H., HICKFORD, J.G.H., FRAMPTON, C.M. Polymorphism at the ovine  $\beta$ 3-adrenergic receptor locus (*ADRB3*) and its association with lamb mortality. **Journal of Animal Science**, v.85, n.11, p.2801-2806. 2007.
- FROHLICH, T., KIRSCHBAUM, T., THOENES, U., FURRER, F., DIETRICH-VEENSTRA, U., SELLER, M. The light typer instrument: high through put genotyping of single nucleotide polymorphism. **Biochemica**, v.2, p.9-11, 2004.
- GIUSTI, J., KETTENER, K., FUCHS-FERRAZ, M.C.P. Influência do sequenciamento de nova geração no futuro da genética da conservação. **Revista RG News**, v.2, p.2, 2016.
- GUIMARÃES, C.T., DE MAGALHÃES, J.V., LANZA, M.A., SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. Informe Agropecuário – Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33, 2009.

GUO, B., KONGSUWAN, K., GREENWOOD, PL, ZHOU, G., ZHANG, W., DALRYMPLE, B.P. A gene expression estimator of intramuscular fat percentage for use in both cattle and sheep. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 35, 2014.

GONZALEZ-CADAVID, N., BHASIN, S. Role of myostatin in metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.7, p.451–457, 2004.

HAJIHOSSEINLO, A., HASHEMI, A. AND SADEGHI, S. Association between polymorphism in exon 3 of *leptin* gene and growth traits in the Makooei sheep of Iran. **Livestock Research for Rural Development**, v.24, n.9, p.543-546, 2012.

HUANG, Z.G., XIONG, L., ZHEN-SHAN, L.I.U., YONG, Q.I.A. O., SHOU-REN, L.I.U., HANG-XING, R.E.N., XUE-BIN, L.I. The developmental changes and effect on IMF content of *H-FABP* and *PPAR $\gamma$*  mRNA expression in sheep muscle. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n. 6, p. 507-514, 2006.

IBEAGHA-AWEMU, E.M., KGWATALALA, P., ZHAO, X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v.19, n.9, 591-617, 2008.

JIANG, G. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. **Plant Breeding From Laboratories to Fields**, p.45-83, 2013.

JIN, Q.J., FANG, X.T., ZHANG, C.L., YANG, L., SUN, J.J., CHEN, D.X., SHI, X.Y., DU, Y., LAN, X.Y., CHEN, H. A novel SNP of the *GHRL* gene in goat and its association with growth traits. **Small Ruminant Research**, v.90, n.3, p.150-152, 2010.

KIJAS, James W. et al. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. **BMC genetics**, v. 8, n. 1, p. 80, 2007.

KOOPAE, H.K., KOSHKOIYEH, A.E. SNPs genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs: review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n.1, 87-95, 2014.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v.74, p.239-245, 1992.

KULIG, H. AND KMIEĆ, M. Association between *leptin* gene polymorphisms and growth traits in Limousin cattle. **Russian Journal of Genetics**, v.45, n.6, p.738-741, 2009.

LARA M.A.C., GUTMANIS G., SOARES W.V.B., ROCHA L.A., CUNHA E.A., CAVALCANTE-NETO A., SILVA R.C.B., RIBEIRO M.N., HERLING V.R. Caracterização genética de raças nativas e comerciais de ovinos com base em SNPs no gene leptina. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v.2, p.215-219, 2012.

LAGONIGRO, R., WIENER, P., PILLA, F., WOOLLIAMS, J.A., WILLIAMS, J.L. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, v.34, n.5, p.371-374, 2003.



- LI, C.; ALDAI, N., VINSKY, M.; DUGAN, M. E. R.; MCALLISTER, T. A. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine stearoyl-CoA desaturase and *fatty acid synthase* genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. **Animal Genetics**, v.43, p.93-97, 2011.
- LIU, Y.X., ZHOU, X, LI, D.Q., CUI, Q.W., WANG, G. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and molecular research*, **Genetic Molecular Research**, v.9, n.2, p.891-896, 2010.
- LÔBO, R. N. B., LÔBO, A. M. B. O. Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.247-253, 2007.
- LÔBO, R., FACO, O., LÔBO, A., & de MORAIS, O. R. Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (GENECOC): capacitação gerencial de usuários. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Documentos**, 2011.
- McINNES, R.R., WILLARD, H.F., NUSSBAUM, R. **Thompson & Thompson Genética Médica**, Editora Elsevier Brasil, Edição n.8, 2016.
- McMANUS, C., PAIVA, S.R., ARAÚJO, R.O.D. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.236-246, 2010.
- MEHTA, B., DANIEL, R., PHILLIPS, C., MCNEVIN, D. Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review. **International Journal of Legal Medicine**, v.131, n.1, p.21-37, 2017.
- MOGHADDAR, N., SWAN, A.A., VAN DER WERF, J.H.J. Genomic prediction from observed and imputed high-density ovine genotypes. **Genetics Selection Evolution**, v.49, n.1, p.40, 2017.
- MOHAMMADI, M., BEIGI NASIRI, M.T., ALAMI-SAEID, K H., FAYAZI, J., MAMOEE M., SADR, A.S. Polymorphism of *calpastatin* gene in Arabic sheep using PCR- RFLP. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.2682-2684, 2008.
- MOHAMMADI, F., FARHADI, A., RAHIMI-MIANJI, G., GHOLIZADEH, M. Molecular genetics and bioinformatics analysis of *EDG1* and *AKIRIN2* genes in Iranian fat-tailed and nonfat-tailed sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 144, p. 263-268, 2016.
- MOHAMMADI, H., SHAHREBABAK, M., SADEGHI, M. Association between single nucleotide polymorphism in the ovine *DGATI* gene and carcass traits in two iranian sheep breeds. **Animal Biotechnology**, v.24, n.3, 2013.
- MORRIS, S.T. Overview of sheep production systems. In: **Advances in Sheep Welfare**. Woodhead Publishing, p.19-35, 2017.
- 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.15-16, 1998.

MONTOSSI, F., CAZZULI, F., BRITO, G., REALINI, C., LUZARDO, S., ROVIRA, P., E FONT-I-FURNOLS, M. The challenges of aligning consumer preferences and production systems: Analysing the case of a small beef meat exporting country. **International Journal of Agricultural Policy and Research**, v.6, p.144-159, 2018.

MONTOSSI, F., FONT-I-FURNOLS, M., DEL CAMPO, M., SAN JULIÁN, R., BRITO, G. E SAÑUDO, C. Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. **Meat Science**, v. 95, n. 4, p. 772-789, 2013.

NASSIRY, M.R., TAHMOORESPOUR, M., JAVADMANESH, A., SOLTANI, M., FAR, S.F. *Calpastatin* polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. **Iranian Journal of Biotechnology**, v.4, n.3, 2006.

PARISET, L., CAPPUCCHIO, I., JOOST, S., D'ANDREA, M., MARLETTA, D., AJMONE MARSAN, P., ECONOGENE CONSORTIUM. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 290-292, 2006.

PATI, N., SCHOWINSKY, V., KOKANOVIC, O., MAGNUSON, V., & GHOSH, S. A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.60, n.1, p.1-12, 2004.

PEREIRA A.P., ALENCAR M.M., OLIVEIRA H.N., ALMEIDA D.R. Association of *GH* and *IG-1* polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetic Molecular Biology**, v.28, p.230–236,2005.

REGITANO, L.C.A., VENERONI, G.B. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal**, São Carlos. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil. 2009.

RODRÍGUEZ-ORTEGA, T., BERNUÉS, A., OLAIZOLA, A.M., E BROWN, M.T. Does intensification result in higher efficiency and sustainability? An emergy analysis of Mediterranean sheep-crop farming systems. **Journal of cleaner production**, v.144, p.171-179, 2017.

ROUZAUD, F., MARTIN, J., GALLET, PF, DELOURME, D., GOULEMOT-LEGER, V., AMIGUES, Y., MÉNISSIER, F., LEVÉZIEL, H., JULIEN, R. E OULMOUDEN, A. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (*MC1R*). **Genetics Selection Evolution**, v.32. n.5, p.511, 2000.

RUPP, R., MUCHA, S., LARROQUE, H., MCEWAN, J., CONINGTON, J.E. Genomic application in sheep and goat breeding. **Animal Frontiers**, v.6, n.1, p.39-44, 2016.

RUSSO, V., FONTANESI, L., DAVOLI, R., NANNI COSTA, L., CAGNAZZO, M., BUTTAZZONI, L., VIRGILI, R.E, YERLE, M. Investigation of candidate genes for meat

quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (*CTSB*) and cystatin B (*CSTB*) genes. **Animal Genetics**, v.33, n.2, p.123-131, 2002.

SANTOS, I. Polimorfismos de DNA (SNPs). **Revista Eletrônica Genética do Sertão – UFRPE**, 2008. Disponível em: <<http://geneticanosertao.blogspot.com/2010/06/polimorfismos-de-dna-snps-igorsantos.html>> Acesso em: junho de 2019.

SAUNA, Z.E., KIMCHI-SARFATY, C., AMBUDKAR, S. V., GOTTESMAN, M.M. The sounds of silence: synonymous mutations affect function. **Pharmacogenomics**, v.8, n.6, p.527-532, 2007.

SCHENKEL, F. S., MILLER, S.P., YE X., MOORE, S.S., NKRUMAH, J.D., LI, C., YU, J., MANDELL, I. B., WILTON, J. W., WILLIAMS, J. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the *leptin* gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.20, p.83, 2009.

SEVANE, N., CRESPO, I., CAÑÓN, J., & DUNNER, S. A Primer-Extension Assay for simultaneous use in cattle Genotype Assisted Selection, parentage and traceability analysis. **Livestock Science**, v.137, n.1-3, p.141-150, 2011.

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

SHIN, S., HEO, J., CHUNG, E. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of Acetyl-CoA Carboxylase  $\alpha$  (*ACACA*) Gene on Carcass Traits in Hanwoo (Korean Cattle). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, n.6, p.744-751, 2011.

SHOJAEI, M., MOHAMMAD, M., ASADI, M., DAYANI, O., KHEZRI, A. AKHONDI, M. Association of growth trait and *Leptin* gene polymorphism in Kermani sheep. **Journal of Cell and Molecular Research**, v.2, n.2, p.67-73, 2011.

SINGH, K.M., SINGH, S., GANGULY, I., NACHIAPPAN, R.K., GANGULY, A., VENKATARAMANAN, R., CHOPRA, A., NARULA, H.K. Association of **heat stress protein 90 and 70** gene polymorphism with adaptability traits in Indian sheep (*Ovis aries*). **Cell Stress and Chaperones**, v.22, n.5, p.675-684, 2017.

SINGH, U., DEB, R., ALYETHODI, R. R., ALEX, R., KUMAR, S., CHAKRABORTY, S., SHARMA, A. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: a review. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v.6, n.2, p.49-58, 2014.

SNELLING, W. M. et al. How SNP chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement females. **Journal of Animal Science**, v.90, p.152-1165, 2012.

SPELMAN, R.J., FORD, C.A., MCELHINNEY, P., GREGORY, G.C., SNELL, R.G. Characterization of the *DGATI* gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3514-3517, 2002.

TAHMOORESPUR, M., TAHERI, A., VALEH, M.V., SAGHI, D.A., ANSARY, M. Assessment relationship between *leptin* and *ghrelin* genes polymorphisms and estimated breeding values (EBVs) of growth traits in Baluchi sheep. **Journal of Animal and veterinary Advances**, v.9, n.19, p.2460-2465, 2010.

TANIGUCHI, M., UTSUGI, T., OYAMA, K., MANMEN, H., KOBAYASHI, M. Genotype of *stearoyl-CoA desaturase* is associated with fatty acid composition in Japanese black cattle. **Mammalian Genome**, v.14, p.142-148, 2004.

TELLAM, R.L., COCKETT, N.E., VUOCOLO, T. AND BIDWELL, C.A. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. **Frontiers in Genetics**, v.3, p.164, 2012.

THALLER, G., KRAMER, W., WINTER, A., KAUPE, A., ERHARDT, G. Effects of *DGATI* variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1911-1918, 2003.

THOMAS, M.G., ENNS, R.M., SHIRLEY, K.L., GARCIA, M.D., GARRETT, A.J. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. **Genetic Molecular Research**, v.6, p.222-237, 2007.

VERMA, N., GUPTA, I.D., VERMA, A. Novel SNPs in *HSPB8* gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v.48, p.175, 2016.

VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.4, n.12, p.44-47, 2008.

XU, Q.L., CHEN, Y.L., MA, R.X., XUE, P. Polymorphism of *DGATI* associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. **Journal Science Food Agriculture**, v.89, p.232-237, 2009.

YAMADA, T., SASAKI, S., SUKEGAWA, S., MIYAKE, T., FUJITA, T., KOSE, H., MORITA, M., TAKAHAGI, Y., MURAKAMI, H., MORIMATSU, F., SASAKI, Y. Novel SNP in 5' flanking region of *EDGI* associated with marbling in Japanese Black beef cattle. **Animal Science Journal**, v.80, n.4, p.486-489, 2009.

YANG, G., FORREST, R., ZHOU, H., HODGE, S., HICKFORD, J. Genetic variation in the ovine uncoupling protein 1 gene: association with carcass traits in New Zealand (NZ) Romney sheep, but no association with growth traits in either NZ Romney or NZ Suffolk sheep. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.131, n.6, p.437-444, 2014.

ZHANG, D.X., HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular ecology**, v.12, n.3, p.563-584, 2003.

ZHANG, S., KNIGHT, T.J., REECY, J.M., WHEELER, T.L., SHACKELFORD, S.D., CUNDIFF, L.V., BEITZ, D.C. Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine *acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$*  gene with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, v.41, n.4, p.417-420, 2010.

ZHANG, S., KNIGHT, T.J., REECY, J.M., BEITZ, D.C. DNA polymorphisms in bovine *fatty acid synthase* are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, v.39, p.62-70, 2008.

WHIPPLE, G., & KOOHMARAIE, M. Freezing and calcium chloride marination effects on beef tenderness and calpastatin activity. **Journal of Animal Science**, v. 70, n.10, p.3081-3085, 1992.

WHITE, S.N.; CASAS, E.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D.G.; CHASE JR, C.C.; JOHNSON, D.D.; KEELE, J. W.; SMITH, T.P.L. A new single nucleotide polymorphism in *CAPNI* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2001-2008, 2005.

WU, X.L.; MACNEIL, M.D.; DE, S.; XIAO, Q. J.; MICHAL, J.J.; GASKINS, C.T.; REEVES, J.J.; BUSBOOM, J.R.; WRIGHT JR, R.W.; JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. **Genetic**, v.125, p.103-113, 2005.

## POLIMORFISMOS ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA EM OVINOS

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados em genes relacionados a características de interesse econômico em ovinos. Foi realizada a genotipagem dos animais para 30 polimorfismos, por meio da técnica de *SNaPshot*®, em uma população de 151 ovinos cruzados. Os genótipos obtidos foram analisados por estudos de associação com 38 traços fenotípicos, referentes a características da carcaça e da carne em cordeiros. Os SNPs dos genes *CAPN* e *CAST* foram relacionados às medidas biométricas, rendimento de carcaça e valor de  $a^*$  do músculo *longissimus*. O polimorfismo gene *DGATI* influenciaram os pesos, medidas da carcaça e a proporção de gordura na paleta. O polimorfismo do gene *ACACA* também foi relacionado as medidas biométricas realizadas na carcaça. Neste trabalho, foram observadas associações significativas das características de carcaça com polimorfismos em genes pouco estudados na espécie ovina, como *CTSB*, *EDG1*, *MC1R*, *UCP2*. Os resultados encontrados confirmam algumas associações anteriormente descritas na literatura. Além disso, foram identificadas novas associações que, após validação em outras populações, poderão ser incorporadas em programas de melhoramento. Esses dados fornecem um ponto de partida para investigar as complexas redes de genes ligados a características economicamente importantes para a indústria da carne, visando melhorar a eficiência da produção e a qualidade da carne ovina.

**Palavras-chave:** SNP, carne ovina, Calpaína, Calpastatina, Diacilglicerol-aciltransferase 1, Grelina, cordeiros

## **POLIMORPHYSMS ASSOCIATED WITH SHEEP CARCASS TRAITS**

### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) located in genes related to traits of economic interest in sheep. The animals were genotyped for 30 polymorphisms using the *SNaPshot*® technique, in a population of 151 crossbreed sheep. The genotypes obtained were analyzed by association studies with 38 phenotypic traits, concerning carcass and meat traits of lambs. The SNPs of the genes *CAPN* and *CAST* were related to biometric measures, carcass yield and the  $a^*$  value of *longissimus*. The genotypes rs410015353 of the gene *DGATI* influenced on weight, carcass measures and on the fat proportion of shoulder. The polymorphism of the gene *ACACA* was also related to the biometric measures performed on the carcass. In this work, significant associations of carcass traits with polymorphisms were observed in genes little studied in sheep, such as *CTSB*, *EDG1*, *MC1R* and *UCP2*. The found results confirm some associations previously described in the literature. Furthermore, new associations were identified which, after validation in other populations, could generate information to be incorporated into breeding programs. These data provide a starting point to investigate the complex networks of genes linked to economically important traits for the meat industry, aiming to improve the production efficiency and the quality of sheep meat.

**Keywords:** SNP, sheep meat, lambs, Calpain, Calpastatin, Diacylglycerol-acyltransferase

## 1. Introdução

Os sistemas destinados à produção de carne buscam animais eficientes e que ofereçam carcaças de qualidade. Além disso, devido ao fato de o mercado consumidor estar mais exigente quanto à qualidade da carne, é de grande relevância atentar-se a utilização de genótipos que imprimam à carcaça bons índices de cortes nobres, com qualidade e padronização (MORENO et al., 2016).

A genética quantitativa obteve avanços importantes para as características produtivas em diferentes espécies, utilizando o desempenho fenotípico para determinar os animais de maior mérito genético. No entanto, para características de carcaça e qualidade de carne, os ganhos genéticos são mais difíceis, pois elas geralmente apresentam herdabilidades baixas e são avaliadas apenas após o abate (IBEAGHA-AWEMU et al., 2008).

Com a utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento, avanços significativos podem ser obtidos, como o aumento da acurácia na predição dos valores genéticos e a redução do intervalo de gerações nas características de carcaça (LÔBO & LÔBO, 2007). A seleção assistida por marcadores tem potencial para auxiliar de forma antecipada no melhoramento de características que se expressarão tardiamente, reduzindo os custos de manutenção do animal no rebanho por vários anos.

Nas últimas décadas, vários marcadores moleculares ligados a características de interesse econômico foram descobertos devido a uma abordagem conhecida como “genes candidatos”, que se baseia no conhecimento prévio da ação biológica do gene para avaliar os SNPs identificados e utilizá-los em estudos de associação com informações fenotípicas (COUTINHO et al., 2010). Alguns polimorfismos em genes candidatos possuem influência comprovada sobre características da carcaça e da carne ovina. Isto inclui os genes que codificam a calpaína - *CAPN* e calpastatina - *CAST*, (BICKERSTAFFE et al., 2008; MOHAMMADI et al., 2008), o gene da enzima diacilglicerol-aciltransferase 1 - *DGAT1* (XU et al., 2009), e ainda, os genes da miostanina- *GDF8* (HAN et al., 2015) e da leptina - *LEP* (TAHMOORESPUR et al., 2010).

Como as características de carcaça e qualidade de carne são resultados da ação poligênica, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas na compreensão da variação genética entre os indivíduos. Sendo assim, o estudo de uma ampla variedade de locos candidatos pode validar e gerar novas informações para colaborar neste sentido.



Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos com características de carcaça e qualidade de carne.

## 2. Material e Métodos

### *Animais*

Foram avaliados 151 ovinos cruzados com peso médio de  $43,07 \pm 8,99$  kg e idade entre 5 a 8 meses, oriundos de quatro diferentes grupos experimentais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

O primeiro grupo era composto 75 machos, cruzados  $\frac{1}{4}$  Pantaneiro x  $\frac{3}{4}$  Texel, provenientes de rebanhos comerciais e mantidos em confinamento experimental na FAMEZ, no município de Campo Grande, MS. A dieta dos animais foi fornecida na proporção volumoso: concentrado de 60:40, constituída de silagem de milho e concentrado comercial. O segundo grupo era de 22 machos cruzados  $\frac{1}{4}$  Pantaneiro x  $\frac{3}{4}$  Texel, provenientes de rebanhos comerciais e mantidos em confinamento experimental na FAMEZ, no município de Campo Grande, MS, recebendo diferentes dietas contendo silagem grão de milho inteiro, reidratado e de grão grosseiramente triturado, além de concentrado comercial

O terceiro grupo era constituído 21 machos,  $\frac{1}{2}$  SRD x  $\frac{1}{2}$  Texel do Setor de Ovinocultura da Fazenda Escola da FAMEZ, localizada no município de Terenos, MS, oriundos de dois anos de avaliação. Os animais foram mantidos sob pastejo de *Urochloa* spp e recebendo quatro níveis diferentes de suplementação mineral. O quarto grupo era constituído 33 machos,  $\frac{1}{2}$  SRD x  $\frac{1}{2}$  Texel do Setor de Ovinocultura da Fazenda Escola da FAMEZ, localizada no município de Terenos, MS, avaliados em dois anos diferentes. Os animais foram mantidos sobre pastejo de *Urochloa* spp com diferentes níveis de oferta de forragem.

Os cordeiros foram enviados a um mesmo frigorífico comercial, localizado em Campo Grande, MS, onde foram abatidos. Realizaram-se avaliações nas carcaças e coleta de amostras de músculo do *longissimus dorsi* para análises instrumentais de qualidade de carne e para a extração de DNA.

### *Dados de características de carcaça e qualidade carne*

No abate de cada grupo de animais, foram coletados os dados referentes aos pesos corporais ao abate, pesos de carcaça quente e o pH 0 h, por meio de pHmetro digital. Após 24h, foram registrados os pesos de carcaça fria, o pH 24 h e as medições biométricas na carcaça: comprimento externo da carcaça (distância entre a última vértebra sacral e a primeira vértebra cervical); comprimento interno da carcaça (distância máxima entre o bordo anterior da sínfise ísquiopubiana e o bordo anterior da primeira costela em seu ponto médio); profundidade de tórax (distância máxima e mínima entre o esterno e o dorso da paleta no nível da sexta costela); espessura de perna (distância reta entre a borda proximal e distal do pernil); e comprimento de perna (distância entre o centro do períneo e o bordo anterior da superfície articular tarso metatarsiana), conforme descrito por SAÑUDO & SIERRA, 1986.

A carcaça foi seccionada ao meio e a metade esquerda foi pesada e subdividida em 7 regiões anatômicas (paleta, pernil, costela, lombo, fraldinha, carré, pescoço) e, em seguida, pesadas separadamente para determinação das proporções dos cortes (%) em relação ao peso da meia-carcaça esquerda resfriada. Os cortes paleta, lombo e perna de cada animal foram identificados e congelados em freezer a -20° C para posteriores análises.

A área de olho de lombo (AOL) foi obtida pela exposição do músculo *longissimus dorsi* após um corte transversal na carcaça, entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> vértebras torácicas. A área foi desenhada em papel manteiga e posteriormente e mesurada pelo equipamento *Li-Cor*, modelo 3100. Nesta mesma secção também foi avaliada a espessura de gordura subcutânea (EGS), utilizando-se um paquímetro digital.

As avaliações instrumentais de qualidade de carne foram realizadas no lombo. As amostras de *longissimus dorsi* foram cortadas perpendicularmente ao sentido das fibras musculares a 2,5 cm de espessura e pesadas e armazenadas a -20° C.

Nesta amostra foi feita a avaliação instrumental da cor com o aparelho colorímetro *Mini SCan XE PLUS*, modelo 45/0-L, calibrado para um padrão branco por meio do Sistema CIE (L\*, a\*, b\*). O pH da carne também foi determinado utilizando um pHmetro digital portátil da marca *Hanna® Instruments*, introduzindo o eletrodo diretamente no músculo. Além disso, foi determinado o grau de marmorização visualmente (1–3 traços, 4–6 leve, 7–9 pequeno, 10-12 médio, 13-15 moderado e 16-18 abundante), utilizando cartões padrões do USDA (1997).

Para determinação da perda por descongelamento, as amostras de *longissimus dorsi* foram descongeladas em refrigerador a 4 °C por 24 h e pesadas novamente para o cálculo da porcentagem de perda por diferença de peso. Para a avaliação da perda de peso por cocção, as mesmas amostras foram assadas em forno convencional a 170 °C até atingir 71 °C de temperatura no centro geométrico, sendo feito monitoramento com auxílio de um termômetro digital. Em seguida, foram retiradas do forno e permaneceram em temperatura ambiente até atingirem 28 °C, momento em que foram pesadas novamente para a determinação da porcentagem de perda por cocção.

A força de cisalhamento (FC) foi determinada utilizando-se as mesmas amostras supracitadas, das quais foram retiradas quatro subamostras cilíndricas com 1,27 cm de diâmetro no sentido longitudinal das fibras musculares para avaliação utilizando-se lâmina *Warner-Bratzler* acoplada ao aparelho *Texture Analyser TA-XT plus*.

Também foram separadas 20 amostras de cortes da paleta e pernil para a determinação das composições teciduais. Foi realizada a dissecação das amostras seguida da pesagem individual dos componentes, que foram divididos em: gorduras (subcutânea: gordura externa, localizada diretamente abaixo da pele e intermuscular: gordura abaixo da fáscia profunda); músculos (total de músculos dissecados, após a remoção completa das gorduras subcutânea e intermuscular aderida); ossos e outros (tendões, fáscias, vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos). As médias, o desvio padrão e o coeficiente de variação das características utilizadas neste estudo estão apresentados na Tabela 1.

#### *Extração de DNA*

O DNA foi extraído no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA), da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, a partir do tecido muscular, seguindo o protocolo de Regitano & Coutinho (2001). A integridade e a concentração das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%) e espectrofotometria em aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific ND 1000*).

#### *Seleção dos SNPs*

Foram selecionados 30 SNPs localizados em 23 genes candidatos associados previamente à regulação do crescimento corporal, desenvolvimento de tecidos, metabolismo lipídico e energético e adaptabilidade em bovinos e ovinos (Tabelas 1 e 2 - Apêndice).

Os SNPs genotipados para associação com dados fenotípicos foram: rs420069625 (*ACACA* - *Acetyl-CoA Carboxylase  $\alpha$* ); g.31849799 G>C - sem depósito (*ADRB3* -  $\beta$ -*adrenergic receptor*); rs599122362 (*ATPIA1* - *Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1*); rs160945933, rs428593688 e rs160945890 (*CAPN* - *Calpain*); rs602676579, rs421224227 e g.93444503C>G - sem depósito (*CAST* - *Calpastatin*); rs161888250 (*CTSB* - *Cathepsin B*); rs410015353 (*DGAT1* - *Diacylglycerol Acyltransferase1*); rs590871285 e rs159669780 (*EDG1* - *Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1*); g.235142245A>G - sem depósito (*FABP3* - *Fatty acid binding protein 3*); rs161102729 (*FASN* - *Fatty acid synthase*); rs119102826 (*GDF8* - *Myostatin*); rs397514102 (*GH* - *Growth hormone*); rs161146164 e g.31833147C>A - sem depósito (*GHR* - *Growth hormone receptor*); rs428757090 (*GHRL* - *Ghrelin*); rs594801080 (*HSP90AB1* - *Heat shock proteins 90*); rs160860233 (*HSPB8* - *Heat Shock Protein Family B*); rs159876393 (*IGF1* - *Insulin-like growth factor 1*); rs414488761 (*LEP* - *Leptin*); rs398830232 (*LOX* - *Lysyl oxidase*); rs409651063 e rs160910030 (*MC1R* - *Melanocortin 1 receptor*); rs10721184 (*MEG3* - *Maternally expressed 3*); rs412429481 (*SCD1* - *Stearoil-CoA desaturase 1*); rs160723758 (*UCP2* - *Uncoupling proteins 2*).

A identificação e a localização cromossômica de cada um dos polimorfismos foram obtidas partir do banco de dados *Ensembl Genomes*.

#### *Amplificação por PCR multiplex*

Os SNPs selecionados foram distribuídos em dois PCR multiplexes que estão apresentados de forma separada na Tabelas 1 e 2 - Apêndice. Os *primers* que flanqueiam os SNPs dos genes *ATPIA1*, *CAST*, *EDG1*, *FASN*, *HSP90AB1*, *HSPB8* e *UCP2* foram validados e otimizados da espécie bovina para ovina.

As reações de PCR multiplex foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante, em um volume final de 25  $\mu$ l, constituídas de 40 ng de amostra de DNA, um pool dos *primers* com concentração final de 0,2  $\mu$ M de cada, 0,6x QIAGEN Multiplex PCR master mix e 0,3x Q-Solution.

Para amplificação utilizou-se o termociclador Vereti™ 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City CA, USA*), seguindo o protocolo de 15 minutos para desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

O êxito da amplificação foi verificado via eletroforese em gel de agarose a 3%. Após a PCR multiplex, foi realizada a etapa de purificação, onde os *primers* não incorporados e os dNTPs foram removidos utilizando 2,5 U de ExoI, 0,5 U de SAP e em 7 µl de produto de PCR. Em seguida, as reações foram incubadas a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 80 °C durante 20 minutos.

#### *Amplificação por SNaPshot® e genotipagem*

Os *primers* específicos para SNaPshot® foram confeccionados de acordo os parâmetros de qualidade do pacote do *software Geneious v5.2* (DRUMMOND et al., 2011; disponível em <http://www.geneious.com/>) e *Batchprimer3 v1*. Foram adicionadas caudas de diferentes comprimentos (poli TC) à suas extremidades 3', para que pudessem variar em tamanho de 22 a 81 pb (Tabelas 1 e 2 - Apêndice).

Os *primers* de base única (SBE) foram divididos em dois *mixes* para a realização da reação de SNaPshot®, de acordo com o delineamento das PCR multiplexes. As reações de SNaPshot® foram realizadas com o kit multiplex SNaPshot® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), seguindo as recomendações do fabricante, em um volume total de 8 µl, contendo 2,5 µl *Snapshot® mix*, 2,5 µl de amplicons de reação de PCR de multiplex e 1 µl da mistura de *primers* (as concentrações otimizadas de cada *primer* de base única adicionado foram apresentadas nas Tabelas 1 e 2 – Apêndice). As reações foram realizadas em termociclador Vereti™ 96-Well Thermal Cycler, com as seguintes condições: 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Os produtos amplificados foram purificados por adição de uma unidade de SAP na reação de SnaPshot®. Posteriormente, esta mistura foi incubada a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 75°C durante 15 minutos. Após a purificação, uma alíquota de 0,5µl SNaPshot® foi adicionada a 9,25 µl e de formamida Hi-Di® (*Applied Biosystems*) 0,25µl do padrão interno de tamanho GeneScan-120® LIZ (*Applied Biosystems*). As reações foram aquecidas a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, as foram submetidas a eletroforese capilar em sequenciador automático ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*). Os eletroferogramas gerados foram interpretados com o auxílio do GeneMapper Software v4.1 (*Applied Biosystems*).

#### *Análises estatísticas*

As frequências genotípica e alélica de cada marcador foram calculadas por contagem simples. O estudo dos efeitos dos genótipos de cada polimorfismo sobre as características avaliadas foi realizado utilizando-se uma análise de variância através do procedimento modelo linear geral (PROC GLM) do programa estatístico SAS v.9.3 (SAS Institute, 2003). O seguinte modelo misto foi aplicado:

$$Y_{i,j,k,l,m,n} = \mu + \text{exp}_j + \text{trat}_k(\text{exp}_j) + \text{ano}_l(\text{exp}_j) + \text{snp}_{mn} + e_{i,j,k,l,m,n}$$

Onde:

$Y$  – é o valor da variável observada na  $I$ -ésima repetição, do  $J$ -ésimo experimento, com  $K$ -ésimo tratamento, no  $L$ -ésimo ano;

$\mu$  – é a média de  $Y$ ;  $\text{exp}_j$  – efeito aleatório do  $J$ -ésimo experimento, sendo  $J$  variável de 1 – 4;

$\text{trat}_k(\text{exp}_j)$  – é o efeito aleatório do  $K$ -ésimo tratamento dentro do  $J$ -ésimo experimento, sendo  $K$  variável de 1 – 4;

$\text{ano}_l(\text{exp}_j)$  – é efeito aleatório do  $L$ -ésimo ano dentro do do  $J$ -ésimo experimento, sendo  $L$  variável de 1 – 2;

$\text{snp}_{mn}$  – é efeito fixo do  $N$ -ésimo genótipo do  $M$ -ésimo snp, e;

$e_{i,j,k,l,m,n}$  – é erro aleatório.

Quando detectados efeitos significativos para os polimorfismos no modelo, seus genótipos foram submetidos a comparação de médias pelo teste de Tukey Kramer ( $P < 0,05$ ).

### 3. Resultados

Os animais foram genotipados para 30 SNPs e as frequências genotípicas e alélicas podem ser encontradas na Tabela 2. Os SNPs (*HSP90AB1\_1* - rs594801080 e *CAST\_1* - rs602676579) foram monomórficos, observando-se que os alelos C de rs594801080 e G de rs602676579 estavam fixados na população estudada.

Dentre os polimorfismos avaliados, 10 apresentaram associação significativa com os dados referentes às avaliações de carcaça, rendimento e composição tecidual de cortes cárneos em cordeiros cruzados (Tabela 3). Observou-se que das 39 variáveis estudadas, 17 foram afetadas pelos genótipos dos SNPs testados, sendo que o rendimento de carcaça, o comprimento externo de carcaça, a proporção de músculo e de gordura na paleta apresentaram associação significativa com mais de um polimorfismo.

### *Associações significativas com medidas biométricas na carcaça*

Em relação às características biométricas medidas na carcaça, os animais com genótipo CC do polimorfismo *CAPN\_2* (rs428593688), apresentaram profundidade máxima de tórax superiores aos demais, sendo a diferença estimada de 2,54 cm em relação a TT e de 2,83 cm em comparação a TC. O comprimento externo de carcaça também foi maior para o genótipo CC, com diferença entre as médias de 7,54 cm em comparação ao homocigoto TT e 8,29 cm ao heterocigoto TC. O SNP *CAST\_3* (rs421224227) foi associado ao comprimento externo de carcaça, sendo que os homocigotos AA obtiveram um maior comprimento externo de carcaça (diferença de 1,84 cm) quando comparados a cordeiros AG (Tabela 3).

Em *ACACA\_1* (rs420069625), o heterocigoto CG apresentou um comprimento de perna significativamente maior que os demais, sendo a diferença estimada entre os genótipos CG e CC de 1,63 cm e entre CG e GG de 2,53 cm. Por sua vez, o SNP *EDGI\_2* (rs159669780) foi associado com a espessura de perna, onde cordeiros TT apresentaram média maior do que aqueles com o genótipo TC, com diferença de 1,33 cm (Tabela 3).

Os genótipos de *DGATI\_1* (rs410015353) influenciaram o comprimento externo e o comprimento interno de carcaça, onde os heterocigotos TC apresentaram medidas superiores aos homocigotos. As médias da profundidade mínima de tórax também variaram em função dos genótipos, sendo maior em indivíduos TC, seguido de CC e inferior para TT, com diferença de 0,88 cm em relação aos heterocigotos (Tabela 3).

### *Associações significativas com características quantitativas de carcaça*

No que concerne às características quantitativas de carcaça, os animais com genótipo TC do polimorfismo *DGATI\_1* (rs410015353) apresentaram pesos de carcaça superiores aos demais. A diferença estimada, para o peso de carcaça quente foi de 1,73 kg entre TC e TT e de 2,26 kg entre TC e CC. Para o peso de carcaça fria, os genótipos TC e TT diferiram em 1,68 kg e entre TC e CC em 2,19 kg (Tabela 3).

Os genótipos de *CAPN\_3* (rs160945890) e *CTSB\_1* (rs161888250) influenciaram o rendimento de carcaça dos cordeiros. Em *CAPN\_3* (rs160945890) os cordeiros com genótipo GG apresentaram um rendimento de carcaça superior a CG, com uma diferença estimada de 1,57 kg. Para o SNP *CTSB\_1* (rs161888250), os animais heterocigotos TC

apresentaram médias significativamente maiores em relação ao homozigoto CC, sendo que os genótipos diferiram em 1,13 kg no rendimento (Tabela 3).

Além disso, o polimorfismo *CAPN\_3* (rs160945890) também influenciou a colorimetria avaliada no músculo *longissimus*, verificando-se que o genótipo GG apresentou valor de  $a^*$  significativamente menor que CG (Tabela 3).

#### *Associações significativas com rendimento de cortes cárneos*

Quanto as associações referentes às proporções dos cortes na meia-carcaça, identificou-se que os heterozigotos TC do polimorfismo *CTSB\_1* (rs161888250) apresentaram a proporção do corte do carré 0,66% superior em comparação ao genótipo CC. Além disso, os indivíduos com genótipo AA do SNP *CAST\_3* (rs421224227), apresentaram maior proporção de costela, com diferença estimada de 1,24% em relação a AG (Tabela 3).

O SNP *UCP2\_1* (rs160723758) também foi relacionado com a proporção do carré na meia-carcaça. Os genótipos TC e CC foram 1,34% e 1,30% superiores em relação ao rendimento deste corte, quando comparados a TT (Tabela 3).

Os genótipos do polimorfismo *GHRL\_1* (rs428757090) apresentaram associação com a proporção do lombo, sendo que AG e AA obtiveram proporções significativamente maiores deste corte cárneo em relação a GG, com diferença de 1% e 0,63%, respectivamente (Tabela 3).

#### *Associações significativas com a composição tecidual nos cortes*

O polimorfismo *MC1R\_1* (rs409651063) apresentou relação com a composição de tecidual de diferentes cortes. Animais com o genótipo GG apresentaram aumento na proporção de gordura na paleta de 5,83% em relação à AG. Por consequência, observou-se no homozigoto GG a redução de 4,23% na proporção de músculo na paleta, e de 3,47% no pernil (Tabela 3).

Os genótipos do polimorfismo *DGATI\_1* (rs410015353) influenciaram a proporção de músculo e gordura no corte da paleta. Houve um incremento de 8,91% na proporção de tecido adiposo e uma redução de 6,68% de tecido muscular comparando os genótipos CC com TC (Tabela 3).



#### 4. Discussão

As características de carcaça e qualidade da carne são complexas, pois envolvem a ação de múltiplos genes e são influenciadas por uma variedade de fatores (DUNNER et al, 2015). Dessa forma, as ferramentas moleculares buscam trazer informações que colaborem na compreensão da variação genética, e assim, incrementar a eficiência e qualidade dos produtos.

O conjunto de polimorfismos testados neste estudo está localizado em genes que tem participação biológica conhecida, descrita na literatura, para várias características de interesse econômico na criação de ovinos. Alguns dos SNPs selecionados ainda não haviam sido explorados na espécie ovina, ou mesmo, associados com características de carcaça e carne. Isto denota que, apesar dos avanços no estudo da fisiologia envolvida nessas características, o conhecimento ainda é incompleto e existem redes genéticas que devem ser melhor compreendidas. A avaliação de uma ampla variedade de locos candidatos, selecionados por suas atuações fisiológicas, com características relacionadas à carcaça e qualidade de carne ovina, pode fornecer importantes informações para auxiliar nas estratégias de seleção.

##### *Associações significativas com medidas biométricas na carcaça*

Os SNPs localizados nos genes *CAPN* e *CAST* foram significativamente associados à algumas medidas biométricas da carcaça. O sistema calpaína-calpastatina é muito conhecido por influenciar processos importantes no amaciamento *post mortem* da carne. No entanto, além desta função este complexo está envolvido no desenvolvimento e crescimento, devido sua participação imprescindível no *turnover* proteico (KOOHMARAIE & GEESINK, 2006).

Os genótipos do polimorfismo *CAPN\_2* (rs428593688) foram associados com a profundidade máxima de tórax e comprimento externo de carcaça e, por sua vez, o SNP *CAST\_3* (rs421224227) foi associado ao comprimento externo de carcaça. Os genótipos CC de *CAPN\_2* e AA de *CAST\_3* parecem estar relacionados a animais de estrutura (*frame size*) maior, sendo mais compridos e profundos. Tal fato, conforme observado na literatura, pode influenciar em pesos de carcaças maiores, aumento no rendimento de cortes e maior gordura de cobertura, no entanto, estes animais podem ser mais tardios (ROSA et al., 2014; FIGUEREDO et al., 2019).

Os genótipos do polimorfismo *ACACA\_1* (rs420069625) apresentaram efeito significativo sobre o comprimento de perna dos cordeiros, sendo observado um efeito de sobredominância do heterozigoto CG. O gene *ACACA*, está localizado no cromossomo 11 de ovinos e codifica a enzima acetil-CoA carboxilase  $\alpha$ , envolvida na adipogênese, lipogênese e gliconeogênese (GERLANDO et al., 2017). Um trabalho anterior com a espécie bovina, por exemplo, relatou que este gene foi associado ao aumento no peso vivo de abate e ao peso da carcaça (SHIN et al., 2011).

Apesar da associação encontrada neste trabalho ser distinta da relatada anteriormente na literatura, o papel regulador do gene *ACACA* no metabolismo de energia pode ter exercido influência no crescimento dos cordeiros, resultando em variações no comprimento da perna em função dos genótipos dos animais. Como a perna possui maior quantidade de massa muscular, maiores comprimentos associados a um maior rendimento da parte comestível nesta região, poderão refletir em um aumento do rendimento da carcaça (ARAÚJO et al., 2007), indicando que esta é uma característica que tem potencial para ser trabalhada em programas de melhoramento.

O SNP de *EDGI\_2* (rs159669780) foi associado com a espessura de perna. O gene da diferenciação endotelial, receptor acoplado à proteína G do esfingolípídeo 1 (*EDGI*), está localizado no cromossomo 1 de ovinos e atua na formação de vasos sanguíneos. Polimorfismos identificados no gene *EDGI* em bovinos, foram relacionados a características como marmoreio e espessura de gordura nas raças Wagyu e Hanwoo (YAMADA et al., 2009; CAHYADI et al., 2012; SHIN et al., 2012). Em ovinos até o momento, existe apenas um trabalho publicado com polimorfismos de *EDGI*, onde foi constatada sua associação com a deposição de gordura na cauda de cordeiros de raças iranianas (MOHAMMADI et al., 2016).

Devido sua participação na angiogênese, o gene *EDGI* tem efeito direto sobre a irrigação sanguínea, que por sua vez, regula o transporte de nutrientes e de oxigênio no organismo. Este fator é determinante tanto para o desenvolvimento dos tecidos adiposos, conforme relatado pela literatura, quanto para o muscular, o que pode ter influenciado as diferenças na espessura da perna dos cordeiros.

O SNP *DGATI\_1* (rs410015353) também influenciou algumas características biométricas na carcaça. A enzima diacilglicerol aciltransferase 1, codificada pelo gene *DGATI*, catalisa a etapa final da síntese de triglicerídeos, assim como regula a concentração plasmática destes componentes, além de participar do metabolismo energético no músculo e na produção de leite (NOSHAHR et al. 2014, ARMSTRONG et

al., 2017). Este gene tem sido estudado massivamente como um gene candidato às características de carcaça e qualidade de carne (XU et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2013, NOSHAHR et al. 2014; ARDICLI et al., 2017, TRAKOVICKA et al., 2019). Neste trabalho, houve um efeito de sobredominância do genótipo TC em relação aos homozigotos, tanto para comprimento externo quanto para comprimento interno de carcaça. Apenas para profundidade mínima de tórax não foi possível constatar este efeito, mas ainda assim, o heterozigoto apresentou média elevada, acompanhando as demais medidas.

#### *Associações significativas com características quantitativas de carcaça*

No tocante à influência dos polimorfismos sobre características quantitativas de carcaça, destaca-se primeiramente os genótipos de *DGATI\_1* (rs410015353), que foram relacionados às variações nos pesos de carcaça quente e pesos de carcaça fria, sendo que os heterozigotos TC apresentaram médias significativamente maiores que os demais genótipos. Portanto, verificando-se todas as associações encontradas para o heterozigoto TC, é possível constatar que o genótipo está relacionado com animais com medidas corporais maiores e mais pesados.

Estudos de associação realizados anteriormente, com o SNP *DGATI\_1* (rs410015353), também relataram sua influência no peso de carcaça de ovinos de raças iranianas, entretanto, nestas populações os animais de genótipo CC apresentaram as carcaças mais pesadas (MOHAMMADI et al., 2013, NOSHAHR et al. 2014). Provavelmente, este cenário contrastante, se deve ao fato de o presente trabalho ter utilizado animais cruzados para as análises. É importante destacar que estes resultados evidenciam um ponto crucial para a seleção assistida por marcadores: os polimorfismos devem ser validados antes de sua aplicação em programas de melhoramento, pois podem existir diferenças na associação de seus genótipos entre raças/populações.

Os genótipos de *CAPN\_3* (rs160945890) influenciaram o rendimento de carcaça dos cordeiros. O gene *CAPN*, mapeado no cromossomo 14 codifica a calpaína. Os polimorfismos no gene desta protease têm sido há alguns anos avaliados em estudos envolvendo a maciez da carne, porém também foram relacionados a características de crescimento e ao rendimento de cortes, como paleta e pernil de ovinos (BICKERSTAFFE, et al., 2008; MOHAMMADI et al., 2008; DEHNAVI et al., 2016). Isso ocorre, pois, a taxa de crescimento muscular depende do *turnover* proteico, ou seja, da relação entre o

metabolismo e catabolismo proteico. A hipótese é que a deposição proteica ocorre quando a síntese de proteínas aumenta ou a quando taxa de degradação diminui, dessa forma, as proteases estão intimamente ligadas com crescimento e ganho de peso (BARACOS, 2005), justificando a associação encontrada neste trabalho.

Além disso, o polimorfismo *CAPN\_3* (rs160945890) foi relacionado ao valor de  $a^*$  no músculo. Neste trabalho, os animais com genótipo GG, que apresentaram melhor rendimento de carcaça, tiveram uma redução na intensidade de vermelho medido no músculo *longissimus*. Dessa forma, foi sugerido que animais maiores e mais pesados possuem maior número de fibras brancas no *longissimus dorsi*, levando à redução da intensidade de vermelho neste músculo.

Esta condição foi relatada na literatura com a espécie bovina, onde os animais mais pesados apresentaram um número significativamente maior de fibras glicolíticas tipo IIB (brancas) em comparação a oxidativas tipo I (vermelhas) (ARRIGONI et al. 2004). Em suínos, por exemplo, foi constatado que a seleção visando o aumento da deposição de músculo leva ao aumento na frequência de fibras glicolíticas tipo IIB, que possuem um diâmetro maior (LEE et al., 2016). Portanto, é possível que neste trabalho, um processo semelhante de desenvolvimento de fibras musculares tipo IIB tenha ocorrido no *longissimus* de cordeiros de maior rendimento de carcaça.

Por sua vez, o polimorfismo *CTSB\_1* (rs161888250) também foi relacionado com o rendimento de carcaça. O gene *CTSB* codifica a catepsina B, uma protease presente principalmente nos lisossomas dos músculos esqueléticos, que possui envolvimento nos processos de degradação e síntese proteica, sendo a actina, miosina e proteínas do tecido conectivo, seus principais substratos (BALATSKY et al., 2016). Apesar de existirem poucas investigações para ovinos e bovinos, o gene da catepsina B foi estudado de forma vasta na espécie suína, sendo relacionado ao ganho de peso, AOL, e assim como neste trabalho, ao rendimento de carcaça (RUSSO et al., 2008; RUSSO et al., 2002, PROMKET et al., 2019).

As associações de *CAPN\_3* (rs160945890) e *CTSB\_1* (rs161888250) com os rendimentos de carcaça indicam a importante participação que essas proteases exercem no crescimento e deposição de tecido muscular na carcaça de ovinos. Além disso, estas enzimas apresentam um papel determinante na maturação *post mortem*, porém neste trabalho, não foram encontradas associações com a força de cisalhamento no *longissimus dorsi*. Foram avaliados polimorfismos nos genes da calpaína (*CAPN*) e seu inibidor calpastatina (*CAST*), da catepsina B (*CTSB*), bem como o gene lisil oxidase (*LOX*), um

gene candidato à maciez devido seu papel no desenvolvimento das fibras de colágeno e elastina (BARENDSE, 2002). Ocorre que os animais avaliados neste trabalho eram jovens, com idade de abate entre 5 e 8 meses, resultando em uma carne mais tenra com média de força de cisalhamento de 3,41 kgf. Este fator pode ter levado à ausência de associações com os genótipos dos polimorfismos mais prováveis.

#### *Associações com rendimento dos cortes cárneos*

Os genótipos dos SNPs *CTSB\_1* (rs161888250) e *CAST\_3* (rs421224227) foram associados ao rendimento dos cortes do carré e da costela na meia-carcaça esquerda dos cordeiros. As proteases possuem participação fundamental na deposição de tecido muscular, por isso existe interesse em diferentes estratégias para aumentar ou modular a taxa de crescimento animal, envolvendo principalmente, a melhor compreensão da relação entre os índices de síntese de proteínas e o catabolismo no músculo esquelético. Por exemplo, o crescimento muscular parece ser acelerado em cordeiros com fenótipo *Callipyge*, pela redução da degradação proteica, observando-se que a atividade da calpastatina é cerca de 80% maior nestes animais (KOOHMARAIE et al., 1995). Em bovinos, inferiu-se que a menor degradação de proteínas, juntamente com uma tendência à redução na taxa metabólica dos animais, poderia ser responsável pelo aumento da deposição de proteínas e conseqüentemente uma taxa de crescimento maior (BARACOS, 2005).

Dessa maneira, sugere-se que eventos de regulação do *turnover* proteico e aumento da deposição de músculo possam ter influenciado os resultados superiores nas proporções do carré e costela para os indivíduos com genótipos TC para o SNP *CTSB\_1* (rs161888250) e AA para o *CAST\_3* (rs421224227).

Os genótipos do SNP *UCP2\_1* (rs160723758) foram relacionados com a proporção do carré na carcaça, sendo observado o efeito de dominância do alelo C. As proteínas desacopladoras 2 (*UCP2*) pertencem à uma família de proteínas transportadoras de membrana mitocondrial e são reguladoras centrais da homeostase energética (WANG et al., 2016). Um grupo de cinco proteínas *UCP* (*UCP1-5*) foi identificado exibindo distribuições teciduais distintas entre si. Em humanos, a proteína desacopladora 2 demonstrou estar envolvida na secreção de insulina, regulação da taxa metabólica basal, da massa muscular e da gordura corporal (BOUCHARD et al., 1997). A partir dessas premissas, as investigações dos efeitos de polimorfismos do gene *UCP2* em bovinos,

relataram sua associação com o aumento de várias características como o peso corporal, espessura de gordura subcutânea, proporção de cortes magros, AOL e a gordura intramuscular (SHERMAN et al., 2008; WANG et al., 2016).

Apesar dos SNPs deste gene já ser explorado há algum tempo em bovinos, não foram encontrados registros de estudos de associação de com características fenotípicas em ovinos, portanto este parecer ser o primeiro trabalho avaliando um polimorfismo deste gene para a espécie. Considerando a participação gene *UCP2* na modulação da secreção insulina, é plausível que estes resultados tenham sido influenciados por diferenças no metabolismo energético entre os animais, causando diferenças no rendimento do corte do carré. No entanto, são necessárias mais investigações com polimorfismos deste gene e seus efeitos nas características de carcaça e carne de ovinos, para melhor compreensão das associações encontradas.

Além dessas associações encontradas, existem alguns grupos de genes parecem ter grande potencial para influenciarem variáveis ligadas às carcaças e aos cortes cárneos. São os genes que codificam proteínas envolvidas no eixo somatotrópico, relacionados ao sistema de controle da secreção do hormônio do crescimento e seus fatores endógenos, que regulam o crescimento, metabolismo e particionamento energético (BAHRAMI et al., 2013). Nesta rede genética está incluso o gene *GHRL*, que codifica a grelina, localizando-se no cromossomo 19 de ovinos.

O principal papel do hormônio grelina é a regulação da ingestão de alimento, peso corporal e motilidade gastrointestinal (MAHMOUD et al., 2016). Em ovinos, os polimorfismos de *GHRL* foram associados com características de crescimento (TAHMOORESPUR et al., 2010) e, em bovinos com eficiência alimentar (SHERMAN et al., 2008). Os genótipos do polimorfismo *GHRL\_1* (rs428757090) apresentaram associação com a proporção do lombo na meia-carcaça.

A proporção do corte do lombo está correlacionada positivamente com o peso de abate dos animais, isto porque considerando o desenvolvimento tecidual da carcaça ovina de forma isolada, o lombo é uma região de crescimento tardio e dependente do peso do animal (PINHEIRO et al., 2007). Deste modo, sendo a grelina participante do eixo somatotrópico, é esperado que seus genótipos possam causar variações nas proporções dos cortes cárneos devido aos efeitos no crescimento animal. Particularmente, observa-se neste caso um efeito de dominância do alelo A, e que a substituição de A>G identificada neste polimorfismo gera uma redução da característica influenciada.

Embora o corte do lombo tenha uma representatividade pequena em relação a outros cortes da carcaça, é uma das peças com maior valor de venda (PINHEIRO et al., 2007). Portanto, estratégias utilizando informações moleculares para incrementar essa característica podem ser consideradas.

#### *Associações significativas com a composição de tecidual nos cortes*

Além do o eixo somatotrópico, existem outros eixos hormonais envolvidos no metabolismo intermediário e nos processos de crescimento animal, que podem atuar de diferentes formas sobre características de carcaça e da carne, são eles: a insulina, os hormônios tireóideos, os glucocorticóides, os esteróides sexuais e o eixo melanocortina-leptina (PATIÑO & VAN CLEEF, 2010).

Em especial, a família da melanocortina consiste de cinco genes que codificam receptores acoplados à proteína G, MC1R-MC5R. Em humanos, o MC1R é expresso nos melanócitos, o MC2R no tecido adrenal e adiposo, o MC3R no cérebro, placenta e pâncreas, o MC4R no cérebro, músculo e tecido adiposo e o MC5R é expresso na maioria dos tecidos (YEO et al., 2000). Juntos, os receptores de melanocortina regulam a pigmentação, lipólise, ingestão de alimentos, peso corporal, termogênese, comportamento sexual e efeitos anti-inflamatórios (VOISEY & VAN DAAL, 2002).

Neste estudo de associação houve a inclusão do SNP *MC1R\_1* (rs409651063), devido a relação do gene com as características de adaptabilidade em ovinos. Nesta espécie, os polimorfismos de *MC1R* foram relacionados à pigmentação cutânea e pilosa, sendo utilizados em estudos de caracterização de populações, adaptabilidade e termotolerância (FONTANESI et al., 2010; HEPP et al., 2015). No entanto, no presente trabalho, o polimorfismo *MC1R\_1* (rs409651063) apresentou relação a composição tecidual dos cortes cárneos, sendo que animais com o genótipo GG apresentaram aumento da proporção de gordura na paleta e redução das proporções de músculo na paleta e no pernil.

Apesar do gene *MC1R* ser expresso preferencialmente nos melanócitos e estar relacionado à pigmentação nos animais, as associações do SNP *MC1R\_1* encontradas neste trabalho, justificam-se pelo fato do gene pertencer à família das melancortinas, que possuem atuação sobre várias características produtivas, principalmente pelos efeitos regulatórios que exercem sobre a leptina (SEONG et al., 2012; SWITONSKI et al., 2013). Portanto, *MC1R\_1* poderia estar atuando de forma indireta nas características de carcaça.

Uma série de estudos de associação, denotam a estreita ligação entre os genes que codificam as melacortinas e as vias metabólicas que influenciam algumas características de carcaça, desempenho e qualidade de carne em várias espécies. Por exemplo, os polimorfismos identificados no gene *MC2R*, apresentaram relação com o grau de marmoreio e espessura de gordura em suínos (JACOBS et al. 2002). Estudos com *MC3R* relataram sua associação com o ganho de peso médio diário de suínos (WEISZ et al., 2011). Os SNPs no gene *MC4R* possuem associação bastante conhecida ao ganho de peso e obesidade precoce em humanos (LIU et al., 2010). Em bovinos e suínos, foram relatadas associações do gene *MC4R* ao peso de carcaça, espessura de gordura e com a gordura intramuscular (LIU et al., 2010; SEONG et al., 2012; CHOI et al., 2016; ZHAO et al., 2018). Por sua vez, os polimorfismos do gene *MC5R* demonstraram efeito sobre o ganho de peso diário e deposição de gordura em suínos (EMNETT et al. 2001; KOVÁČIK et al., 2012)

As associações encontradas neste estudo sugerem que as melacortinas também podem influenciar características importantes na carcaça de ovinos. Até o momento, apenas polimorfismos de *MC4R* foram avaliados na espécie, sendo relacionados ao aumento do peso corporal e algumas medidas morfológicas *in vivo* (SHISHAY et al., 2019). Diante disso, observa-se a importância da realização de mais estudos para compreensão do efeito deste grupo de genes sobre os traços de interesse econômico para a ovinocultura.

Os genótipos do SNP *DGAT\_1* (rs410015353) também foram relacionados à variação da composição tecidual na paleta. Os cordeiros com genótipo TC apresentaram maior proporção de gordura e conseqüentemente redução na proporção de músculo neste corte. É possível que estes resultados estejam relacionados à função de armazenamento de ácidos graxos em adipócitos exercida pelas aciltransferases, sendo este um fator determinante para a variação na deposição de gordura no corpo do animal (NOSHAHR et al. 2014). Outros estudos de associação, de forma semelhante, relatam a influência de genótipos de *DGATI* com a espessura de gordura subcutânea e proporção de gordura na carcaça, bem como a influência no escore de gordura intramuscular na carne ovina (XU et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2013; ARMSTRONG et al., 2017).

Por fim, o presente estudo confirmou algumas associações já relatadas pela literatura e identificou algumas ainda não documentadas. No entanto, algumas associações consideradas prováveis não foram observadas. Especificamente, eram esperadas relações entre as características relacionadas à carcaça e carne com os polimorfismos nos genes da



leptina (*LEP*) e da miostatina (*GDF8*), assim como, com outros genes que participam do eixo somatotrópico (*GH*, *GHR* e *IGF1*), porém não houve efeito dos genótipos dos SNPs selecionados na população avaliada.

Apesar de *MC1R\_1* (rs409651063) apresentar efeito significativo sobre algumas características avaliadas, o mesmo não foi encontrado para outros SNPs em genes relacionados à adaptabilidade de ruminantes ao calor, como *ATP1A1\_1* (rs599122362), *HSPB90AB1\_1* (rs594801080), *HSPB8\_1* (rs160860233) e *MC1R\_2* (rs160910030). As respostas fisiológicas ao estresse térmico causam alteração no perfil hormonal, levando ao aumento de hormônios anabólicos e catabólicos e redução de hormônios do eixo somatotrópico, alteram particionamento de nutrientes e o metabolismo lipídico, energético e proteico (BERNABUCCI et al, 2010). Dessa maneira, podem influenciar de forma negativa as características produtivas em vários níveis. As redes genéticas responsáveis por esses mecanismos de resposta ainda não foram bem compreendidas, sendo assim, mais estudos nesta linha devem ser considerados.

## 5. Conclusão

Entre os polimorfismos testados, dez apresentaram associações com as características de carcaça, rendimento e composição tecidual de cortes de ovinos cruzados. Os polimorfismos selecionados nos genes *ACACA*, *CAST*, *CAPN*, *CTSB*, *DGAT1*, *EDG1*, *GHRL*, *MC1R* e *UCP2* podem influenciar positivamente pesos, rendimento e algumas medidas biométricas de carcaça, rendimento dos cortes do carré, costela e lombo, além das proporções de músculo e gordura na paleta e pernil de cordeiros.

Os dados obtidos têm potencial para oferecer à comunidade científica um ponto de partida para o estudo de algumas redes genéticas complexas que participam da expressão de características economicamente importantes e fornecer informações moleculares para programas de melhoramento genético que busquem adequar as carcaças e os cortes cárneos de ovinos, afim de melhorar a rentabilidade da produção e atender o perfil desejado pelo mercado consumidor.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, à Embrapa Gado de Corte e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 6. Referências

ARAÚJO, J. T. et al. Adding value in lambs carcass by using special cuts. **Revista Científica de Produção Animal**, v.9, n.2, 2007.

ARDICLI, S. et al. Effects of polymorphisms at *LEP*, *CAST*, *CAPNI*, *GHR*, *FABP4* and *DGAT1* genes on fattening performance and carcass traits in Simmental bulls. **Archiv fuer Tierzucht**, v. 60, n. 2, p. 61, 2017.

ARMSTRONG, E. et al. Novel genetic polymorphisms associated with carcass traits in grazing Texel sheep. **Meat Science**, v. 145, p. 202-208, 2018.

ARRIGONI, M.B. et al. Performance, muscle fibers and meat traits of young bulls of three genetic groups. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 1033-1039, 2004.

BAHRAMI, A. et al. Genetic polymorphisms and protein structures in *growth hormone*, *growth hormone receptor*, *ghrelin*, *insulin-like growth factor 1* and *leptin* in Mehraban sheep. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 397-404, 2013.

BARACOS, V. E. Whole animal and tissue proteolysis in growing animals. In: **Biology of Growing Animals**. Elsevier, 2005. p. 69-82.

BARENDSE, W.J. Barendse, W. DNA markers for meat tenderness. International patent application PTC/AU02/00122 International patent application WO 02/064820 A1, World International Property Organization. 2002.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167-1183, 2010.

BICKERSTAFFE, R. et al. The association between polymorphic variations in calpain 3 with the yield and tenderness of retail lamb meat cuts. In: **Proceedings of 54th International Congress of Meat Science and Technology**, Helsinki, Finland. 2008. p. 1-4.

BOUCHARD, C.; MALINA, R.; PÉRUSSE, L. **Genetics of Fitness and Physical Performance**. Human Kinetics, 1997, 400p.

CAHYADI, M. et al. Identification of SNPs in *TG* and *EDG1* genes and their relationships with carcass traits in Korean cattle (Hanwoo). **CNU Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 3, p. 355-349, 2012.

CALVO, J. H. et al. Association of the heart fatty acid-binding protein (*FABP3*) gene with milk traits in Manchega breed sheep. **Animal genetics**, v. 35, n. 4, p. 347-349, 2004.

CHOI, J.S. et al. Relationships between single nucleotide polymorphism markers and meat quality traits of duroc breeding stocks in korea. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 9, p. 1229, 2016.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Animal biotechnology. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

DEHNAVI, E., AHANI AZARI, M., HASANI, S., NASSIRI, M., MOHAJER, M., KHAN AHMADI, A.R., SHAHMOHAMADI, L., YOUSEFI, S. Association between Yearling Weight and *Calpastatin* and *Calpain* Loci Polymorphism in Iranian Zel Sheep, **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.2, n.2, p.131-135, 2012.

DUNNER, S. et al. Association of genes involved in carcass and meat quality traits in 15 European bovine breeds. **Livestock Science**, v. 154, n. 1-3, p. 34-44, 2013.

EMNETT, R. et al. Association studies with leptin receptor, melanocortin-4 receptor, melanocortin-5 receptor, and peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ . **Research and Reviews: Swine 2001 OARDC Special Circular**, v. 185, p. 57-63, 2001.

FIGUEREDO, G.C. et al. Morphofunctional characteristics of Dorper sheep crossed with Brazilian native breeds. **Small Ruminant rResearch**, v. 170, p. 143-148, 2019.

FONTANESI, L. et al. Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus. **Small Ruminant Research**, v. 91, n. 2-3, p. 200-207, 2010.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene. **Small Ruminant Research**, v. 90, n. 1-3, p. 34-40, 2010.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Genetic variability of the *Stearoyl-CoA desaturase* gene in sheep. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 2, p. 107-111, 2009.

GERLANDO, R. et al. Full-length sequencing and identification of novel polymorphisms in the *ACACA* gene of Valle del Belice sheep breed. **Journal of Genetics**, v. 96, n. 4, p. 591-597, 2017.

GILL, J.L. et al. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, p. 36, 2009.

HAN, J. et al. Myostatin (*MSTN*) gene haplotypes and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney lambs. **Small Ruminant Research**, v. 127, p. 8-19, 2015.

HEPP, D. et al. Prediction of the damage-associated non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the human *MC1R* gene. **PloS one**, v. 10, n. 3, 2015.

IBEAGHA-AWEMU, E.M. et al. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v.19, n.9, 591-617, 2008.

JACOBS, K. et al. Characterization of the porcine melanocortin 2 receptor gene (*MC2R*). **Animal genetics**, v. 33, n. 6, p. 415-421, 2002.

KOOHMARAIE, M. et al. A muscle hypertrophy condition in lamb (*callipyge*): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of animal science**, v. 73, n. 12, p. 3596-3607, 1995.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 34-43, 2006.

KOVÁČIK, A. et al. The effect of the porcine melanocortin-5 receptor (*MC5R*) gene associated with feed intake, carcass and physico-chemical characteristics. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, n. 4, p. 498, 2012.

LEE, Sang Hoon et al. Effects of morphological characteristics of muscle fibers on porcine growth performance and pork quality. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 5, p. 583, 2016.

LIU, Y.X. et al. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 891-896, 2010.

LÔBO, R.N.B.; LÔBO, A.M.B.O. Animal breeding as a tool for upgrowth and development of meat sheep sector, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 247-253, 2007.

MAHMOUD, A.H. et al. Molecular Characterization of *Ghrelin* gene in sheep of Saudi Arabia. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 39-44, 2016.

MARQUES, M. R. et al. Effects of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. **Journal of dairy research**, v. 73, n. 4, p. 394-405, 2006.

MOHAMMADI, H., SHAHREBABAK, M., SADEGHI, M. Association between single nucleotide polymorphism in the ovine *DGATI* gene and carcass traits in two iranian sheep breeds. **Animal Biotechnology**, v.24, n.3, 2013.

MOHAMMADI, M. et al. Molecular genetics and bioinformatics analysis of *EDG1* and *AKIRIN2* genes in Iranian fat-tailed and nonfat-tailed sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 144, p. 263-268, 2016.

MOHAMMADI, M., et al. Polymorphism of *calpastatin* gene in Arabic sheep using PCR-RFLP. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.2682-2684, 2008.

MORENO, G.M.B. et al. Lamb meat quality: genotype and nutritional handling. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.19, n.3, 2016.

NASIRI, M. R. et al. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, 2006.

NOSHAHR, F. Ala et al. Polymorphism of *DGATI* gene and its relationship with carcass weight and dressing percentage in Moghani sheep breed. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 4, n. 2, p. 331-334, 2014.

PARISET, L. et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 290-292, 2006.

PATIÑO, RENE; VAN CLEEF, E.R.I.C. Key aspects of growth in sheep. **Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA**, p. 399-421, 2010.

PINHEIRO, R.S.B. et al. Tecidual composition of carcass of cuts of young and adult sheep. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 565-571, 2007.

PROMKET, D. et al. Investigation of cathepsin b (*CTSB*) and cathepsin l (*CTSL*) polymorphism for carcass and meat quality in swine. **International Journal**, v. 17, n. 61, p. 91-96, 2019.

REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 205p.

ROSA, B.L. et al. Correlations between corporate measurements and carcass characteristics of feedlot finished Nellore bulls. **Bulletin of Animal Husbandry**, v. 71, n. 4, p. 371-380, 2014.

RUSSO, V. et al. Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (*CTSB*) and cystatin B (*CSTB*) genes. **Animal Genetics**, v. 33, n. 2, p. 123-131, 2002.

RUSSO, V. et al. Single nucleotide polymorphisms in several porcine *cathepsin* genes are associated with growth, carcass, and production traits in Italian Large White pigs. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 12, p. 3300-3314, 2008.

SAILO, L. et al. Association of single nucleotide polymorphism of *HSP90AB1* gene with thermotolerance and milk yield in Sahiwal cows. **African Journal Biochemistry Research**, v. 9, p. 99-103, 2015.

SAÑUDO, C.; SIERRA, I. Calidad de la canal en la especie ovina. **Ovino**, v.1, p.127-153, 1986.

SEONG, J. et al. Identification and analysis of *MC4R* polymorphisms and their association with economic traits of Korean cattle (Hanwoo). **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3597-3601, 2012.

SHERMAN, E.L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine *neuropeptide Y*, *growth hormone receptor*, *ghrelin*, *insulin-like growth factor 2*, and *uncoupling proteins 2 and 3* genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1–16, 2008.

SHIN, S., CHUNG, E. Effect of single nucleotide polymorphism of endothelial differentiation G-Protein coupled receptor 1 (*EDGI*) gene on marbling score in Hanwoo. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 32, n. 6, p. 776-782, 2012.

SHIN, S. et al. Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of *Acetyl-CoA Carboxylase  $\alpha$*  (*ACACA*) Gene on Carcass Traits in Hanwoo (Korean Cattle). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.24, n.6, p.744-751, 2011.

SHISHAY, G. et al. Variation in the Promoter Region of the *MC4R* Gene Elucidates the Association of Body Measurement Traits in Hu Sheep. **International journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 240, 2019.

SMITH, T.P.L. et al. Bovine *CAPNI* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 10, p. 2589-2594, 2000.

SWITONSKI, M.; MANKOWSKA, M.; SALAMON, S. Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals—mutations, polymorphisms and phenotypic effects. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 461-472, 2013.

TAHMOORESPUR, M., TAHERI, A., VALEH, M.V., SAGHI, D.A., ANSARY, M. Assessment relationship between leptin and ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding values (EBVs) of growth traits in Baluchi sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.19, p.2460-2465, 2010.

TRAKOVICKA, A. et al. The impact of *diacylglycerol O-acyltransferase 1* gene polymorphism on carcass traits in cattle. **Journal of Central European Agriculture**, v. 20, n. 1, p. 12-18, 2019.

VERMA, N., GUPTA, I.D., VERMA, A. Novel SNPs in HSPB8 gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 175, 2016.

VOISEY, J.; VAN DAAL, A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat. **Pigment cell research**, v. 15, n. 1, p. 10-18, 2002.

WANG, Yaning et al. Association and expression analyses of the *UCP2* and *UCP3* gene polymorphisms with body measurement and meat quality traits in Qinchuan cattle. **Journal of Genetics**, v. 95, n. 4, p. 939-946, 2016.

WEISZ, F. et al. Association analysis of seven candidate genes with performance traits in Czech Large White pigs. **Czech Journal of Animal Science**, v. 56, n. 8, p. 337-344, 2011.

WU, J. et al. SNP variation in *ADRB3* gene reflects the breed difference of sheep populations. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8395-8403, 2012.

XU, Q.L., CHEN, Y.L., MA, R.X., XUE, P. Polymorphism of *DGATI* associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. **Journal Science Food Agriculture**, v.89, p.232-237, 2009.

YAMADA, T. et al. Novel SNP in 5' flanking region of *EDGI* associated with marbling in Japanese Black beef cattle. **Animal Science Journal**, v. 80, n. 4, p. 486-489, 2009.

ZHANG, S., KNIGHT, T.J., REECY, J.M., BEITZ, D.C. DNA polymorphisms in bovine *fatty acid synthase* are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, v.39, p.62-70, 2008.

ZHAO, X.L. et al. Association analysis of *MC4R* gene polymorphisms and genotype combination with growth traits of Tibetan sheep (*Ovis aries*). **Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 429-436, 2018.

ZHOU, H.; HICKFORD, J. G.; FANG, Q. Single nucleotide polymorphisms of the ovine calpain 3 (*CAPN3*) gene. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, n. 1, p. 78, 2007.

**Tabela 1.** Número de observações para cada avaliação realizada, média, desvio padrão e coeficiente de variação das características de carcaça e qualidade de carne avaliadas em ovinos cruzados.

Variáveis	n	Média	Desvio Padrão	CV%
Peso de abate (kg)	151	43,07	8,99	16,34
Peso de carcaça quente (kg)	151	20,93	5,11	16,49
Peso de carcaça fria (kg)	151	20,17	5,06	16,77
Perda por resfriamento da carcaça (%)	151	3,72	2,68	37,58
Rendimento de carcaça (%) <sup>1</sup>	151	48,24	4,27	4,93
pH 0h	76	6,12	0,35	5,29
pH 24h	76	5,74	0,27	1,70
Comprimento externo de carcaça (cm)	151	80,52	13,37	5,58
Comprimento interno de carcaça (cm)	151	62,39	5,16	5,87
Profundidade externa de tórax (cm)	117	23,08	3,42	6,19
Profundidade interna de tórax (cm)	131	19,43	3,95	7,65
Comprimento de perna (cm)	151	36,69	5,89	7,14
Espessura da perna (cm)	75	10,82	1,46	13,73
Espessura de gordura subcutânea (mm)	151	4,28	2,53	34,61
Área de olho de lombo (cm <sup>2</sup> )	151	15,86	3,70	16,93
Carré (%)	129	10,20	2,70	24,63
Costela (%)	129	15,51	2,71	20,23
Lombo (%)	129	8,90	2,50	19,51
Paleta (%)	129	18,32	1,83	19,77
Pernil (%)	129	31,32	2,82	16,25
Pescoço (%)	129	7,60	0,31	26,82
Fraldinha (%)	129	6,33	1,39	25,92
pH <i>longissimus</i>	119	5,60	0,35	5,79
Perda por Descongelamento do <i>longissimus</i> (%)	131	6,62	2,99	40,22
Perda por Cocção do <i>longissimus</i> (%)	131	22,50	8,47	20,86
Marmoreio	151	6,57	2,97	39,79
L* músculo <sup>2</sup>	131	38,36	3,11	8,20
a* músculo <sup>2</sup>	131	16,05	2,26	11,26
b* músculo <sup>2</sup>	131	8,55	3,51	17,09
L* gordura <sup>2</sup>	131	75,87	6,55	4,25
a* gordura <sup>2</sup>	131	3,36	2,37	47,88
b* gordura <sup>2</sup>	131	12,04	5,85	20,96
Força de Cisalhamento (kgf)	151	3,41	1,71	32,02
Proporção de músculo na paleta (%)	20	57,61	3,81	6,84
Proporção de gordura na paleta (%)	20	24,78	5,09	21,12
Proporção de osso na paleta (%)	20	17,60	2,65	14,99
Proporção de músculo no pernil (%)	20	61,25	3,32	5,38
Proporção de gordura no pernil (%)	20	23,06	3,92	16,54
Proporção de osso no pernil (%)	20	15,68	2,23	13,94

<sup>1</sup>Rendimento de carcaça: [(Peso de carcaça quente/ Peso de abate) x 100], <sup>2</sup>Sistema CIE (L\*, a\*, b\*): L\* = luminosidade; a\* = componente verde/vermelho (-a\* representa o verde e +a\* representa o vermelho); b\* = componente azul/amarelo (-b\* representa o azul e +b\* representa o amarelo).



**Tabela 2.** Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos cruzados.<sup>1</sup>

Identificação/número de depósito	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica
ACACA_1 (rs420069625)	C>G	CC	0,27	C	0,33
		CG	0,13	G	0,67
		GG	0,60		
ADRB3_1 (g.31849799 G>C)	G>C	CC	0,09	C	0,55
		CG	0,91	G	0,45
		GG	.		
ATPIA1_1 (rs599122362)	C>T	TT	.	T	0,07
		TC	0,14	C	0,93
		CC	0,86		
CAPN_1 (rs160945933)	A>G	AA	0,59	A	0,77
		AG	0,35	G	0,23
		GG	0,06		
CAPN_2 (rs428593688)	T>C	TT	0,15	T	0,59
		TC	0,51	C	0,41
		CC	0,47		
CAPN_3 (rs160945890)	C>G	CC	.	C	0,27
		CG	0,38	G	0,73
		GG	0,54		
CAST_2 (rs602676579)	G>C	CC	.	C	0,07
		GC	0,14	G	0,93
		GG	0,86		
CAST_3 (rs421224227)	A>G	AA	0,18	T	0,59
		AG	0,82	C	0,41
		GG	.		
CTSB_1 (rs161888250)	C>T	TT	.	T	0,07
		TC	0,15	C	0,93
		CC	0,85		
DGAT_1 (rs410015353)	C>T	TT	0,37	T	0,62
		TC	0,50	C	0,38
		CC	0,13		
EDG1_1 (rs590871285)	G>C	CC	0,33	C	0,58
		CG	0,50	G	0,42
		GG	0,17		
EDG1_2 (rs159669780)	T>C	TT	0,31	T	0,66
		TC	0,69	C	0,34
		CC	.		
FABP3_1 (g.235142245 A>G)	A>G	AA	0,18	A	0,59
		AG	0,82	G	0,41
		GG	.		
FASN_1 (rs161102729)	C>A	AA	.	C	0,88
		AC	0,25	G	0,12
		CC	0,75		
GDF8_1 (rs119102826)	T>C	TT	0,04	T	0,74
		TC	0,40	C	0,26
		CC	0,56		
GH_1 (rs397514102)	C>T	CC	0,38	C	0,69
		TC	0,62	T	0,31
		TT	.		
GHR_1 (rs161146164)	T>G	TT	0,81	T	0,91
		TG	0,19	G	0,09
		GG	.		
GHR_2 (g.31833147 C>A)	C>A	AA	0,07	A	0,54
		AC	0,93	C	0,46
		CC	.		
GHRL_1 (rs428757090)	A>G	AA	0,34	A	0,57
		AG	0,46	G	0,43
		GG	0,20		
HSPB8_1 (rs160860233)	C>T	TT	.	T	0,03
		TC	0,14	C	0,93
		CC	0,86		
IGF1_1 (rs159876393)	A>G	AA	0,55	A	0,74
		AG	0,38	G	0,26
		GG	0,07		
LEP_1 (rs424488761)	C>T	TT	.	T	0,03
		TC	0,05	C	0,97
		CC	0,95		
LOX_2 (rs398830232)	C>T	TT	0,95	T	0,93
		TC	0,05	C	0,07
		CC	.		
MC1R_1 (rs409651063)	G>A	AA	.	A	0,09
		AG	0,18	G	0,91
		GG	0,82		
MC1R_2 (rs160910030)	G>A	AA	0,31	A	0,23
		AG	0,08	G	0,77
		GG	0,61		
MEG (rs10721184)	T>G	GG	0,35	T	0,38
		TG	0,13	G	0,68
		TT	0,52		
SCD1_1 (rs41242981)	G>T	GG	0,77	T	0,11
		TG	0,23	G	0,89
		TT	.		
UCP2_1 (rs160723758)	T>C	TT	0,54	T	0,60
		TC	0,11	C	0,40
		CC	0,35		

<sup>1</sup> HSP90AB1\_1 (rs594801080) e CAST\_1 (rs602676579) foram monomórficos.

**Tabela 3.** Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e *P-value* dos SNPs que apresentaram associações significativas com características de carcaça e qualidade de carne em ovinos cruzados.

Variável	SNP	Médias dos Genótipos <sup>1</sup>			<i>P-value</i>
		CC	CG	GG	
Comprimento de perna (cm)	ACACA_1 (rs420069625)	36,12b ±0,26	37,75a ±0,24	35,22b ±0,33	0,0021
Profundidade máxima de tórax (cm)	CAPN_2 (rs428593688)	TT	TC	CC	0,0353
		18,52b ±0,21	18,23b ±0,22	21,06a ±1,11	
Comprimento externo de carcaça (cm)		76,12b ±0,58	75,37b ±0,61	83,66a ±3,23	0,0328
a* músculo	CAPN_3 (rs160945890)	CC	CG	GG	0,0047
		.	17,93a ±0,51	16,55b ±0,50	
Rendimento de carcaça (%)		.	45,85b ±0,65	47,42a ±0,63	0,0124
Comprimento externo de carcaça (cm)	CAST_3 (rs421224227)	AA	AG	GG	0,0038
		37,02a ±0,28	35,18b ±0,53	.	
Costela (%)		16,20a ±0,45	14,96b ±0,20	.	0,0453
Carré (%)	CTSB_1 (rs161888250)	TT	TC	CC	0,0351
		.	11,86a ±0,28	11,20b ±0,15	
Rendimento de carcaça (%)		.	48,06a ±0,52	46,93b ±0,25	0,0458
Peso de carcaça quente (kg)	DGATI_1 (rs410015353)	TT	TC	CC	0,0137
		18,34b ±0,53	20,07a ±0,48	17,81b ±0,88	
Peso de carcaça fria (kg)		17,58b ±0,52	19,26a ±0,47	17,07b ±0,86	0,0142
Profundidade mínima de tórax (cm)		17,91b ±0,23	18,79a ±0,21	18,37ab ±0,44	0,0250
Comprimento interno de carcaça (cm)		59,63b ±0,55	61,63a ±0,50	58,62b ±0,91	0,0023
Comprimento externo de carcaça (cm)		74,94b ±0,68	77,54a ±0,61	73,07b ±1,11	0,0004
Proporção de músculo na paleta (%)		58,52ab ±1,37	55,30b ±0,87	61,98a ±1,23	0,0235
Proporção de gordura na paleta (%)		23,80ab ±1,77	27,56a ±1,13	18,65b ±1,59	0,0208
Espessura da perna (cm)	EDGI_2 (rs159669780)	TT	TC	CC	0,005
		12,05a ±0,20	10,72b ±0,41	.	
Lombo (%)	GHRL_1 (rs428757090)	AA	AG	GG	0,0263
		8,25a ±0,23	8,62a ±0,22	7,62b ±0,28	
Proporção de músculo na paleta (%)	MC1R_1 (rs409651063)	AA	AG	GG	0,016
Proporção de gordura na paleta (%)		.	61,01a ±1,37	56,23b ±1,01	0,0289
Proporção de músculo na pernil (%)		.	20,66b ±1,95	26,49a ±1,43	0,0488
Carré (%)	UCP2_1 (rs160723758)	TT	TC	CC	0,0177
		10,07b ±0,46	11,41a ±0,17	11,37a ±0,19	

<sup>1</sup>Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem entre si.

## POLIMORFISMOS NOS GENES *ACACA*, *DGATI*, *FASN* E *GHR* AFETAM A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE DE OVINOS

### Resumo

Objetivou-se a avaliar influência de polimorfismos em genes que participam de vias relacionadas ao metabolismo lipídico e energético, regulação do crescimento corporal, formação de tecidos e metabolismo celular na variação do perfil de ácidos graxos avaliados em diferentes cortes cárneos de ovinos cruzados. Para os estudos de associação foram utilizadas informações sobre o perfil de ácidos graxos em músculos nos cortes do lombo (*Longissimus dorsi*), paleta (*Triceps brachii*) e do pernil (*Semimembranosus*) de 116 ovinos cruzados. Os animais foram genotipados para 30 SNPs selecionados em diferentes genes. O SNP localizado no gene *ACACA* foi associado significativamente ao menor teor C16:0 e redução do total de ácidos graxos saturados (AGS). Os polimorfismos de *DGATI* (rs410015353) e *GHR* foram associados à maiores proporções de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), sendo reflexo do aumento conteúdo de C18:1 nos cortes do lombo e pernil. O SNP localizado no gene *FASN* foi associado a elevação dos teores de AGPI, devido à sua influência sobre C18:2  $\omega$ 6 e C18:2c-9 t-11(CLA). Esses dados têm potencial para colaborar nos programas de seleção e melhoramento genético que possuam o objetivo produzir carne ovina com um perfil de ácidos graxos mais saudável.

**Palavras-chave:** SNP, perfil de ácidos graxos, lipídios, carne ovina, cordeiros, genes candidatos, associação.

## POLYMORPHISMS OF THE GENES *ACACA*, *DGATI*, *FASN* and *GHR* AFFECT THE LIPID COMPOSITION OF SHEEP MEAT

### Abstract

The objective of this study was to evaluate the influence of polymorphisms in genes that participate in pathways related to lipid and energetic metabolism, regulation of body growth, tissue formation and cellular metabolism on the variation of the fatty acids profile evaluated in different meat cuts of crossbreed sheep. For the association studies, information on the fatty acid profile was used of the cuts loin (*longissimus dorsi*), shoulder (*triceps brachii*) and leg (*semimembranosus*) of 116 sheep  $\frac{1}{4}$  Pantaneiro x  $\frac{3}{4}$  Texel and  $\frac{1}{2}$  NDB x  $\frac{1}{2}$  Texel. The animals were genotyped for 30 SNPs selected in different genes. The SNP *ACACA*\_1 (rs420069625) was related to the lower C16:0 content and reduction of total SFA. The polymorphisms *DGATI*\_1 (rs410015353) and *GHR*\_1 (rs161146164) were associated to higher proportions of MUFA, reflecting the increased C18:1 content in the loin and leg cuts. The SNP *FASN*\_1 (rs161102729) was associated with an increase in PUFA levels, due to its influence on C18:2  $\omega$ 6 and C18:2c-9 t-11(CLA). These data have the potential to collaborate in selection programs that aim to produce sheep meat with a healthier fatty acids profile.

**Keywords:** SNP, fatty acids profile, sheep meat, lambs, candidate gene, association

## Introdução

A carne de ovinos é constituída de ácidos graxos saturados, principalmente mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0); monoinsaturados, como palmitoléico (C16:1) e oléico (C18:1); bem como, os poliinsaturados linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e araquidônico (C20:4). Estas duas últimas classes de ácidos graxos podem proteger o sistema cardiovascular, uma vez que, o consumo moderado dos monoinsaturados e a ingestão diária de poliinsaturados têm sido associados à diminuição do colesterol sérico e ao aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) (SIRI-TARINO et al., 2010).

A gordura dos ruminantes é uma fonte natural de isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA), assim como o C18: 2 cis-9 trans-11, sintetizado no rúmen por meio da biohidrogenação de ácidos graxos ou pela biossíntese realizada nos tecidos adiposos e na glândula mamária (GRIINARI et al., 2000). O CLA exerce um efeito positivo na saúde humana, como a redução de doenças cardiovasculares, prevenção de diabetes, ativação do sistema imune e a prevenção ao câncer (McGUIRE & McGUIRE, 2000).

Estratégias nutricionais e manipulação genética têm sido utilizadas para atender à crescente demanda dos consumidores por fontes de proteínas com perfil lipídico mais saudável. Assim, regiões gênicas ligadas ao perfil de ácidos graxos da carne de bovinos e ovinos foram estudadas com o objetivo de identificar polimorfismos em genes que contribuem para essas características e utilizar estas informações de forma benéfica para a saúde humana (LEMOS et al., 2016).

Os processos de síntese e metabolismo de ácidos graxos são catalisados por uma série de enzimas e regulados pelos genes que as codificam, alguns destes possuem efeito comprovado sobre a deposição de gordura ou a variação da composição lipídica da carne e do leite de ruminantes. Alguns exemplos podem ser destacados, como a enzima acetil-CoA carboxilase  $\alpha$  – gene *ACACA* (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2010; SINGH et al., 2018); a diacilglicerol aciltransferase 1 – gene *DGATI* (XU et al., 2009; BAYRAM et al., 2018); a proteína de ligação de ácidos graxos – gene *FABP3* (CALVO et al., 2004; GUO et al., 2014); a ácido graxo sintase – gene *FASN* (ZHANG et al., 2008; ESTEVES et al., 2019), e a esteroil-CoA dessaturase 1 – gene *SCD1* (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009). No entanto, ainda existem lacunas na compreensão sobre as redes genéticas e os genes envolvidos na variação da composição lipídica da carne.

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de associação entre polimorfismos identificados em genes candidatos com o perfil de ácidos graxos avaliados em diferentes cortes cárneos de ovinos cruzados.

## 1. Material e Métodos

### *Animais, amostragem e avaliações após abate*

Foram coletadas amostras biológicas e dados fenotípicos 116 ovinos cruzados com peso médio de  $41,62 \pm 7,84$  kg e idade entre 5 a 8 meses, oriundos de dois grupos experimentais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O primeiro grupo era composto 74 machos, cruzados  $\frac{1}{4}$  Pantaneiro x  $\frac{3}{4}$  Texel, provenientes de rebanhos comerciais e mantidos em confinamento experimental na FAMEZ, no município de Campo Grande, MS. A dieta dos animais foi fornecida na proporção volumoso: concentrado de 60:40, constituída de silagem de milho e concentrado comercial. O segundo grupo era de 21 machos cruzados  $\frac{1}{4}$  Pantaneiro x  $\frac{3}{4}$  Texel, provenientes de rebanhos comerciais e mantidos em confinamento experimental na FAMEZ, no município de Campo Grande, MS, recebendo diferentes dietas contendo silagem grão de milho inteiro, reidratado e de grão grosseiramente triturado, além de concentrado comercial

O terceiro grupo era constituído 21 machos,  $\frac{1}{2}$  SRD x  $\frac{1}{2}$  Texel do Setor de Ovinocultura da Fazenda Escola da FAMEZ, localizada no município de Terenos, MS, oriundos de dois anos de avaliação. Os animais foram mantidos sob pastejo de *Urochloa* spp e recebendo quatro níveis diferentes de suplementação mineral. O quarto grupo era constituído 33 machos,  $\frac{1}{2}$  SRD x  $\frac{1}{2}$  Texel do Setor de Ovinocultura da Fazenda Escola da FAMEZ, localizada no município de Terenos, MS, avaliados em dois anos diferentes. Os animais foram mantidos sobre pastejo de *Urochloa* spp com diferentes níveis de oferta de forragem.

Os cordeiros foram abatidos em um mesmo frigorífico comercial, localizado em Campo Grande, MS. Foram coletadas 94 amostras de músculo do lombo (*Longissimus dorsi*), 69 amostras da paleta (*Triceps brachii*) e do 63 do pernil (*Semimembranosus*) para obtenção do perfil de ácidos graxos e para a extração de DNA, bem como as informações de peso de abate, peso de carcaça quente e fria. Foram realizadas as medições da área de olho de lombo (AOL) pela exposição do músculo *longissimus dorsi* após um corte

transversal na carcaça, entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> vértebras torácicas, sendo a área desenhada em papel manteiga e posteriormente e mesurada pelo equipamento *Li-Cor*, modelo 3100. Na mesma secção foi avaliada a espessura de gordura subcutânea (EGS), utilizando-se um paquímetro digital.

#### *Extração e metilação dos ácidos graxos*

As amostras de músculos foram descongeladas a 10 °C por 24 horas para a realização extração dos lipídios e metilação dos ácidos graxos utilizando-se a técnica de Hara e Radin (1978) com modificações. Para a extração, foram retiradas amostras de 5,0 g do tecido muscular, adicionada 28 ml de solução de Hexano:Isopropanol (3:2, v/v), homogeneizadas com auxílio de um triturador por 60 segundos e posteriormente filtradas. Ao filtrado foram adicionados 12 ml de solução de sulfato de sódio (0,47 M) e agitado em vórtex por 30 segundos para efetuar a separação do hexano contendo os lipídios e o isopropanol. Após 10 minutos de repouso, a camada superior foi retirada com auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo contendo 1 g de sulfato de sódio. A partir dessa mistura, o sobrenadante (lipídios e hexano) foi novamente transferido para outro recipiente previamente pesado, onde passou por um processo de secagem sob temperatura ambiente para evaporação do hexano e obtenção apenas da fração lipídica.

Para a reação de metilação, adicionou-se 2 ml de hexano e 40 µl de acetato de metila em 40 mg dos lipídios extraídos, sendo posteriormente homogeneizado em vórtex durante 30 segundos. Na sequência, foram adicionadas as seguintes soluções em etapas: 40 µl de metóxido de sódio em metanol a 5,4% e agitado por 2 minutos; 60 µl da solução de terminação contendo ácido oxálico anidro e agitado por mais 30 segundos; e por fim, 200 mg de cloreto de cálcio anidro e agitado por 30 segundos. Após 1 hora de repouso, as amostras foram centrifugadas a 3200 rpm por 5 minutos a 5 °C. O sobrenadante, que representa a fração dos ácidos graxos esterificados, foi retirado com auxílio de uma pipeta e reservado para as análises.

A avaliação do perfil lipídico foi realizada por meio de um cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama (*Thermo*, modelo *Trace GC Ultra*). A separação dos ésteres de ácidos graxos foi efetuada em coluna capilar de sílica fundida de 100 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,2 µm de espessura (*Restek RTX® - 2330*,

*Bellefonte, PA, USA*). A programação da temperatura da coluna iniciou-se com 120 °C permanecendo por 5 minutos, posteriormente, foi elevada a uma taxa de 3 °C por minuto até atingir 240 °C, permanecendo nesta temperatura durante 15 minutos. O hélio (He) foi empregado como gás de arraste sob fluxo constante de 1,5 ml min<sup>-1</sup>. O volume de injeção utilizado foi 1,0 µl, com injetor operando no modo de injeção *splitless* e sob a temperatura de 250 °C. A temperatura utilizada no detector foi de 270 °C. Os dados sobre os tempos de retenção e as áreas dos componentes separados foram obtidos através do *software Chrom Quest Version 4.2*.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio do tempo de retenção e a quantificação através da curva de calibração utilizando padrão externo *Supelco® 37 Component FAME Mix*. A composição dos ácidos graxos presentes em cada amostra foram expressas individualmente em porcentagem, sendo apresentadas as proporções de C10:0 (Cáprico), C12:0 (Láurico), C14:0 (Mirístico), C16:0 (Palmítico), C18:0 (Estearico), C16:1 (Palmitoleico), C18:1 (Oleico), C18:2 $\omega$ 6 (Linoleico) e C18:2c-9 t-11(CLA).

A partir das proporções obtidas foram calculados os somatórios dos Ácidos Graxos Saturados (AGS), Ácidos Graxos Monointasurados (AGMI) e dos Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI). Também foram obtidos os índices de qualidade nutricional dados pelas relações entre os Ácidos Graxos Monointasurados e Ácidos Graxos Saturados (AGMI: AGS) e entre Ácidos Graxos Poliinsaturados e Ácidos Graxos Saturados (AGPI:AGS), assim como o total de Ácidos Graxos Desejáveis. O número de observações, as médias das concentrações dos ácidos graxos e seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.

#### *Extração de DNA*

O DNA foi extraído no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA), da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, a partir do tecido muscular, seguindo o protocolo de Regitano & Coutinho (2001). A integridade e a concentração das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%) e espectrofotometria em aparelho *NanoDrop (Thermo Scientific ND 1000)*.



### *Seleção dos SNPs*

Foram selecionados 30 SNPs em 23 genes candidatos associados previamente ao metabolismo lipídico e energético, na regulação do crescimento corporal, desenvolvimento de tecidos e metabolismo celular em bovinos e ovinos (Tabelas 1 e 2 - Apêndice).

Os SNPs genotipados para associação com dados fenotípicos foram: rs420069625 (*ACACA* - *Acetyl-CoA Carboxylase α*); g.31849799 G>C - sem depósito (*ADRB3* -  $\beta$ -adrenergic receptor); rs599122362 (*ATP1A1* -  $Na^+K^+$  ATPase  $\alpha 1$ ); rs160945933, rs428593688 e rs160945890 (*CAPN* - *Calpain*); rs602676579, rs421224227 e g.93444503C>G - sem depósito (*CAST* - *Calpastatin*); rs161888250 (*CTSB* - *Cathepsin B*); rs410015353 (*DGAT1* - *Diacylglycerol Acyltransferase 1*); rs590871285 e rs159669780 (*EDG1* - *Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1*); g.235142245A>G - sem depósito (*FABP3* - *Fatty acid binding protein 3*); rs161102729 (*FASN* - *Fatty acid synthase*); rs119102826 (*GDF8* - *Myostatin*); rs397514102 (*GH* - *Growth hormone*); rs161146164 e g.31833147C>A - sem depósito (*GHR* - *Growth hormone receptor*); rs428757090 (*GHRL* - *Ghrelin*); rs594801080 (*HSP90AB1* - *Heat shock proteins 90*); rs160860233 (*HSPB8* - *Heat Shock Protein Family B*); rs159876393 (*IGF1* - *Insulin-like growth factor 1*); rs414488761 (*LEP* - *Leptin*); rs398830232 (*LOX* - *Lysyl oxidase*); rs409651063 e rs160910030 (*MC1R* - *Melanocortin 1 receptor*); rs10721184 (*MEG3* - *Maternally expressed 3*); rs412429481 (*SCD1* - *Stearoil-CoA desaturase 1*); rs160723758 (*UCP2* - *Uncoupling proteins 2*).

A identificação e a localização cromossômica de cada um dos polimorfismos foram obtidas partir do banco de dados *Ensembl Genomes*.

### *Amplificação por PCR multiplex*

Os SNPs selecionados foram distribuídos em dois PCR multiplexes que estão apresentados de forma separada na Tabelas 1 e 2 - Apêndice. Os *primers* que flanqueiam os SNPs dos genes *ATP1A1*, *CAST*, *EDG1*, *FASN*, *HSP90AB1*, *HSPB8* e *UCP2* foram validados e otimizados da espécie bovina para ovina.

As reações de PCR multiplex foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante, em um volume final de 25  $\mu$ l, constituídas de 40 ng de amostra de DNA, um

pool dos *primers* com concentração final de 0,2 µM de cada, 0,6x QIAGEN Multiplex PCR master mix e 0,3x Q-Solution.

Para amplificação utilizou-se o termociclador Vereti™ 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City CA, USA*), seguindo o protocolo de 15 minutos para desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

O êxito da amplificação foi verificado via eletroforese em gel de agarose a 3%. Após a PCR multiplex, foi realizada a etapa de purificação, onde os *primers* não incorporados e os dNTPs foram removidos utilizando 2,5 U de ExoI, 0,5 U de SAP e em 7 µl de produto de PCR. Em seguida, as reações foram incubadas a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 80 °C durante 20 minutos.

#### *Amplificação por SNaPshot® e genotipagem*

Os *primers* específicos para SNaPshot® foram confeccionados de acordo os parâmetros de qualidade do pacote do *software Geneious v5.2* (DRUMMOND et al., 2011; disponível em <http://www.geneious.com/>) e *Batchprimer3 v1*. Foram adicionadas caudas de diferentes comprimentos (poli TC) à suas extremidades 3', para que pudessem variar em tamanho de 22 a 81 pb (Tabelas 1 e 2 - Apêndice).

Os *primers* de base única (SBE) foram divididos em dois *mixes* para a realização da reação de SNaPshot®, de acordo com o delineamento das PCR multiplexes. As reações de SNaPshot® foram realizadas com o kit multiplex SNaPshot® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), seguindo as recomendações do fabricante, em um volume total de 8 µl, contendo 2,5 µl Snapshot® mix, 2,5 µl de amplicons de reação de PCR de multiplex e 1 µl da mistura de *primers* (as concentrações otimizadas de cada *primer* de base única adicionado foram apresentadas nas Tabelas 1 e 2 – Apêndice). As reações foram realizadas em termociclador Vereti™ 96-Well Thermal Cycler, com as seguintes condições: 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Os produtos amplificados foram purificados por adição de uma unidade de SAP na reação de SnaPshot®. Posteriormente, esta mistura foi incubada a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 75°C durante 15 minutos. Após a purificação, uma alíquota de 0,5µl SNaPshot® foi adicionada a 9,25 µl e de formamida Hi-Di® (*Applied Biosystems*) 0,25µl

do padrão interno de tamanho *GeneScan-120*<sup>®</sup> *LIZ* (*Applied Biosystems*). As reações foram aquecidas a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, as foram submetidas a eletroforese capilar em sequenciador automático *ABI PRISM 3130* (*Applied Biosystems*). Os eletroferogramas gerados foram interpretados com o auxílio do *GeneMapper Software v4.1* (*Applied Biosystems*).

#### *Análises estatísticas*

As frequências genotípica e alélica de cada marcador foram calculadas por contagem simples. O estudo dos efeitos dos genótipos de cada polimorfismo sobre as características avaliadas foi realizado utilizando-se uma análise de variância através do procedimento modelo linear geral (PROC GLM) do programa estatístico SAS v.9.3 (SAS Institute, 2003). O seguinte modelo misto foi aplicado:

$$Y_{i,j,k,l,m,n} = \mu + \text{exp}_j + \text{trat}_k(\text{exp}_j) + \text{ano}_l(\text{exp}_j) + \text{snp}_{mn} + e_{i,j,k,l,m,n}$$

Onde:

$Y$  – é o valor da variável observada na I-ésima repetição, do J-ésimo experimento, com K-ésimo tratamento, no L-ésimo ano;

$\mu$  – é a média de  $Y$ ;  $\text{exp}_j$  – efeito aleatório do J-ésimo experimento, sendo J variável de 1 – 4;

$\text{trat}_k(\text{exp}_j)$  – é o efeito aleatório do K-ésimo tratamento dentro do J-ésimo experimento, sendo K variável de 1 – 4;

$\text{ano}_l(\text{exp}_j)$  – é efeito aleatório do L-ésimo ano dentro do do J-ésimo experimento, sendo L variável de 1 – 2;

$\text{snp}_{mn}$  – é efeito fixo do N-ésimo genótipo do M-ésimo snp, e;

$e_{i,j,k,l,m,n}$  – é erro aleatório.

Quando detectados efeitos significativos para os polimorfismos no modelo, seus genótipos foram submetidos a comparação de médias pelo teste de Tukey Kramer ( $P < 0,05$ ). Procedeu-se também a análise de correlação de Pearson entre os teores de ácidos

graxos que apresentaram associação significativa com os polimorfismos e características de carcaça, utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2003).

## 2. Resultados

Os animais foram genotipados para 30 polimorfismos e suas respectivas frequências genóticas e alélicas podem ser encontradas na Tabela 2. Dentre estes, dois SNPs (*HSP90ABI\_1* - rs594801080 e *CAST\_1* - rs602676579) foram monomórficos, observando-se que os alelos C de rs594801080 e G de rs602676579 estavam fixados na população estudada.

Neste trabalho, a variação do perfil de ácidos graxos foi analisada nas regiões anatômicas do lombo (*longissimus dorsi*), paleta (*triceps brachii*) e do pernil (*semimembranosus*), sendo associada aos genótipos de quatro SNPs. (Tabela 3).

Os genótipos de *ACACA\_1* (rs420069625) influenciaram a composição lipídica do lombo de ovinos cruzados. Observou-se um efeito de dominância do alelo C, pois os indivíduos com genótipo CC e os heterozigotos CG apresentaram uma proporção de C16:0 superior à encontrada para GG. A diferença estimada entre CC e GG foi de 2,79% e, entre CG e GG foi de 1,6%. Por consequência, este resultado também gerou superioridade para o total de AGS e uma relação inferior de AGMI:AGS dos genótipos CC e CG, em comparação a GG.

Para o SNP *DGATI\_1* (rs410015353), verificou-se que o homozigoto CC foi associado com a maior proporção de C18:1 no lombo, bem como, maior somatório de AGMI e total de Ácidos Graxos Desejáveis, em relação aos demais genótipos. Os indivíduos com genótipo CC apresentaram média superior, TC foram intermediários e TT obtiveram menor teor de C18:1, com diferença estimada de 4,67% em relação à CC. O mesmo comportamento pode ser observado para o total de AGMI. Quanto ao total de Ácidos Graxos Desejáveis, observou-se que a diferença estimada entre CC e TC foi de 6,92% e entre CC e TT de 7,33%.

Os genótipos de *FASN\_1* (rs161102729), foram associados com a variação das concentrações de C18:2 $\omega$ 6 e C18:2c-9 t-11 (CLA), afetando consequentemente o somatório de AGPI e a relação AGPI:AGS. Os heterozigotos AC foram significativamente

superiores ao genótipo CC, em todas as associações encontradas. A diferença entre os genótipos no teor de CLA e no total de AGPI foi de 1,58% e 1,73%, respectivamente.

Por sua vez, o genótipo TT do polimorfismo *GHR\_1* (rs161146164) apresentou redução nas concentrações de C18:0, aumento do teor de C18:1 e melhoria da relação AGMI:AGS no pernil dos cordeiros. Os animais TT obtiveram concentrações superiores de C18:1, diferenciando em 5,84% das proporções encontradas em TG. Em contraste, TT foi associado à redução de 2,4% nas proporções C18:0, quando comparado a TG.

Além disso, por meio da correlação de Pearson observou-se que C18:0 e C18:1 possuem um coeficiente de correlação de -0,86 no pernil (Tabela 4). Os teores de C18:0 e C18:1 no pernil apresentaram correlações significativas com os dados disponíveis referentes à carcaça dos animais. Foi verificado que a proporção de C18:1 estava correlacionada positivamente com o peso de abate, peso de carcaça quente, peso de carcaça fria, AOL e EGS. Por sua vez, os teores C18:0 foram correlacionados negativamente com todas estas variáveis.

### 3. Discussão

Polimorfismos em 23 genes diferentes foram selecionados com base em suas descrições funcionais observadas na literatura, considerando tanto a participação no metabolismo lipídico (biossíntese, transporte e dessaturação) e energético, quanto na regulação do crescimento corporal, formação de tecidos e metabolismo celular. Existem poucos estudos de associação de SNPs em genes candidatos com o perfil lipídico da carne ovina, ocorrendo que, grande parte da literatura está voltada para avaliação dos polimorfismos na variação da composição de ácidos graxos do leite de ovinos.

Entre os quatro genes que apresentaram associações significativas com as características analisadas neste trabalho, *ACACA*, *DGATI*, e *FASN* estão diretamente envolvidos na síntese de lipídios. O gene *ACACA* está localizado no cromossomo 11 de ovinos e codifica a acetil-CoA carboxilase  $\alpha$ , uma enzima que catalisa a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (SINGH et al., 2018). Polimorfismos identificados neste gene influenciaram a composição de lipídios do músculo *longissimus* em seis raças diferentes de bovinos (ZHANG et al., 2010). Em ovinos, vários estudos demonstraram a

influência do gene *ACACA* na composição de ácidos graxos da gordura leite, o relacionado principalmente com os teores de saturados (MOIOLI et al., 2007; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2010; SINGH et al., 2018; SINGH et al., 2019).

A enzima diacilglicerol aciltransferase 1, codificada pelo gene *DGATI*, media a etapa final da síntese de triglicerídeos, utilizando diacilglicerol e acil-CoA como substratos (ESTEVEZ et al., 2019). Este gene está localizado no cromossomo 9 de ovinos, sendo expresso em muitos tecidos, mas predominantemente no tecido adiposo, fígado e no intestino delgado (BAYRAM et al., 2018). A síntese de triglicerídeos é essencial no tecido adiposo para armazenamento de energia, no fígado para produção de lipoproteínas e intestinos para absorção de gordura na dieta (YU & GINSBERG, 2004). O gene *DGATI* tem sido associado principalmente com as características relacionadas à deposição de gordura na carne. Observa-se que diferentes polimorfismos de *DGATI* avaliados em ovinos, foram associados com aumento do peso vivo, espessura de gordura, proporção de gordura intramuscular e subcutânea na carcaça (XU et al., 2009; MOHAMMADI et al., 2013; ARMSTRONG et al., 2018).

O gene *FASN* codifica a ácido graxo sintase, que se refere a um complexo enzimático que catalisa a síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia longa nas células e está localizado no cromossomo 11 de ovinos (RAZA et al., 2018). Estas enzimas participam da formação de ácidos graxos a partir da condensação sequencial moléculas de malonil-CoA ao acetil-CoA, dando continuidade ao processo de biossíntese iniciado pela enzima acetil-CoA carboxilase  $\alpha$  (ROY et al., 2006). Vários autores relataram os efeitos desse gene nas características relacionadas à gordura na carne e no leite de bovinos (ROY et al., 2006; ZHANG et al., 2008; ABE et al., 2009; MAURIC et al., 2019). Na espécie ovina, os trabalhos estão concentrados na elucidação da contribuição do gene *FASN* na variação do perfil lipídico no leite, onde observou-se que o gene influencia a proporção de ácidos graxos saturados de cadeia curta, como C12:0 e C14:0, além do monoinsturado C18:1 (SCHENNINK ET AL., 2009; CRISÀ et al., 2010; SZTANKOOVA et al., 2018)

Além destes, verificou-se associações com o gene do receptor do hormônio do crescimento (*GHR*), que pertence a um grupo de genes codificam os hormônios e os receptores do eixo somatotrópico, desempenhando um papel fundamental na fisiologia do crescimento de mamíferos (BAHRAMI et al., 2013). O *GHR* é um regulador do crescimento e, assim como hormônio do crescimento, têm efeitos importantes no

metabolismo de proteínas e lipídios (DETTORI et al., 2018). Em ovinos, polimorfismos do gene *GHR* foram associados à deposição de gordura na carcaça para animais de corte, bem como as características produtivas do leite, como conteúdo de gordura e composição lipídica (CRISÀ et al, 2010; ARMSTRONG et al., 2018; DETTORI et al., 2018).

#### *Associações significativas do polimorfismo do gene ACACA*

Os genótipos CC e CG do polimorfismo *ACACA\_1* (rs420069625) foram relacionados à maiores proporções de C16:0 e do total de AGS no lombo. Esta associação é plausível baseando-se na função biológica da enzima, pois o complexo enzimático acetil-CoA carboxilase  $\alpha$  é um sistema situado no citosol que catalisa a carboxilação do acetil-CoA para formar malonil-CoA, que será o substrato para a síntese principalmente de C16:0 (GERLANDO et al., 2017).

Outro ponto que deve ser destacado é que os genótipos de *ACACA\_1* (rs420069625) influenciaram as relações AGMI:AGS. Neste caso, os animais GG obtiveram a melhor relação, por apresentarem quantidades menores de AGS. Este resultado é desejável, pois ácidos graxos saturados são considerados hipercolesterolêmicos e, por consequência, o seu consumo excessivo pode aumentar o fator de risco a doenças cardiovasculares (DECKER & PARK, 2010).

Levando-se em consideração que o polimorfismo *ACACA\_1* (rs420069625) é uma mutação sinônima de C>G, é possível que substituição tenha levado à redução na atividade enzimática de acetil-CoA carboxilase  $\alpha$ , diminuindo consequentemente, a porcentagem de C16:0 biosintetizada em animais GG. Isto porque, mutações sinônimas, mesmo não mudando a sequência de aminoácidos na proteína codificada, podem alterar a molécula de RNA e afetar sua estabilidade, o que resultaria em alteração ou redução da expressão e função das proteínas, podendo assim, influenciar diretamente os traços fenotípicos de um indivíduo (SAUNA et al., 2007).

#### *Associações significativas do polimorfismo do gene DGAT1*

O polimorfismo *DGAT1\_1* (rs410015353) foi associado com a variação na proporção de C18:1 analisado no lombo. É conhecido que a maior parte do C18:0 absorvido pelos ruminantes é convertido em C18:1 pela ação endógena da enzima

estearoil-CoA dessaturase, que catalisa a inserção de uma dupla ligação (cis) entre os carbonos nas posições 9 e 10 de diferentes ácidos graxos saturados, transformando-os em insaturados (MIYAZAKI & NTAMBI, 2003). Durante o crescimento, ovinos apresentam maior atividade enzimática de dessaturação nos adipócitos que outras espécies, isso faz com que carne ovina tenha altos teores de C18:1 (DHIMAN et al., 2005).

Em um levantamento na literatura, foram encontrados diferentes estudos relatando a relação de *DGAT1* e 2 com os índices de dessaturação de ácidos graxos na carne e no leite de ruminantes. Estes índices são calculados para se obter uma estimativa direta da atividade das enzimas na insaturação endógena de ácidos graxos. Em vacas holandesas, o polimorfismo K232A de *DGAT1* foi associado a maior proporção de C18:1 e maior índice de dessaturação de C18:0 no leite (SCHENNINK et al., 2008; DUCHEMIN et al., 2013). Por sua vez, um polimorfismo identificado no gene *DGAT2* foi relacionado ao maior índice de dessaturação de C18:0 no *longissimus lombar* de ovinos cruzados (ESTEVEZ et al., 2019).

Pesquisas sugerem que a atividade das aciltransferases na formação de triacilgliceróis é mediada pela disponibilidade de substrato, podendo utilizar preferencialmente os monoinsaturados, assim como o C18:1 (MISTRY & MEDRANO, 2002; DUCHEMIN et al., 2013). Portanto, é plausível sugerir que animais com genótipo CC apresentem maior atividade enzimática das diacilglicerol aciltransferases 1, exigindo o aumento da dessaturação de C18:0, com o intuito de suprir a quantidade necessária de C18:1 para a formação dos triglicerídeos.

Em consequência à elevação de C18:1 no lombo de animais CC, houve um aumento favorável no total de AGMI. Existem evidências convincentes de que a substituição na ingestão de AGS (C12:0 a C16:0) pelos AGMI na alimentação humana, leva a melhoria da relação HDL/LDL e redução do LDL-colesterol no sangue, porém, com um efeito inferior aos exercidos pelos AGPI (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Além disso, o genótipo CC também afetou positivamente o índice de Ácidos Graxos Desejáveis, dado pela soma de todos os ácidos graxos poli e monoinsaturados mais o C18:0, que apesar de ser um ácido graxo saturado, tem efeito neutro na alteração do nível de colesterol sanguíneo (SIRI-TARINO et al., 2010).



### *Associações significativas do polimorfismo do gene FASN*

Os indivíduos heterozigotos AC do SNP *FASN*\_1 (rs161102729) apresentaram médias superiores de C18:2  $\omega$ 6 e seu isômero C18:2 c-9 t-11 (CLA) no lombo, quando comparados ao génotipo CC. Um efeito semelhante foi encontrado na avaliação de haplótipos do gene *FASN* em ovinos cruzados, os quais foram associados com a variação no conteúdo de C18:2 $\omega$ 6 no *longissimus* (ESTEVEES et al., 2019). Dessa forma, é interessante destacar que, entre os diferentes os músculos esqueléticos, foi comprovado que o músculo *longissimus dorsi* apresenta a maior expressão de *FASN* (BHUIYAN et al., 2009).

As associações encontradas para os animais com génotipo AC são altamente desejáveis, pois o aumento dos teores de C18:2  $\omega$ 6 e CLA, elevaram o total de AGPI e melhoraram a relação AGPI:AGS. Existem evidências convincentes de que a substituição de AGS por AGPI, diminui o risco da ocorrência de doenças coronarianas em humanos e que ingestão de AGPI está ligada à prevenção da diabetes e de outras doenças metabólicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Em especial, o CLA tem chamado atenção, primeiramente, por seus efeitos benéficos à saúde humana e, em segundo lugar, pelo fato de a carne de ruminantes possuir concentrações superiores à de não ruminantes. Neste sentido, destaca-se a carne ovina, contendo uma quantidade de CLA de 2 a 4 vezes maior que a carne bovina (SCHMID et al., 2006).

Diante disto, constata-se que substituição alélica C>A do SNP rs161102729 apresentou um efeito favorável na composição de ácidos graxos poliinsaturados. No entanto, essa associação contrasta com a função biológica da enzima, que catalisa o alongamento da cadeia de ácidos graxos saturados, para formar principalmente C16:0 e C18:0 (ZHANG et al., 2008). Embora haja um resultado recente, semelhante ao encontrado neste trabalho, uma série de estudos anteriores, conduzidos em bovinos, citam os polimorfismos de *FASN* sendo relacionados às variações nas proporções de C16:0, C18:0 e C18:1 (ZHANG et al., 2008; ABE et al., 2009; BHUIYAN et al., 2009; MATSUHASHI et al., 2011; YOKOTA et al., 2012).

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar estas discrepâncias: 1) participação do gene *FASN* em uma rede genética ainda não elucidada; 2) ligação de *FASN*\_1 (rs161102729) com outro polimorfismo ainda não identificado, atuando sobre estas características na população de ovinos avaliada, devido a um efeito de epistasia.

Portanto, são necessários mais estudos para validar as relações aqui encontradas, visando a compreensão de qual efeito está associado a estes resultados.

#### *Associações significativas do polimorfismo do gene GHR*

Os genótipos do polimorfismo *GHR\_1* (rs161146164) apresentaram influência sobre as médias de C18:0 e C18:1 de maneira inversamente proporcional, sendo constatado que estes dois ácidos graxos estavam correlacionados negativamente no pernil dos cordeiros.

Mais uma vez, o efeito observado parece estar ligado ao papel das enzimas dessaturases, pois os ácidos graxos saturados são seus substratos na biossíntese de monoinsaturados no citosol, fabricados para manter a fluidez das membranas celulares (MIYAZAKI & NTAMBI, 2003). Isto elucidaria o aumento nas concentrações de C18:1 e a consequente redução de C18:0, observado nos animais com genótipo TT. Utilizando o índice de dessaturação de C18:0 dado pela equação:  $ID\ C18:0 = [\text{produto insaturado}/(\text{substrato saturado} + \text{produto insaturado})]$ , descrito por Schennink et al. (2008), foi possível constatar que a atividade de dessaturação foi realmente alta no pernil, sendo que o genótipo TT foi 6% superior a TG (TT: 0,76 vs. TG: 0,70).

Esta influência de *GHR\_1* (rs161146164) sobre a composição de ácidos C18:0 e C18:1 graxos pode estar ligada ao efeito que o gene exerce sobre o crescimento, ganho de peso e o peso de carcaça (HALE et al., 2000; SHERMAN et al., 2008; VALEH et al., 2009). Verificou-se que as proporções de C18:1 no pernil estão correlacionadas de forma positiva com o aumento dos pesos de carcaça e com maiores valores de AOL e EGS, medidas relacionadas a musculosidade e deposição de gordura na carcaça. Por sua vez, os teores C18:0 foram correlacionados negativamente com todas estas variáveis.

Estes fatos podem ser explicados pela relação existente entre o aumento da maturidade fisiológica e do peso dos ovinos com a redução dos níveis de ácidos graxos saturados no músculo, devido ao aumento na atividade enzimática de dessaturação nos tecidos, promovendo maior produção de C18:1 em relação a C18:0 (COSTA et al., 2008).

Portanto, em virtude em inúmeros efeitos biológicos do gene *GHR* relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento pós-natal no tecido muscular e adiposo, é concebível

que sejam em encontradas variações no perfil de ácidos graxos na carne de ovinos em função de seus genótipos.

Por fim, destaca-se que a elevação da proporção de C18:1 no pernil para o genótipo TT de *GHR\_1* (rs161146164), também acarretou em aumento do total de AGMI e uma melhor relação AGMI:AGS. Apesar de C18:1 apresentar um efeito moderado na elevação dos níveis de colesterol sanguíneo, o relatório divulgado pela *World Health Organization* / FAO (2008) destaca que não há evidências suficientes da relação do consumo de AGMI com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ou câncer. Além disso, a organização reporta que a substituição de carboidratos por AGMI melhora a sensibilidade à insulina, diminuindo o risco de diabetes.

Neste estudo, não foram detectadas as associações dos SNPs de *SCD1* e *FABP3* com a composição de ácidos graxos, embora essas relações fossem esperadas devido às descrições das funções biológicas destas enzimas. O gene *SCD1* codifica a enzima esteroil-CoA desaturase, que catalisa a biossíntese de monoinsaturados (MIYAZAKI & NTAMBI, 2003). Algumas das associações encontradas possivelmente têm ligação com a atividade desta enzima nos tecidos animais, entretanto, os genótipos do polimorfismo *SCD1\_1* (rs41242981) não influenciaram o perfil lipídico em nenhum dos cortes. O SNP selecionado para este trabalho, foi identificado e associado anteriormente com a variação na composição de ácidos graxos no leite da raça ibérica Churra. É possível que para o grupo de animais aqui avaliados, o polimorfismo selecionado não apresente as mesmas relações com a composição de ácidos graxos observados nas raças leiteiras.

Por sua vez, o gene *FABP3*, em estudos anteriores, teve seus polimorfismos associados com a deposição de gordura subcutânea e intramuscular na carne ovina e bovina (CHO et al., 2008; GUO et al., 2014), mas foi pouco relacionado com a composição de ácidos graxos da carne. A proteína de ligação de ácidos graxos do coração, codificada pelo gene *FABP3*, está envolvida no processo de transporte de lipídios, a fim de regular sua concentração (CALVO et al., 2004), sendo assim, é concebível que seus efeitos estejam mais ligados a processos quantitativos no tecido adiposo, do que associados ao perfil qualitativo da gordura.

Ademais, não foi verificada influência de nenhum SNP no perfil de lipídios da paleta. Entre os três cortes avaliados, a paleta é o que possui menor proporção de gordura entre o músculo (PINHEIRO et al., 2007). Como as avaliações do perfil lipídico

foram realizadas em amostras de tecido muscular, este fato pode ter levado a falta de variabilidade entre os animais, sendo possivelmente os ácidos graxos provenientes dos fosfolipídios das membranas celulares a maior fonte lipídica nesse corte.

#### **4. Conclusão**

Os resultados do presente estudo demonstraram que os polimorfismos de DNA nos genes relacionados ao metabolismo lipídico (*ACACA*, *DGATI* e *FASN*) e ao crescimento corporal (*GHR*) estão associados com a variação da composição de ácidos graxos nos cortes do lombo e pernil, contribuindo assim, para uma maior compreensão da base genética dessas características na carne de ovinos.

As associações encontradas podem ser consideradas favoráveis à saúde humana e possuem o potencial para moldar de forma positiva o perfil de ácidos graxos na carne de cordeiros. O polimorfismo *ACACA\_1* (rs420069625) teve efeito sobre a redução da proporção AGS no lombo. Por sua vez, os SNPs *DGATI\_1* (rs410015353) e *GHR\_1* (rs161146164) apresentaram influência sobre o aumento das proporções de AGMI nos cortes do lombo e pernil. Houve ainda, a associação do polimorfismo *FASN\_1* (rs161102729) com o aumento das proporções AGPI no lombo, incluindo o CLA. Estes resultados são altamente desejáveis, devido aos efeitos benéficos que podem trazer para os consumidores.

Neste sentido, esses dados podem colaborar em programas de melhoramento genético de ovinos que tenham o objetivo de produzir carne com um perfil de ácidos graxos mais saudável.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, à Embrapa Gado de Corte e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## 5. Referências

- ABE, T. et al. Novel mutations of the *FASN* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. **Biochemical Genetics**, v.47, p.397-411, 2009.
- ARMSTRONG, E. et al. Novel genetic polymorphisms associated with carcass traits in grazing Texel sheep. **Meat Science**, v. 145, p. 202-208, 2018.
- BAHRAMI, A. et al. Genetic polymorphisms and protein structures in growth hormone, *growth hormone receptor*, *ghrelin*, *insulin-like growth factor 1* and *leptin* in Mehraban sheep. **Gene**, v. 527, n. 1, p. 397-404, 2013.
- BARENDSE, W.J. DNA markers for meat tenderness. International patent application PTC/AU02/00122 International patent application WO 02/064820 A1, World International Property Organization. 2002.
- BAYRAM, D. et al. *DGAT1*, *CAST* and *IGF-I* Gene Polymorphisms in Akkaraman Lambs and Their Effects on Live Weights up to Weaning Age. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 25, n. 1, 2019.
- BHUIYAN, M.S.A. et al. DNA Polymorphisms in *SREBF1* and *FASN* genes affect fatty acid composition in Korean Cattle (Hanwoo). **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 22, p. 765-773, 2009.
- CALVO, J. H. et al. Association of the heart fatty acid-binding protein (*FABP3*) gene with milk traits in Manchega breed sheep. **Animal Genetics**, v. 35, n. 4, p. 347-349, 2004.
- CARTA, A. et al. Investigating the genetic component of fatty acid content in sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 22-28, 2008.
- CHO, S. et al. Identification of genetic polymorphisms in *FABP3* and *FABP4* and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p. 29-34, 2008.
- COSTA, R.G. et al. Goat and sheep meat: fatty acids composition and sensorial characteristics. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 497-506, 2008.
- CRISÀ, A. et al. Exploring polymorphisms and effects of candidate genes on milk fat quality in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3834-3845, 2010.
- DECKER, E.A.; PARK, Y. Healthier meat products as functional foods. **Meat Science**, v.86, p. 49-5, 2010.
- DETTORI, Maria L. et al. Association between the *GHR*, *GHRHR*, and *IGF1* gene polymorphisms and milk yield and quality traits in Sarda sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9978-9986, 2018.
- DHIMAN, T.R. et al. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 463 – 482, 2005.

DUCHEMIN, S. et al. Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and *DGATI* and *SCD1* by season interactions. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 592-604, 2013.

ESTEVEZ, C. et al. The polymorphisms of genes associated with the profile of fatty acids of sheep. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 71, n. 1, p. 303-313, 2019.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the ovine *acetyl-CoA carboxylase-alpha* gene. **Small Ruminant Research**, v. 90, n. 1-3, p. 34-40, 2010.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the ovine *acetyl-CoA carboxylase-alpha* gene. **Small Ruminant Research**, v. 90, n. 1-3, p. 34-40, 2010.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. et al. Genetic variability of the *Stearoyl-CoA desaturase* gene in sheep. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 2, p. 107-111, 2009.

GERLANDO, R. et al. Full-length sequencing and identification of novel polymorphisms in the *ACACA* gene of Valle del Belice sheep breed. **Journal of Genetics**, v. 96, n. 4, p. 591-597, 2017.

GRIINARI, J.M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. **Journal of Nutrition**, p. 2285-2291, 2000.

GUO, B., et al. A gene expression estimator of intramuscular fat percentage for use in both cattle and sheep. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 35, 2014.

HALE, C.S. et al. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 8, p. 2099-2104, 2000.

LEMOS, M.V.A et al. Genome-wide association between single nucleotide polymorphisms with beef fatty acid profile in Nellore cattle using the single step procedure. **BMC Genomics**, v.17, n.213, 2016.

LIU, Y.X. et al. Association of *ATPIA1* gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 891-896, 2010.

MAHMOUD, A.H. et al. Molecular Characterization of *Ghrelin* gene in sheep of Saudi Arabia. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 39-44, 2016.

MARQUES, M. R. et al. Effects of genetic polymorphisms at the *growth hormone* gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. **Journal of dairy research**, v. 73, n. 4, p. 394-405, 2006.

MATSUHASHI T. et al. Effects of bovine *fatty acid synthase*, *stearoyl-coenzyme A desaturase*, *sterol regulatory element-binding protein 1*, and *growth hormone* gene

polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v.89, p.12-22, 2011.

MAURIC, M. et al. Effects of different variants of the *FASN* gene on production performance and milk fatty acid composition in Holstein x Simmental dairy cows. **Veterinární Medicína**, v. 64, n. 3, p. 101-108, 2019.

MCGUIRE, M.A.; MCGUIRE, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Journal of Animal Science**, v. 77, p.1-8. 2000.

MISTRY, D. H.; MEDRANO, J. F. Cloning and localization of the bovine and ovine lysophosphatidic acid acyltransferase (*LPAAT*) genes that codes for an enzyme involved in triglyceride biosynthesis. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 28-35, 2002.

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

MOHAMMADI, H.; SHAHREBABA, M.; SADEGHI, M. Association between single nucleotide polymorphism in the ovine *DGATI* gene and carcass traits in two iranian sheep breeds. **Animal Biotechnology**, v. 24, n. 3, 2013.

MOIOLI, B. et al. Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 179-192, 2007.

NASIRI, M. R. et al. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, 2006.

PARISET, L. et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 290-292, 2006.

PINHEIRO, R.S.B. et al. Tecidual composition of carcass of cuts of young and adult sheep. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 565-571, 2007.

RAZA, S.H.A. et al. Association between *FASN* gene polymorphisms ultrasound carcass traits and intramuscular fat in Qinchuan cattle. **Gene**, v. 645, p. 55-59, 2018.

REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 205p.

ROY, R. et al. Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with milk-fat content. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 215-218, 2006.

SAILO, L. et al. Association of single nucleotide polymorphism of *HSP90AB1* gene with thermotolerance and milk yield in Sahiwal cows. **African Journal Biochemistry Research**, v. 9, p. 99-103, 2015.

SAUNA, Z.E., KIMCHI-SARFATY, C., AMBUDKAR, S. V., GOTTESMAN, M.M. The sounds of silence: synonymous mutations affect function. **Pharmacogenomics**, v.8, n.6, p.527-532, 2007.



SCHENNINK, A. et al. Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGAT1*). **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 2135-2143, 2008.

SCHENNINK, A. et al. Effect of polymorphisms in the *FASN*, *OLRI*, *PPARGCIA*, *PRL* and *STAT5A* genes on bovine milk-fat composition. **Animal Genetics**, v. 40, n. 6, p. 909-916, 2009.

SCHMID, A. et al. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. **Meat Science**, v. 73, n. 1, p. 29-41, 2006.

SEVANE, N. et al. A Primer-Extension Assay for simultaneous use in cattle Genotype Assisted Selection, parentage and traceability analysis. **Livestock Science**, v.137, n.1-3, p.141-150, 2011.

SHERMAN, E.L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine *neuropeptide Y*, *growth hormone receptor*, *ghrelin*, *insulin-like growth factor 2*, and *uncoupling proteins 2* and *3* genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1–16, 2008.

SHIN, S.; CHUNG, E. Effect of single nucleotide polymorphism of endothelial differentiation G-Protein coupled receptor 1 (*EDGI*) gene on marbling score in Hanwoo. **Food Science of Animal Resources**, v. 32, n. 6, p. 776-782, 2012.

SINGH, K.V.; JAYAKUMAR, S.; MALIK, Z. S. Exploring polymorphism and effects of candidate genes on milk fat and protein quality in munjal sheep. **Indian Journal of Small Ruminants (The)**, v. 25, n. 1, p. 111-114, 2019.

SINGH, K.V. et al. SNPs association studies in promoter III of the acetyl coenzyme-A carboxylase- $\alpha$  gene (*ACACA*) in Munjal–A threatened sheep population of India. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 88, n. 7, p. 93-96, 2018.

SIRI-TARINO, P.W. et al. Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. **Current Atherosclerosis Reports**, v.12, p.384-390, 2010.

SZTANKOOVA, Z. et al. Polymorphism and association of the *FASN* gene with milk production traits in Czech sheep population. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 24, p. 84-89, 2018.

VALEH, M.V. et al. Association of growth traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone receptor (*GHR*) and growth hormone releasing hormone receptor (*GHRHR*) genes in the Baluchi Sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 6, p. 1063-1069, 2009.

VERMA, N., GUPTA, I.D., VERMA, A. Novel SNPs in *HSPB8* gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 175, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids. **From the joint FAO/WHO expert consultation on fats and fatty acids in human nutrition**, p. 10-14, 2008.

WU, J. et al. SNP variation in *ADRB3* gene reflects the breed difference of sheep populations. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8395-8403, 2012.

XU, Q.L., et al. Polymorphism of *DGAT1* associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. **Journal Science Food Agriculture**, v. 89, p. 232-237, 2009.

YOKOTA, S. et al. Contributions of *FASN* and *SCD* gene polymorphisms on fatty acid composition in muscle from Japanese Black cattle. **Animal Genetics**, v.43, p.790–792, 2012.

YU, Y.; GINSBERG, H. The role of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) in energy metabolism. **Annals of Medicine**, v. 36, n. 4, p. 252-261, 2004.

ZHANG, S. et al. Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine *acetyl-CoA carboxylase- $\alpha$*  gene with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, v. 41, n. 4, p. 417-420, 2010.

ZHANG, S. et al. DNA polymorphisms in bovine *fatty acid synthase* are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, v. 39, p. 62-70, 2008.

ZHOU, H.; HICKFORD, J. G.; FANG, Q. Single nucleotide polymorphisms of the ovine calpain 3 (*CAPN3*) gene. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, n. 1, p. 78, 2007.

**Tabela 1.** Número de observações para cada ácido graxo avaliado, média das concentrações dos ácidos graxos medidos nos músculos *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* e *Semimembranosus* e seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação.

Variáveis	n	Média	Desvio Padrão	CV%
<b>Lombo (<i>Longissimus dorsi</i>)</b>				
C10:0 (Cáprico)	94	0,11	0,03	24,53
C12:0 (Láurico)	94	0,10	0,05	41,80
C14:0 (Mirístico)	94	1,80	0,49	22,62
C16:0 (Palmítico)	94	22,64	3,56	13,42
C18:0 (Esteárico)	94	15,69	2,30	13,43
C16:1 (Palmitoleico)	94	1,42	0,27	18,37
C18:1 (Oleico)	94	52,78	5,21	8,60
C18:2 $\omega$ 6 (Linoleico)	94	4,43	1,52	33,26
C18:2c-9 t-11(CLA) <sup>1</sup>	94	0,70	0,29	33,70
AGS <sup>2</sup>	94	40,92	3,62	7,64
AGMI <sup>3</sup>	94	54,20	5,25	8,54
AGPI <sup>4</sup>	94	5,12	1,58	30,47
Relação AGI:AGS	94	1,45	0,20	11,68
Relação AGMI:AGS	94	1,34	0,26	17,47
Relação AGPI:AGS	94	0,12	0,03	27,47
Total de ácidos graxos desejáveis <sup>4</sup>	94	74,83	6,33	7,47
<b>Paleta (<i>Triceps brachii</i>)</b>				
C10:0 (Cáprico)	69	0,10	0,06	3,67
C12:0 (Láurico)	69	0,13	0,13	35,39
C14:0 (Mirístico)	69	1,79	0,99	36,11
C16:0 (Palmítico)	69	19,54	2,69	11,00
C18:0 (Esteárico)	69	15,47	3,18	13,88
C16:1 (Palmitoleico)	69	1,20	0,26	21,12
C18:1 (Oleico)	69	54,81	6,79	5,49
C18:2 $\omega$ 6 (Linoleico)	69	5,29	2,72	5,97
C18:2c-9 t-11(CLA) <sup>1</sup>	69	0,88	0,28	33,25
AGS <sup>2</sup>	69	37,86	5,85	30,89
AGMI <sup>3</sup>	69	55,65	7,30	38,18
AGPI <sup>4</sup>	69	6,17	2,79	13,53
AGI:AGS	69	1,69	0,39	12,13
AGMI:AGS	69	1,52	0,38	13,01
AGPI:AGS	69	0,17	0,08	44,70
Total de ácidos graxos desejáveis <sup>4</sup>	69	74,89	7,12	3,47
<b>Pernil (<i>Semimembranosus</i>)</b>				
C10:0 (Cáprico)	63	0,09	0,04	28,39
C12:0 (Láurico)	63	0,13	0,13	29,28
C14:0 (Mirístico)	63	1,82	0,96	33,70
C16:0 (Palmítico)	63	19,75	2,56	20,10
C18:0 (Esteárico)	63	16,00	2,74	9,76
C16:1 (Palmitoleico)	63	1,17	0,31	12,59
C18:1 (Oleico)	63	53,57	5,88	25,73
C18:2 $\omega$ 6 (Linoleico)	63	5,77	2,26	35,31
C18:2c-9 t-11(CLA) <sup>1</sup>	63	0,91	0,23	25,80
AGS <sup>2</sup>	63	38,55	5,28	7,48
AGMI <sup>3</sup>	63	54,44	6,37	5,54
AGPI <sup>4</sup>	63	6,68	2,27	30,44
AGI:AGS	63	1,63	0,33	11,65
AGMI:AGS	63	1,45	0,32	11,32
AGPI:AGS	63	0,18	0,06	33,39
Ácidos graxos desejáveis <sup>4</sup>	63	77,12	3,98	2,92

<sup>1</sup>CLA, Ácido Linoleico Conjugado; <sup>2</sup>AGS = (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0); <sup>3</sup>AGMI = (C16:1 + C18:1); <sup>4</sup>AGPI = (C18:2 + CLA); <sup>5</sup>Ácidos Graxos Desejáveis = (C18:0 + AGMI + AGPI)

**Tabela 2.** Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos cruzados.<sup>1</sup>

Identificação/número de depósito	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica
ACACA_1 (rs420069625)	C>G	CC	0,27	C	0,33
		CG	0,13	G	0,67
		GG	0,60		
ADRB3_1 (g.31849799 G>C)	G>C	CC	0,09	C	0,55
		CG	0,91	G	0,45
		GG	.		
ATP1A1_1 (rs599122362)	C>T	TT	.	T	0,07
		TC	0,14	C	0,93
		CC	0,86		
CAPN_1 (rs160945933)	A>G	AA	0,59	A	0,77
		AG	0,35	G	0,23
		GG	0,06		
CAPN_2 (rs428593688)	T>C	TT	0,15	T	0,59
		TC	0,51	C	0,41
		CC	0,47		
CAPN_3 (rs160945890)	C>G	CC	.	C	0,27
		CG	0,38	G	0,73
		GG	0,54		
CAST_2 (rs602676579)	G>C	CC	.	C	0,07
		GC	0,14	G	0,93
		GG	0,86		
CAST_3 (rs421224227)	A>G	AA	0,18	T	0,59
		AG	0,82	C	0,41
		GG	.		
CTSB_1 (rs161888250)	C>T	TT	.	T	0,07
		TC	0,15	C	0,93
		CC	0,85		
DGAT_1 (rs410015353)	C>T	TT	0,37	T	0,62
		TC	0,50	C	0,38
		CC	0,13		
EDG1_1 (rs590871285)	G>C	CC	0,33	C	0,58
		CG	0,50	G	0,42
		GG	0,17		
EDG1_2 (rs159669780)	T>C	TT	0,31	T	0,66
		TC	0,69	C	0,34
		CC	.		
FABP3_1 (g.235142245 A>G)	A>G	AA	0,18	A	0,59
		AG	0,82	G	0,41
		GG	.		
FASN_1 ( rs161102729)	C>A	AA	.	C	0,88
		AC	0,25	G	0,12
		CC	0,75		
GDF8_1 (rs119102826)	T>C	TT	0,04	T	0,74
		TC	0,40	C	0,26
		CC	0,56		
GH_1 (rs397514102)	C>T	CC	0,38	C	0,69
		TC	0,62	T	0,31
		TT	.		
GHR_1 (rs161146164)	T>G	TT	0,81	T	0,91
		TG	0,19	G	0,09
		GG	.		
GHR_2 (g.31833147 C>A)	C>A	AA	0,07	A	0,54
		AC	0,93	C	0,46
		CC	.		
GHRL_1 (rs428757090)	A>G	AA	0,34	A	0,57
		AG	0,46	G	0,43
		GG	0,20		
HSPB8_1 (rs160860233)	C>T	TT	.	T	0,03
		TC	0,14	C	0,93
		CC	0,86		
IGF1_1 (rs159876393)	A>G	AA	0,55	A	0,74
		AG	0,38	G	0,26
		GG	0,07		
LEP_1 (rs424488761)	C>T	TT	.	T	0,03
		TC	0,05	C	0,97
		CC	0,95		
LOX_2 (rs398830232)	C>T	TT	0,95	T	0,93
		TC	0,05	C	0,07
		CC	.		
MC1R_1 (rs409651063)	G>A	AA	.	A	0,09
		AG	0,18	G	0,91
		GG	0,82		
MC1R_2 (rs160910030)	G>A	AA	0,31	A	0,23
		AG	0,08	G	0,77
		GG	0,61		
MEG (rs10721184)	T>G	GG	0,35	T	0,38
		TG	0,13	G	0,68
		TT	0,52		
SCD1_1 (rs41242981)	G>T	GG	0,77	T	0,11
		TG	0,23	G	0,89
		TT	.		
UCP2_1 (rs160723758)	T>C	TT	0,54	T	0,60
		TC	0,11	C	0,40
		CC	0,35		

<sup>1</sup> HSP90AB1\_1 (rs594801080) e CAST\_1 (rs602676579) foram monomórficos.

**Tabela 3.** Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e *P-value* dos SNPs que apresentaram associações significativas com a composição de ácidos graxos nos músculos *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* e *Semimembranosus* em ovinos.

Variável	SNP	Médias dos Genótipos <sup>1</sup>			<i>P-value</i>
	ACACA_1 (rs420069625)	CC	CG	GG	
<b>Lombo (<i>Longissimus dorsi</i>)</b>					
C16:0		24,49a ±0,54	23,30a ±0,74	21,70b ±0,90	0,0149
Total de AGS		42,37a ±0,57	41,27a ±0,77	39,99b ±0,94	0,0431
AGMI:AGS		1,23b ±0,04	1,29b ±0,05	1,41a ±0,07	0,0410
<b>DGATI_1 (rs410015353)</b>					
		TT	TC	CC	
<b>Lombo (<i>Longissimus dorsi</i>)</b>					
C18:1ω9		50,88b ±1,83	51,60ab ±0,83	55,55a ±0,88	0,0453
Total de AGMI		52,31b ±1,86	53,06ab ±0,85	57,11a ±0,72	0,0451
Total de ácidos graxos desejáveis		72,46b ±2,17	72,87b ±1,00	79,79a ±0,84	0,0059
<b>FASN_1 (rs161102729)</b>					
		AA	AC	CC	
<b>Lombo (<i>Longissimus dorsi</i>)</b>					
C18:2ω6		.	5,92a ±1,19	4,34b ±0,58	0,0049
CLA		.	0,72a ±0,05	0,55b ±0,02	0,0190
Total de AGPI		.	6,62a ±0,39	4,89b ±0,18	0,0002
AGPI:AGS		.	0,14a ±0,09	0,11b ±0,04	0,0049
<b>GHR_1 (rs161146164)</b>					
		TT	TG	GG	
<b>Pernil (<i>Semimembranosus</i>)</b>					
C18:0		16,46b ± 0,93	18,86a ± 0,88	.	0,0209
C18:1ω9		52,01a ± 1,20	46,17b ± 1,13	.	<.0001
Total de AGMI		52,39a ± 1,48	46,51b ± 1,46	.	<.0001
AGMI:AGS		1,34a ± 0,01	1,16b ±0,01	.	0,0443

<sup>1</sup>Médias na mesma linha, seguidas de letras diferentes diferem entre si, a  $P < 0,05$ .

**Tabela 4.** Coeficientes de Correlação de Pearson realizado entre os ácidos graxos que apresentaram associados significativamente aos polimorfismos e características avaliadas na carcaça de ovinos cruzados.

	C16:0 Lombo	C18:1 Lombo	CLA Lombo	C18:0 Pernil	C18:1 Pernil	PA <sup>1</sup>	PCQ <sup>2</sup>	PCF <sup>3</sup>	AOL <sup>4</sup>	EGS <sup>5</sup>
C16:0 Lombo										
C18:1 Lombo	-0,43*									
CLA Lombo	-0,34*	0,45*								
C18:0 Pernil	0,06 <sup>ns</sup>	-0,37 <sup>ns</sup>	-0,23 <sup>ns</sup>							
C18:1 Pernil	-0,34 <sup>ns</sup>	0,51*	0,19 <sup>ns</sup>	-0,86***						
PA <sup>1</sup>	-0,14 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	-0,48 ***	0,61 ***					
PCQ <sup>2</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	-0,01 <sup>ns</sup>	-0,49 ***	0,62 ***	0,95***				
PCF <sup>3</sup>	-0,10 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	-0,49 ***	0,63 ***	0,95***	0,99***			
AOL <sup>4</sup>	-0,14 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	-0,46 ***	0,55 ***	0,67***	0,65***	0,67***		
EGS <sup>5</sup>	-0,09 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	-0,44 ***	0,62 ***	0,48***	0,42***	0,42***	0,36***	

PA: Peso de abate; PCQ: Peso de carcaça quente; PCF: Peso de carcaça fria; AOL: Área de olho de lombo; EGS: espessura de gordura subcutânea.

<sup>ns</sup>: não significativo; \*\*\* P < 0,0001; \* P < 0,05.

## ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DOS GENES *ATPIA1*, *GDF8*, *GHRL* e *LEP* COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM OVINOS

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de associação entre polimorfismos identificados em 13 genes candidatos com características de crescimento em ovinos. Para os estudos de associação foram utilizadas as informações sobre peso ao nascer, peso à desmama, peso de abate, ganho médio diário (GMD) pré e pós-desmame, de 236 ovinos cruzados ½ Texel x ½ SRD e pertencentes ao grupamento genético Pantaneiro. Os animais foram genotipados para 15 SNPs selecionados em 13 genes diferentes. O SNP localizado no gene *LEP* foi associado com o peso ao nascer de cordeiros. Os polimorfismos nos genes *ATPIA1* e *GDF8* influenciaram o peso à desmama dos animais, sendo que este último foi associado também com o GMD pré-desmama. Por sua vez, os genótipos do polimorfismo no gene *GHRL* foram relacionados peso ao abate. Esses dados têm o potencial para colaborar de forma positiva no melhoramento genético de características de crescimento em ovinos de corte.

**Palavras-chave:** leptina, grelina, miostatina, ganho de peso, peso à desmama, peso ao nascer

## POLYMORPHISM ASSOCIATION OF GENES *ATPIA1*, *GDF8*, *GHRL* and *LEP* WITH GROWTH TRAITS IN SHEEP

### Abstract

The objective of this work was to conduct an association study between polymorphisms identified in 13 genes selected for their participation in growth regulation, muscle mass, fat deposition and adaptability with growth traits in sheep. For the association studies, it was used information on birth weight, weaning weight, slaughter weight, pre and post-weaning ADG, of 236 ½ Texel x ½ NDB crossbreed sheep and belonging to the Pantaneiro genetic group. The animals were genotyped for 15 SNPs selected in 13 different genes. The SNP *LEP*\_1 (rs424488761) was associated with birth weight of the lambs. The polymorphisms *ATPIA1*\_1 (rs599122362) and *GDF8*\_1 (rs119102826) influenced the animals' weaning weight, the latter being also associated with pre-weaning ADG. Nevertheless, the genotypes of *GHRL*\_1 (rs428757090) were related to the slaughter weight. These data have the potential to contribute to the genetic improvement of growth traits in beef sheep.

**Keywords:** leptin, ghrelin, myostatin, weight gain, weaning weight, birth weight



## 1. Introdução

Um sistema eficiente de produção de carne ovina, entre outros fatores, é reflexo da escolha de genótipos adequados, do potencial de crescimento dos cordeiros, do manejo alimentar, da eficiência reprodutiva e do rendimento em carne (PILAR et al., 2000). Nesse sentido, as estratégias de melhoramento genético das características de crescimento, aliadas ao manejo nutricional e sanitário podem maximizar o desempenho zootécnico dos animais e elevar os índices produtivos, favorecendo o abate mais precoce e com maior retorno econômico.

Nos próximos anos, não há dúvida de que a pesquisa e inovação desempenharão um papel fundamental no aumento da produtividade alimentar. Dessa forma, é provável que a cadeia produtiva de ovinos tenha que enfrentar dois principais desafios: o primeiro, elevar a produção e a eficiência, contemplando concomitantemente a diferenciação do produto e agregação de valor; e o segundo, aumentar a velocidade da adoção de tecnologias para competir de forma mais equiparada com as demais carnes (MONTOSI et al., 2013).

As pesquisas têm se concentrado em metodologias mais eficientes para incorporar os dados gerados por marcadores moleculares em programas de melhoramento genético (MONTOSI et al., 2013). A utilização dessas informações moleculares no melhoramento de ovinos, pode contribuir positivamente por meio do aumento da acurácia na predição dos valores genéticos, aumento da intensidade de seleção e pela redução do intervalo de gerações (LÔBO & LÔBO, 2007).

Novas informações foram geradas a partir do estudo de marcadores em genes que participam de eixos hormonais relacionados ao metabolismo intermediário e aos processos do crescimento animal. Os genes envolvidos no eixo somatotrópico, por exemplo, demonstraram influência na variação genética do desenvolvimento ponderal e características de crescimento entre os indivíduos (MORADIAN et al., 2013).

Em ovinos, alguns exemplos podem ser destacados como os polimorfismos identificados no gene do hormônio do crescimento (*GH*) foram relacionados ao peso de nascimento, peso à desmama e peso corporal as 6, 9 e 12 meses (MORADIAN et al., 2013); no gene do receptor do hormônio do crescimento (*GHR*) foram associados ao ganho médio diário do nascimento a desmama (VALEH et al., 2007); e, por sua vez, no gene da leptina (*LEP*) foram associados ao peso à desmama e ganho médio diário pós-desmama (TAHMOORESPUR et al., 2010; HAJIHOSSEINLO et al., 2012; SHOJAEI et al., 2011) e peso aos 12 meses (SHOJAEI et al., 2011).

Apesar dos avanços obtidos, as características de crescimento são complexas e resultam da ação poligênica, portanto é possível a que contribuição de muitos polimorfismos em diferentes genes ainda não tenha sido estudada.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de associação entre polimorfismos identificados em genes candidatos com características de crescimento em ovinos.

## 2. Material e Métodos

### *Animais, coleta de amostras e dados fenotípicos*

Foram coletadas amostras biológicas e dados fenotípicos 236 ovinos, sendo 139 machos e fêmeas oriundos do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Texel x  $\frac{1}{2}$  SRD com idade entre 6 e 7 meses, pertencentes a Fazenda União, localizada no município de Sidrolândia, MS. Os machos eram confinados após o desmame, recebendo dieta à base de milho e aveia em grão, farelo de soja e milho triturado e as fêmeas permaneciam em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, recebendo suplementação mineral. Foi realizada a coleta de amostras de sangue por via endovenosa, utilizando tubos a vácuo (Vacutainer) contendo K3 EDTA a 15%, para a extração de DNA. De acordo com o registro de cada animal, foram obtidas as informações referentes ao desempenho zootécnico: pesos ao nascer, peso à desmama e, posteriormente, o peso de abate. O ganho médio diário (GMD) pré-desmame foi obtido pela a diferença entre peso ao desmame e peso ao nascer dividido pela idade em dias (g/dia). De forma semelhante, o ganho médio diário (GMD) pós-desmame, foi obtido pela a diferença entre peso de abate e peso ao desmame dividido pelo intervalo em dias (g/dia).

Os demais 97 animais, eram fêmeas do grupamento genético Pantaneiro, com idades entre 6 e 12 meses, oriundas da Fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte, localizada no município de Terenos, MS. Estes animais eram mantidos sob pastagem *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e suplementação mineral. Também foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA e, de acordo com registro de cada fêmea, obtidas as informações referentes aos seus pesos ao nascer e peso à desmama, sendo calculado o GMD pós-desmame. O número de observações de cada característica, as médias e seus respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.

### *Extração de DNA*

O DNA foi extraído no Laboratório de Genômica e Melhoramento Animal (GEMA), da Embrapa Gado de Corte, MS, a partir de leucócitos, seguindo o protocolo de Regitano & Coutinho (2001). A integridade e a concentração das amostras de DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (0,8%) e espectrofotometria em aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific ND 1000*).

### *Seleção dos SNPs*

Foram selecionados 15 SNPs em 13 genes candidatos associados previamente à regulação do crescimento, musculabilidade, deposição de gordura e adaptabilidade bovinos e ovinos (Tabela 2 - Apêndice), a partir do sequenciamento de pools gênicos de quatro raças ovinas: Ile de France, Suffolk, Santa Inês e Pantaneira. Cada pool racial continha DNA de 10 indivíduos.

Os SNPs genotipados para associação com dados fenotípicos foram: g.31849799 G>C - sem depósito (*ADRB3* –  $\beta$ -adrenergic receptor); rs599122362 (*ATP1A1* -  $Na^+K^+$  ATPase  $\alpha 1$ ); g.235142245A>G - sem depósito (*FABP3* - Fatty acid binding protein 3); rs119102826 (*GDF8* - Myostatin); rs397514102 (*GH* - Growth hormone); rs161146164 e g.31833147C>A - sem depósito (*GHR* - Growth hormone receptor); rs428757090 (*GHRL* - Ghrelin); rs594801080 (*HSP90AB1*- Heat shock proteins 90) rs160860233 (*HSPB8* - Heat Shock Protein Family B); rs414488761 (*LEP* - Leptin); rs398830232 (*LOX* - Lysyl oxidase); rs409651063 e rs160910030 (*MC1R* - Melanocortin 1 receptor); rs10721184 (*MEG3* - Maternally expressed 3); rs160723758 (*UCP2* - Uncoupling proteins 2). A partir da sequência obtida e sua comparação no banco de dados *Ensembl Genomes* foi obtida a identificação e a localização cromossômica de cada um dos polimorfismos.

### *Amplificação por PCR multiplex*

Os SNPs selecionados amplificados pela reação de PCR multiplex (Tabelas 2 - Apêndice). Os *primers* que flanqueiam os SNPs dos genes *ATP1A1*, *HSP90AB1*, *HSPB8* e *UCP2* foram validados e otimizados da espécie bovina para ovina.

As reações de PCR multiplex foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante, em um volume final de 25 µl, constituídas de 40 ng de amostra de DNA, um pool dos *primers* com concentração final de 0,2 µM de cada, 0,6x QIAGEN Multiplex PCR master mix e 0,3x Q-Solution. Para amplificação utilizou-se o termociclador *Vereti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), seguindo o protocolo de 15 minutos para desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. O êxito da amplificação foi verificado via eletroforese em gel de agarose a 3 %. Após a PCR multiplex, foi realizada a etapa de purificação, onde os *primers* não incorporados e os dNTPs foram removidos utilizando 2,5 U de ExoI, 0,5 U de SAP e em 7 µl de produto de PCR. Em seguida, as reações foram incubadas a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 80 °C durante 20 minutos.

#### *Amplificação por SNaPshot® e genotipagem*

Os *primers* específicos para *SNaPshot®* foram confeccionados de acordo os parâmetros de qualidade do pacote do software *Geneious v5.2* (DRUMMOND et al., 2011; disponível em <http://www.geneious.com/>) e *Batchprimer3 v1*. Foram adicionadas caudas de diferentes comprimentos (poli TC) à suas extremidades 3', para que pudessem variar em tamanho de 22 a 81 pb (Tabelas 1 e 2 - Apêndice).

Os *primers* de base única (SBE) foram divididos em dois *mixes* para a realização da reação de *SNaPshot®*, de acordo com o delineamento das PCR multiplexes. As reações de *SNaPshot®* foram realizadas com o kit multiplex *SNaPshot®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante, em um volume total de 8 µl, contendo 2,5 µl *SNaPshot® mix*, 2,5 µl de amplicons de reação de PCR de multiplex e 1 µl da mistura de *primers* (as concentrações otimizadas de cada *primer* de base única adicionado foram apresentadas nas Tabelas 1 e 2 – Apêndice). As reações foram realizadas em termociclador, com as seguintes condições: 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Os produtos amplificados foram purificados por adição de uma unidade de SAP na reação de *SnaPshot®*. Posteriormente, esta mistura foi incubada a 37 °C durante 60 minutos, seguido de 75°C durante 15 minutos. Após a purificação, uma alíquota de 0,5µl *SNaPshot®* foi adicionada a 9,25 µl e de formamida *Hi-Di®* (Applied Biosystems) 0,25µl do padrão interno de tamanho *GeneScan-120® LIZ* (Applied Biosystems). As reações foram aquecidas a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, as foram submetidas a eletroforese capilar em sequenciador automático

*ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems)*. Os eletroferogramas gerados foram interpretados com o auxílio do *GeneMapper Software v4.1 (Applied Biosystems)*.

### *Análises estatísticas*

Os estudos de associação foram realizados utilizando análise de variância para características relacionadas ao desempenho dos cordeiros, utilizando o modelo linear geral (GLM) no programa estatístico SAS (SAS Institute, 2003). Para cada um dos polimorfismos, o seguinte modelo misto foi aplicado:

$$Y_{i,j,k,l,m,n} = \mu + GG_j + \text{dieta}_k(GG_j) + \text{sexo}_l + \text{snp}_{mn} + e_{i,j,k,l,m,n}$$

Onde:

$Y$  – é o valor da variável observada na I-ésima repetição, do J-ésimo grupo genético, com K-ésima dieta, no L-ésimo sexo;

$\mu$  – é a média de  $Y$ ;  $GG_j$  – efeito aleatório do J-ésimo grupo genético, sendo J variável de 1 – 2;

$\text{dieta}_k(\text{exp}_j)$  – é o efeito aleatório do K-ésima dieta dentro do J-ésimo grupo genético, sendo K variável de 1 – 3;

$\text{sexo}_l$  – é efeito aleatório do L-ésimo sexo, sendo L variável de 1 – 2;

$\text{snp}_{mn}$  – é efeito fixo do N-ésimo genótipo do M-ésimo snp, e;

$e_{i,j,k,l,m,n}$  – é erro aleatório.

Quando detectados efeitos significativos para os polimorfismos no modelo, seus genótipos foram submetidos a comparação de médias pelo teste de Tukey Kramer ( $P < 0,05$ ).

### **3. Resultados**

Foram avaliados 15 SNPs selecionados em 13 genes relacionados à regulação do crescimento, musculabilidade, deposição de gordura e adaptabilidade. As frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo estão apresentadas na Tabela 2. Os SNPs *FABP3\_1* (g.235142245 A>G) e *HSPB90ABI\_1* (rs594801080) apresentaram pouca variabilidade na população avaliada.

Foram realizados estudos de associação entre os SNPs e o desempenho dos animais no peso ao nascer, peso à desmama, peso de abate, GMD pré-desmame e GMD pós-desmame. Como resultado foram detectadas associações significativas dos fenótipos com quatro polimorfismos, *ATPIAI\_1* (rs599122362), *GDF8\_1* (rs119102826), *GHRL\_1* (rs428757090) e *LEP\_1* (rs424488761) (Tabela 3).

O polimorfismo *LEP\_1* (rs424488761) foi associado com o peso ao nascer dos cordeiros, sendo que os heterozigotos TC apresentaram diferença média de 0,436 kg, quando comparados com CC.

O polimorfismo *GDF8\_1* (rs119102826) influenciou o peso à desmama dos animais e o GMD pré-desmame. Os indivíduos com genótipo TT apresentaram peso superior aos demais genótipos, com diferença estimada de 3,622 kg quando comparados aos heterozigotos TC e 3,967 kg em relação aos homozigotos CC. O mesmo comportamento foi observado para GMD pré-desmama, sendo TT superior a TC e CC.

O SNP *ATPIAI\_1* (rs599122362) também foi relacionado ao peso à desmama dos cordeiros. Verificou-se que os animais com genótipo CC apresentaram peso superior, heterozigotos TC foram intermediários e a menor média atribuída ao homozigoto TT (diferença estimada de 3,162 kg em relação a CC).

No tocante aos genótipos de *GHRL\_1* (rs428757090), estes foram relacionados com o peso de abate. Os animais com genótipo GG apresentaram média de peso maior que os demais genótipos, sendo a diferença estimada entre GG e AG de 4,09 kg e entre GG e AA de 3,98 kg.

#### 4. Discussão

O desempenho produtivo dos animais depende tanto de fatores genéticos quanto dos não genéticos. Como as características de crescimento (pesos e ganhos de peso) têm sido consideradas prioritárias na seleção, o conhecimento dos agentes que contribuem para a variação genética nas diferentes fases da vida dos indivíduos se torna muito significativo.

O peso ao nascer indica o desenvolvimento intrauterino do animal, sendo determinado, em grande parte, pelos fatores genéticos e ambientais relacionados à progenitora durante a gestação (DE CASTRO et al., 2013). Apesar de estudos encontrarem que o peso ao nascer possui uma correlação positiva mediana com os pesos e ganhos diários nas fases posteriores do desenvolvimento do animal (desmame e abate), o peso de nascimento tem implicações diretas nos índices de sobrevivência neonatal de cordeiros (DA SILVA et al., 1993; NÓBREGA et al.,

2005). Outra utilidade do peso ao nascer seria a possibilidade de determinação de pesos limites para se evitarem partos difíceis em cada raça.

Por sua vez, o período de desmama é a fase em que ocorre a supressão total da ingestão de leite pelo cordeiro. Portanto, considerada uma fase crítica, pois tem alta correlação com os ganhos de peso na fase pós-desmama (DE CASTRO et al., 2013). Além disso, neste período pode ocorrer a comercialização de cordeiros, sendo o peso o principal balizador para orientar o destino dos animais.

No que concerne ao peso de abate, verifica-se que esta é uma variável de grande importância no desempenho produtivo do animal, no entanto, não deve ser considerada sozinha. Associado à faixa etária, é um indicativo de eficiência do animal e uma referência para a determinação do momento de abate, evitando-se idades muito avançadas e/ou alta deposição de gordura na carcaça (PILAR et al., 2000). Além disso, o estabelecimento do peso ótimo para o abate também dependerá do sistema de produção utilizado e da demanda do mercado consumidor (MONTOSI et al., 2007).

#### *Associação com peso ao nascer*

O SNP *LEP\_1* (rs424488761) foi associado com o peso ao nascer de cordeiros. O gene *LEP* está localizado no cromossomo 4 de ovinos, codificando a leptina, um hormônio papel central na regulação da homeostase da energia corporal (CHILLIARD et al., 2005).

A relação encontrada neste trabalho, corrobora com as funções biológicas descritas na literatura para este hormônio, pois durante a gestação, a leptina participa da coordenação do metabolismo placentário e do suprimento nutricional do feto, além de possuir um importante papel na angiogênese, hematopoiese e no desenvolvimento dos ossos e cartilagens no período intrauterino (PRIYADARSHINI et al., 2016).

O conhecimento de outra atuação deste hormônio, também pode colaborar na compreensão desta influência, pois a leptina apresenta um efeito de estímulo sobre a secreção do hormônio do crescimento (GH), que por sua vez, participa do desenvolvimento e crescimento dos tecidos no período embrionário (COSTINE et al., 2005). Devido a todos estes efeitos, foram observados altos níveis de leptina em fetos até o terço final da gestação em ovinos (MUNOZ-GUTIERREZ et al., 2005).

Uma associação semelhante foi relatada para ovinos Makoei e Kurdi, raças nativas do Irã, com efeitos dos genótipos se estendendo ao ganho de peso no intervalo entre o nascimento até o desmame (HAJIHOSSEINLO et al., 2012; SHIBAK et al., 2015). No entanto neste

trabalho, não houve relação do SNP avaliado com GMD pré-desmame, sendo possível inferir que, para o grupo de animais aqui estudados, os efeitos dos genótipos da leptina sejam mais determinantes na fase fetal, causando diferenças apenas no peso ao nascer.

#### *Associações com peso à desmama*

A miostatina, também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8 (*GDF8*), é um membro de uma superfamília de fatores de crescimento, que desempenham papéis essenciais tanto na regulação do desenvolvimento embrionário quanto na manutenção da homeostase tecidual em animais adultos (HICKFORD et al., 2010; SAHU et al., 2017). A miostatina é o principal regulador da miogênese e funciona como um regulador negativo do crescimento muscular em mamíferos. Algumas mutações podem causar a perda ou redução da função no gene *GDF8*, sendo associadas ao aumento da massa muscular esquelética e ao fenótipo da musculatura dupla em várias espécies, inclusive a ovina (CLOP et al., 2006; KIJAS et al. 2007).

Neste estudo, o SNP *GDF8\_1* (rs119102826) influenciou o peso à desmama e o GMD pré-desmama. O crescimento de cordeiros é representado por uma linha linear crescente até a 10ª semana de vida (GODWIN, 1975), sendo assim, considerando que a desmama dos animais avaliados foi realizada em média na 11ª semana de idade, a associação de *GDF8\_1* (rs119102826) coincide com a fase de maior desenvolvimento muscular de cordeiros.

O SNP rs119102826 é uma mutação não-sinônima, localizada no íntron 1 do gene *GDF8* e resulta na substituição de aminoácidos fenilalanina para serina. Haplótipos formados pelos alelos de oito polimorfismos encontrados no íntron 1, incluindo rs119102826, foram avaliados em raças polonesas, sendo encontrada a influência na variação do peso aos 56 dias e no ganho médio diário dos entre o 2º e 56º dias dos cordeiros (KOLENDA et al., 2019). Os mesmos haplótipos foram associados às variações no rendimento de cortes do pernil, paleta e lombo de ovinos Romney (HICKFORD et al., 2010; IBRAHIM & HICKFORD, 2015). Outro estudo, buscando avaliar a relação do gene *GDF8* com características produtivas em ovinos da Nova Zelândia, observou que os haplótipos de um grupo de 13 SNPs, incluindo mais uma vez rs119102826, também foram associados ganho médio diário no período pré-desmame e ao rendimento de cortes cárneos (HAN et al., 2015).

Portanto, é possível verificar que os SNPs de *GDF8* possuem uma consistente influência sobre diversas características de crescimento e carcaça em ovinos. Contudo, referindo-se especificamente ao polimorfismo estudado localizado em um íntron do gene, uma



região não codificante do DNA, torna-se mais difícil concluir como ele poderia afetar atividade da miostatina. As possibilidades incluem o fato de que uma mudança na sequência intrônica poderia afetar o *splicing*, ou então, que este polimorfismo esteja ligado à outras mutações em regiões de controle gênico, como c.1232G>A, que comprovadamente causa inibição da expressão da miostatina e contribui para a hipertrofia muscular em ovinos (CLOP et al., 2006; HICKFORD et al., 2010).

O SNP *ATPIA1\_1* (rs599122362) também foi associado ao peso à desmama de cordeiros. O gene *ATPIA1* codifica a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$ , um componente sistema de transporte ativo ligado à membrana, que controla o gradiente de íons (DAS et al., 2017). A atuação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$  tem papel determinante no metabolismo basal, pois existe um alto consumo de ATP para realizar o bombeamento de 3  $\text{Na}^+$  para meio extracelular e 2  $\text{K}^+$  para o intracelular, utilizando cerca de 19 a 28% da ATP produzida pelas células (KASHYAP et al., 2015). Além disso, possui ação direta na secreção de insulina para manutenção da homeostase de glicose no sangue, na síntese e nas vias de sinalização de hormônios tireoidianos (T3 e T4), que regulam metabolismo proteico, o crescimento ósseo e atuam juntamente ao GH e as somatomedinas (SAHOO et al., 2016).

Muitos estudos com polimorfismos deste gene têm focado na avaliação de sua relação com tolerância ao calor em bovinos e ovinos (LIU et al., 2010; KASHYAP et al., 2015; DAS et al., 2017) e, apesar de sua descrição fisiológica apontar que este possa ser um gene candidato para as variações genéticas nas características de crescimento, trabalhos neste sentido são escassos. Um estudo de associação genômica ampla (GWAS) constatou o potencial deste gene como um marcador para índices de desempenho animal, onde *ATPIA1* apresentou forte efeito sobre a conversão alimentar em bovinos (BARENDSE et al., 2007).

Assim sendo, é plausível que a participação do gene *ATPIA1* em várias vias importantes do metabolismo animal possa ser a causa dessa associação encontrada, no entanto, não possível afirmar com precisão qual delas atuou sobre o peso à desmama dos ovinos. Dessa forma, sugere-se que os polimorfismos desse gene participem de outros estudos de associação, com o objetivo de validar este resultado e buscar melhor compreensão de quais redes genéticas e metabólicas estão envolvidas com este achado.

#### *Associação com peso de abate*

Os genótipos de *GHRL\_1* (rs428757090) foram relacionados com peso de abate. O gene *GHRL*, codifica a grelina, localizando-se no cromossomo 19 de ovinos. O principal papel do

hormônio grelina é a regulação da ingestão de alimento, peso corporal e motilidade gastrointestinal (MAHMOUD et al., 2016). Sendo que em bovinos, polimorfismo do gene *GHRL* foram associados com eficiência alimentar (SHERMAN et al., 2008).

Dessa forma, observa-se que o papel da grelina vai além da regulação do apetite, pois este hormônio e seus receptores também estimulam a liberação de GH pela hipófise anterior (KOJIMA et al., 1999; KOJIMA & KANGAWA, 2015). O estímulo efetuado pela grelina sobre o GH é duas a três vezes maior que o realizado pelo hormônio liberador de hormônio do crescimento (*GHRH*), em ratos e humanos (SATO et al., 2011). Ensaios com coibaias, constataram que a injeção intraperitoneal de grelina aumenta a ingestão de alimentos e diminui o gasto de energia, resultando em ganho de peso (RÜTER et al., 2003).

A partir dessas premissas, SNPs identificados no gene da grelina (*GHRL*) e seu receptor (*GHSR*) foram avaliados em uma raça de bovinos chinesa, sendo relacionados ao aumento peso corporal aos 6 meses, GMD até os 6 meses e medidas morfológicas (ZHANG et al., 2009; ZHANG et al., 2012). O resultado encontrado neste trabalho endossa a influência do gene *GHRL* sobre o peso corporal e condiz com os relatos da literatura das associações para bovinos e outros modelos animais.

Por fim, observa-se que algumas associações esperadas não foram detectadas, como por exemplo, com o gene do hormônio do crescimento e seu receptor (*GH* e *GHR*). Da mesma forma, polimorfismos nos genes *FABP3*, *UCP2*, *MEG*, relacionados a maior deposição de músculo e gordura e características de carcaça em ovinos e bovinos (COCKETT et al., 2005; CHO et al., 2008; TELLAM et al., 2012; YANG et al., 2014), não apresentaram influência sobre as variáveis relacionadas ao crescimento de ovinos cruzados e Pantaneiro.

Apesar de *ATPIA1\_1* (rs599122362) apresentar efeito significativo sobre as características avaliadas, o mesmo não foi encontrado para outros SNPs em genes relacionados à adaptabilidade de ruminantes ao calor, como *HSPB90AB1\_1* (rs594801080), *MC1R\_1* (rs409651063) e *MC1R\_2* (rs160910030). A variação genética da adaptação dos animais ao calor é fator importante a ser considerado na produção, pois o estresse acarreta em falhas na capacidade do animal de expressar seu potencial genético, por incapacidade de se ajustar ao ambiente (OSEI-AMPONSAH, et al, 2019). Portanto, podem afetar as características produtivas em vários níveis, sendo assim, mais estudos nesta linha devem ser considerados.

## 5. Conclusão

Os resultados deste estudo apresentam quatro polimorfismos, identificados em genes de envolvidos na regulação do crescimento (*LEP\_1* - rs424488761 e *GHRL\_1* - rs428757090), na musculosidade (*GDF8\_1* - rs119102826) e na adaptabilidade ao calor (*ATPIAI\_1* - rs599122362), que podem contribuir para uma maior compreensão da variação genética que influencia as características de crescimento de ovinos.

Além disso, esses dados têm o potencial para colaborar em programas de melhoramento genético de ovinos de corte, com efeitos positivos no peso ao nascer, nos ganhos pré-desmama, no peso à desmama e no peso de abate, de forma que seja possível adequar os desempenhos dos animais para a produção de carne com eficiência e qualidade.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, à Embrapa Gado de Corte e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 6. Referências

- BARENDSE, W. et al. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v. 176, n. 3, p. 1893-1905, 2007.
- BOUILLAUD, F. UCP1, UCP2 and UCP3: are they true uncouplers of respiration? **International Journal of Obesity**, v. 23, n. S6, p. S19, 1999.
- CALVO, J. H. et al. Association of the heart fatty acid-binding protein (*FABP3*) gene with milk traits in Manchega breed sheep. **Animal genetics**, v. 35, n. 4, p. 347-349, 2004.
- CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 3-22, 2005.
- CHO, S. et al. Identification of genetic polymorphisms in *FABP3* and *FABP4* and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p. 29-34, 2008.
- CLOP, A. et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature genetics**, v. 38, n. 7, p. 813, 2006.
- COCKETT, N.E. et al. The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. **Genetics Selection Evolution** v.37, n.1, p.S65, 2005.
- COSTINE, B.A. et al. Growth hormone at breeding modifies conceptus development and postnatal growth in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 4, p. 810-815, 2005.
- DA SILVA, F.L.R. et al. Effect of genetic factors on pre-weaning growth in crossbred Santa Inês lambs, in the State of Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 627-633, 1993.
- DAS, R. et al. Single nucleotide polymorphisms in *ATPIA1* gene and their association with thermotolerance traits in Sahiwal and Karan Fries cattle. **Indian Journal of Animal Research**, v. 51, n. 1, p. 70-74, 2017.
- DE CASTRO, F.A.B. et al. Performance from birth to weaning of Santa Inês lambs born to ewes fed different levels of energy. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 3379-3388, 2013.
- GOODWIN, D. H. The production and management of sheep. London, Hutchinson, 1975. 207p.
- HAJIHOSSEINLO, A., HASHEMI, A. AND SADEGHI, S. Association between polymorphism in exon 3 of *leptin* gene and growth traits in the Makoei sheep of Iran. **Livestock Research for Rural Development**, v.24, n.9, p.543-546, 2012.
- HAN, J. et al. Myostatin (*MSTN*) gene haplotypes and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney lambs. **Small Ruminant Research**, v. 127, p. 8-19, 2015.
- HICKFORD, J.G.H. et al. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (*MSTN*) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Animal Genetics**, v. 41, n. 1, p. 64-72, 2010.

IBRAHIM, A.; HICKFORD, J. Correlation analysis between *myostatin* gene polymorphisms and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Egyptian Journal of Genetics and Cytology**, v. 44, n. 2, p. 189-204, 2015.

KASHYAP, N. et al. Association of *ATP1A1* gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 892, 2015.

KIJAS, J.W. et al. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. **BMC Genetics**, v. 8, n. 1, p. 80, 2007.

KOJIMA M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, p. 656–660, 1999.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 495-522, 2005.

KOLENDA, M. et al. The association between the polymorphism in the *myostatin* gene and growth traits in Kamieniec and Pomeranian sheep breeds. **Small Ruminant Research**, 2019.

LIU, Y.X. et al. Association of *ATP1A1* gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 891-896, 2010.

LÔBO, R.N.B.; LÔBO, A.M.B.O. Animal breeding as a tool for upgrowth and development of meat sheep sector, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 247-253, 2007.

MAHMOUD, A.H. et al. Molecular Characterization of *Ghrelin* gene in sheep of Saudi Arabia. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 39-44, 2016.

MONTOSSI, F. et al. Sustainable sheep production and consumer preference trends: Compatibilities, contradictions, and unresolved dilemmas. **Meat science**, v. 95, n. 4, p. 772-789, 2013.

MORADIAN, C. et al. Effects of genetic polymorphism at the growth hormone gene on growth traits in Makooei sheep. **European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 3, p. 101-105, 2013.

MUNOZ-GUTIERREZ, M. et al. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2,-4 and-5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 869-881, 2005.

NÓBREGA, J.E. da et al. Perinatal mortality of lambs in the semi-arid region of Paraíba, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 3, p. 171-178, 2005.

OSEI-AMPONSAH, R. et al. Genetic Selection for Thermotolerance in Ruminants. **Animals**, v. 9, n. 11, p. 948, 2019.

PARISET, L. et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in sheep and their variation as evidence of selection. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 290-292, 2006.

PILAR, R.C et al. Considerações sobre produção de cordeiros. **Boletim Agropecuário**, 53. Editora UFLA, Lavras, MG, 2000.

PRIYADARSHINI, L. et al. Role of leptin in physiology of animal reproduction - A review. **Agricultural Reviews**, v. 36, n. 3, p. 235-240, 2015.

REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, 205p.

RÜTER, J. et al. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. **Brain Research**, v. 991, n. 1-2, p. 26-33, 2003.

SAHOO, S.S. et al. Comparative in silico and protein-protein interaction network analysis of *ATPIA1* gene. **Gene Reports**, v. 5, p. 134-139, 2016.

SAHU, A.R. et al. Polymorphism in exon 3 of myostatin (*MSTN*) gene and its association with growth traits in Indian sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 81-84, 2017.

SAILO, L. et al. Association of single nucleotide polymorphism of *HSP90AB1* gene with thermotolerance and milk yield in Sahiwal cows. **African Journal Biochemistry Research**, v. 9, p. 99-103, 2015.

SATO, T. et al. Structure, regulation and function of ghrelin. **The Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 119-128, 2011.

SEVANE, N. et al. A Primer-Extension Assay for simultaneous use in cattle Genotype Assisted Selection, parentage and traceability analysis. **Livestock Science**, v. 137, n. 1-3, p. 141-150, 2011.

SHERMAN, E.L. et al. Polymorphisms and haplotypes in the bovine *neuropeptide Y*, *growth hormone receptor*, *ghrelin*, *insulin-like growth factor 2*, and *uncoupling proteins 2 and 3* genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 1-16, 2008.

SHIBAK, A. et al. Study of genetic polymorphisms in exon 3 of the *Leptin* gene and its association with birth weight and growth traits in North Khorasan Kurdi sheep, **Modern Genetics Journal (MGJ)**, v. 9, n. 4, p. 511-516, 2015.

SHOJAEI, M. et al. AKHONDI, M. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 2, n. 2, p. 67-73, 2011.

TAHMOORESPUR, M. et al. Assessment relationship between leptin and ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding values (EBVs) of growth traits in Baluchi sheep. **Journal of animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 19, p. 2460-2465, 2010.

TELLAM, R.L., COCKETT, N.E., VUOCOLO, T. AND BIDWELL, C.A. Genes contributing to genetic variation of muscling in sheep. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 164, 2012.

VALEH, M.V. et al. Association of growth traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone receptor (*GHR*) and growth hormone releasing hormone receptor (*GHRHR*) genes in the Baluchi Sheep. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 6, p. 1063-1069, 2009.

WU, J. et al. SNP variation in *ADRB3* gene reflects the breed difference of sheep populations. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 8, p. 8395-8403, 2012.

YANG, G. et al. Genetic variation in the ovine uncoupling protein 1 gene: association with carcass traits in New Zealand (NZ) Romney sheep, but no association with growth traits in either NZ Romney or NZ Suffolk sheep. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 131, n. 6, p. 437-444, 2014.

ZHANG, A. et al. Effects of ghrelin gene genotypes on the growth traits in Chinese cattle. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 6, p. 6981-6986, 2012.

ZHANG, B. et al. Associations of polymorphism within the *GHSR* gene with growth traits in Nanyang cattle. **Molecular biology reports**, v. 36, n. 8, p. 2259, 2009.

**Tabela 1.** Número de observações, média e seus respectivos desvios padrões e coeficientes de variação de características de crescimento em ovinos.

<b>Variáveis</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CV%</b>
Peso ao nascer (kg)	236	3,84	0,89	23,60
Peso à desmama (kg)	236	19,1	4,06	20,81
Peso de abate (kg)	139	36,07	5,90	11,63
GMD <sup>1</sup> pré-desmama (g/dia)	236	188	0,04	22,82
GMD <sup>1</sup> pós-desmama (g/dia)	139	165	0,11	22,09

<sup>1</sup>GMD: Ganho médio diário



**Tabela 2.** Identificação/número de depósito, SNP e suas respectivas frequências genotípicas e alélicas em uma população de ovinos.

Identificação /número de depósito	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica	Alelo	Frequência Alélica
<i>ADRB3_1</i> (g.31849799 G>C)	G>C	CC	0,56	C	0,70
		CG	0,28	G	0,30
		GG	0,16		
<i>ATPIAI_1</i> (rs599122362)	C>T	TT	0,12	T	0,18
		TC	0,14	C	0,82
		CC	0,75		
<i>FABP3_1</i> (g.235142245 A>G)	A>G	AA	0,95	A	0,98
		AG	0,05	G	0,02
		GG	.		
<i>GDF8_1</i> (rs119102826)	T>C	TT	0,20	T	0,41
		TC	0,41	C	0,59
		CC	0,39		
<i>GH_1</i> (rs397514102)	C>T	CC	0,70	T	0,15
		TC	0,30	C	0,85
		TT	.		
<i>GHR_1</i> (rs161146164)	T>G	TT	0,84	T	0,91
		TG	0,16	G	0,09
		GG	.		
<i>GHR_2</i> (g.31833147 C>A)	C>A	AA	0,82	A	0,91
		AC	0,18	C	0,09
		CC	.		
<i>GHRL_1</i> (rs428757090)	A>G	AA	0,59	A	0,74
		AG	0,31	G	0,26
		GG	0,10		
<i>HSPB90AB1_1</i> (rs594801080)	C>T	CC	0,94	C	0,97
		CG	0,06	G	0,03
		GG	.		
<i>LEP_1</i> (rs424488761)	C>T	TT	.	T	0,07
		TC	0,14	C	0,93
		CC	0,86		
<i>LOX_1</i> (rs398830232)	C>T	TT	0,59	T	0,74
		TC	0,30	C	0,26
		CC	0,11		
<i>MC1R_1</i> (rs409651063)	G>A	AA	0,86	A	0,91
		AG	0,12	G	0,09
		GG	0,03		
<i>MC1R_2</i> (rs160910030)	G>A	AA	0,11	A	0,34
		AG	0,47	G	0,66
		GG	0,42		
<i>MEG_1</i> (rs10721184)	T>G	GG	0,49	T	0,31
		TG	0,39	G	0,69
		TT	0,12		
<i>UCP2_1</i> (rs160723758)	T>C	TT	0,08	T	0,37
		TC	0,58	C	0,63
		CC	0,34		

**Tabela 3.** Média dos quadrados mínimos dos genótipos, desvio-padrão e *P-value* dos SNPs que apresentaram associações significativas com as características de crescimento em ovinos.

Variável	SNP	Médias dos Genótipos <sup>1</sup>			<i>P-value</i>
		TT	TC	CC	
Peso à desmama (kg)	<i>ATPIA1_1</i> (rs599122362)				
		16,30b ±1,12	17,17ab ±1,26	19,46a ±0,64	0,0086
Peso à desmama (kg)	<i>GDF8_1</i> (rs119102826)				
		22,24a ± 0,97	18,62b ± 0,86	18,28b ± 0,59	<,0001
GMD pré-desmame (g/dia)		220a ±0,01	191b ±0,01	189b ±0,01	0,0066
Peso de abate (kg)	<i>GHRL_1</i> (rs428757090)				
		36,37b ±0,67	36,26b ±0,83	40,36a ±1,74	0,0481
Peso ao nascer (kg)	<i>LEP_1</i> (rs424488761)				
		.	4,13a ±0,23	3,70b ±0,13	0,0365

linha, seguidas de letras diferentes diferem entre si, a  $P < 0,05$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que o setor da ovinocultura de corte nacional aumente sua competitividade diante de outros mercados é de grande valia que mais tecnologias sejam validadas e incorporadas no sistema de produção, para elevar os índices de eficiência produtiva e agregar valor no produto final. A utilização de informações moleculares no melhoramento de ovinos, pode colaborar no aumento da acurácia na predição dos valores genéticos, aumento da intensidade de seleção e pela redução do intervalo de gerações. Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- Os polimorfismos selecionados nos genes *ACACA*, *CAST*, *CAPN*, *CTSB*, *DGATI*, *EDG1*, *GHRL*, *MC1R* e *UCP2* podem influenciar positivamente os pesos, rendimento e medidas biométricas de carcaça, rendimento dos cortes do carré, costela e lombo, além das proporções de músculo e gordura na paleta e no pernil de cordeiros.
- Os genótipos dos polimorfismos nos genes *ACACA*, *DGATI*, *FASN* e *GHR* relacionaram-se a redução de ácidos graxos saturados e aumento de mono e poliinsaturados, incluindo o ácido linoleico conjugado (CLA). Portanto, podem colaborar na manipulação de um perfil de ácidos graxos mais saudável na carne ovina.
- Os polimorfismos dos genes *ATP1A1*, *GHR*, *GDF8* e *LEP* podem exercer efeitos positivos sobre o peso ao nascer, no ganho pré-desmama, no peso à desmama e de abate de ovinos.

Por fim, deve-se destacar que dados obtidos podem oferecer à comunidade científica um ponto de partida para estudar algumas redes genéticas complexas de características economicamente importantes. Além disso, as informações geradas por estes marcadores moleculares podem ser empregadas em programas de melhoramento para auxiliar os produtores no direcionamento da seleção, a fim de colaborar com a melhoria da qualidade do produto final, o que poderá ser útil para ovinocultura. Contudo, para aplicação desses conhecimentos é importante que outros estudos de validações imparciais e independentes sejam realizados, para estabelecer se os efeitos uma vez observados são encontrados em outras raças/populações de ovinos.

## APÊNDICES

**Tabela 1.** Nome, localização cromossômica, sequência dos *primers* da PCR multiplex e as sequências dos *primers* de base única (SBE), orientação, tamanho e concentração utilizados no *mix* 1 para os ensaios *SNaPshot*®.

Nome do Primer	Sequência do Primer PCR Multiplex	Referência	Localização Cromossômica	Sequência SBE (5–3)	Orientação	Tamanho	[Conc.] mM
<i>HSPB8_1</i>	f: CTGGTTCATCACCTCCGAAT r: CAAGGTCACACAGCAAGGTG	Verma et al., 2016	17:55726907	ttcTACAAAACCCGCCTCCAGC	forward	22	1,5
<i>CAPN_1</i>	f: CTCTCAGGATGTCCTACG r: CTGGGAAGTTGCGGCAG	Zhou et al., 2007	14:45925000	GAACAACATCAAAAAGTGGCAGGTGTGTT C	forward	30	0,1
<i>DGAT1_1</i>	f: GCATGTTCCGCCCTCTGG r: GGAGTCCAACACCCCTGA	Xu et al., 2009	9:13575253	GTCCTGATGTACGTCCACGACTACTACGT GCTCAAC	forward	36	1,5
<i>CAPN_2</i>	f: AACATTCTCAACAAAGTGGTG r: ACATCCATTACAGCCACCAT	Nassari et al., 2007	14:45923393	TTCTCAACAAAGTGGTGACCCGACGTGAG TGACCGGGGT	forward	39	0,8
<i>ACACA_1</i>	f:TGCCTATTGAAGTGAAGCAG r: ATCTTCTGATGCCTGCGTTG	Garcia-Fernandez et al., 2010	11:13192321	tctctctctctctctctctcGGCAATGCTATCTCTCTG TT	forward	42	2
<i>EDG1_1</i>	f: CTAAAGAAGCCACTCAGCCTCA r: GTGGAATTCTCAAGACCACAGC	Shin & Chung., 2012	1: 77747313	ACCTCATCTCCCGCAGTCTTTGTCTATAGG ATTTTCCAAAATAAG	reverse	45	2
<i>FASN_1</i>	f: CCCCTTTCACAGAGTGCAGC r: GGGCACAGCATGAGGTTTAG	Zhang et al., 2008	11: 49955168	tctctctctctctctctctctcCTGTTCTGGTGCAC CCCAT	forward	48	0,4
<i>IGF_1</i>	f: CACACACCTTGTTGCACTCC r: AGAGCATCCACCAACTCAGC	Pariset et al., 2006	3: 171323132	tctctctctctctctctcAGAGCATCCACCAACTCA GCCCCGCAGAGGGTCTC	forward	55	0,5
<i>CAST_1</i>	f: CAGGCCAGATTTTAACCATTTT r: GTCATCCAGAGCAGTGTCCA	Barendse, 2002	5:93444503	tctctctctctctctctctctctcGCTGAAGAACTT TTGGTGTTTG	forward	54	2
<i>EDG1_2</i>	f: CTAAAGAAGCCACTCAGCCTCA r: GTGGAATTCTCAAGACCACAGC	Shin et al., 2012	1: 77747247	ttctctctctctctctctctctctcTGGAAAAGGG TTAAGTCTCTTT	forward	57	2
<i>CAST_2</i>	f: CATTGGAAAACGATGCCTCAC r: CTGGTCTGTCCAGGGTCTCT	Barendse, 2002	5:93484318	ttctctctctctctctctctctctcCGTCTCCTC TTGAGCTGCTAATCA	forward	63	0,5
<i>CAPN_3</i>	f: AACATTCTCAACAAAGTGGTG r: ACATCCATTACAGCCACCAT	Nassari et al., 2007	14: 45923246	tctctctctctctctctctctctcGAGGGTGT GATGAAGGAGGATGGGAA	reverse	66	0,8
<i>CAST_3</i>	f: CATTGGAAAACGATGCCTCAC r: CTGGTCTGTCCAGGGTCTCT	Barendse, 2002	5:93484287	tctctctctctctctctctctctcTTAGCA GCTCAAGAGGAGACGTGCACAA	reverse	72	0,5
<i>CTSB_1</i>	f: CTTCTGTCTGGCTCTGAG r:AGGAAGTCCGAGTACACAGAG	Pariset et al., 2006	2: 104433240	tctctctctctctctctctctctcGTC TCGGAAGGAAGAGACCAAAACCCCTC	reverse	78	2
<i>SCD1_1</i>	f: AAATCCCTTCGGCCAATGAC r: CTGTCTGCATCTACACCTGGATAG	García-Fernández et al., 2009	22: 20409026	ttctctctctctctctctctctctcTG GATGCTGCAGACACACCGGGTTGGCC	reverse	81	1

<sup>1</sup> Cromossomo: Posição

**Tabela 2.** Nome, localização cromossômica, sequência dos *primers* da PCR multiplex e as sequências dos *primers* de base única (SBE), orientação, tamanho e concentração utilizados no *mix 2* para os ensaios *SNaPshot*®.

Nome do Primer	Sequência do Primer PCR Multiplex	Referência	Localização Cromossômica <sup>1</sup>	Sequência SBE (5–3)	Orientação	Tamanho	[Conc.] µM
<i>GDF8_1</i>	f: CCCTCCCTTACTGTCATCC r: ATCAAGCCCAAATCTCTCC	Pariset et al., 2006	2: 118145056	ttctctctcGAAATGCTTGCATAGCAT	forward	27	2
<i>MC1R_1</i>	f: CAAGAACC GCAACCTGCACT r: GGCCAGGAAGAGGTTGAAG	Pariset et al., 2006	14: 14231948	ttctctctctcCAGCAGCTGGACAATGTCATT	forward	34	0,2
<i>HSP90AB1_1</i>	f: GCTGCTGCGCTATCACACG r: GCCCTCCTGGTCACAGA	Sailo et al., 2015	20: 17832411	TCCATCTATTACATCACTGGTACGTTGGA ACCTAGGT	forward	37	0,2
<i>ADRB3_1</i>	f: CTAGCTCAGTTCTTTCTCTGC r: CCCAACTCCCAACCCGATC	Wu et al., 2013	26:31849799	ttctctctctctcGCGAATTCTTACTCAGTAGG AAG	reverse	40	2
<i>GHR_1</i>	f: TATGCC CAGGTAAGCGACAT r: ATTGAGTACGAGGCCCTGTG	Pariset et al., 2006	16:31833100	ttctctctctctcGGACAGGTATCTCAGAAC TTGGAACAT	reverse	46	0,2
<i>UCP2_1</i>	f: GCTGGC ATCGGGAGTCGC r: TGTGAGACCAGGGAGTAGGG	Sherman et al., 2008	15: 51597272	tctctctctctcCGCTTGAACCCGGACCT TCACCACATC	forward	49	0,2
<i>FABP3_1</i>	f: GGTTTTGCTACCAGGCAGGT r: TTCCTATTCCCCTTCAGGG	Calvo et al., 2004	2:235142245	ttctctctctctcACTCGGTGTCGGT TTTGCTACC	forward	51	2
<i>GHRL_1</i>	f: CCTGCTCTGGATGGACTTGGC r: GGCTTGGGGCATTTAGGACG-3'	Mahmoud et al., 2009	19: 54213076	ttctctctctctcGAGAAGCAGGGTGAG GTGTGGACTCAC	forward	52	0,3
<i>GH_1</i>	f: CTGCCAGCAGGACTTGGAGC r: GGAAGGGACCCAACAATGCCA	Marques et al., 2006	11: 47540734	ttctctctctctcGGTGCCAAACACC AGGCTGTTGGTGAAGA	forward	58	0,4
<i>MC1R_2</i>	f: CAAGAACC GCAACCTGCACT r: GGCCAGGAAGAGGTTGAAG	Pariset et al., 2006	14: 14232016	tctctctctctcTGGTACCGCAG GGCGTAGAAGATGGAGAT	reverse	61	0,6
<i>MEG_1</i>	f: TCCGAGCTCCAATAATCTTC r: TCCTTGACACGTAAGCATGG	Pariset et al., 2006	18: 64444141	ttctctctctctcTTTCTGTCTTC AAAGCTTCCGGCCAAACC	forward	64	1
<i>LOX_1</i>	f: GCTTGAGTCCTGGCTGCTATG r: TTTACAGCGGACGACATTG	Sevane et al., 2011	5: 29244248	ttctctctctctcCAGTGG GCTTACTCTCTGGAGTCAAA	forward	69	1,8
<i>ATPIAI_1</i>	f: ACAAACA AAAAGGGTCACAACA r: CTTACCCTAGATCCTGGCTCA	Liu et al., 2010	1: 92879576	tctctctctctcCTATCT CCCTGGCTTATGAGCAAGCTGAGAG	forward	73	1,8
<i>LEP_1</i>	f: CCCTCTCCTGAGTTTGTG r: GCCTATGTGGGGCATCCTTTA	Pariset et al., 2006	4: 92519830	ttctctctctctcTTTCTT CTGTTTTAGGCCCCAGAAGCCACCC	forward	76	1,8
<i>GHR_2</i>	f: TATGCC CAGGTAAGCGACAT r: ATTGAGTACGAGGCCCTGTG	Pariset et al., 2006	16:31833147	tctctctctctcTTAC CACTACAGCCGGGAGGTCAGGGACAGCA GAA	forward	81	1,2

<sup>1</sup>Cromossomo: Posição