

Universidade Federal do Piauí

**Triagem e validação de SNPs para uso em seleção assistida por
marcadores moleculares em ovinos Santa Inês**

Manoel Braz da Silva Júnior

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2018

Manoel Braz da Silva Júnior
Licenciado em Ciências Biológicas

**Triagem e validação de SNPs para uso em seleção assistida por
marcadores moleculares em ovinos Santa Inês**

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Barros Britto

Coorientador:

Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S586t Silva Júnior, Manoel Braz da
Triagem e validação SNPs para uso em seleção assistida por marcadores moleculares em ovinos Santa Inês / Manoel Braz da Silva Júnior – 2018.
64 f. : il.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina, 2018.
Orientação: Prof. Dr.Fábio Barros Britto

1. Gado ovino 2. LCORL 3. Tamanho corporal 4. Carcaça
5. PCR-RFLP I.Título.

CDD 636.3

**Triagem e validação SNPs Para uso em seleção assistida por marcadores
moleculares em ovinos Santa Inês**

Manoel Braz da Silva Júnior

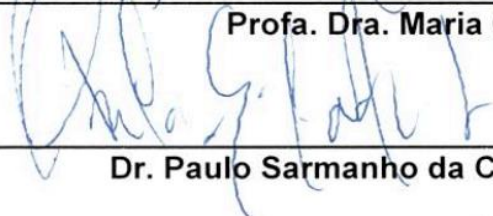
Licenciado em Ciências Biológicas

Aprovado em 25/06/2018

Comissão Julgadora:



Profa. Dra. Maria Claudene Barros- UEMA



Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima- Embrapa Meio Norte



**Prof. Dr. Fábio Barros Britto - CCN/UFPI
(Orientador)**

À minha mãe, Petrolina, a meu pai, Manoel, e a
meu avô Dino (*in memoriam*) por tanto amor,
carinho e confiança
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Genética e Melhoramento.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, *Campus São João dos Patos*, pela concessão do afastamento que permitiu que eu cursasse esse programa de pós-graduação.

Ao meu orientador, Dr. Fábio Barros Britto, pela disponibilidade, atenção, paciência na orientação, dedicação, profissionalismo e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao meu coorientador, Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento, pelo apoio, incentivo e esclarecimentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todo corpo docente do programa de pós-graduação por todo ensinamento transmitido. Em especial a professora Dra. Ângela Celis e ao professor Dr. Paulo Sarmanho pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas sempre que solicitados.

Ao Cesar Viana da secretaria do programa de pós-graduação por ser sempre tão atencioso e disponível.

Aos amigos de turma do Mestrado em Genética e Melhoramento e “agregada” Marilha Vieira. Em especial gostaria de agradecer ao Gérson Nascimento por ter me ajudado em um momento que eu precisei de verdade e também pelo incentivo nos estudos, e a Pâmela Ponce, minha companheira de longas horas de estudos na biblioteca da UFPI, paciente instrutora de técnicas de biologia molecular que me foram tão valiosas no desenvolvimento deste trabalho, e também amiga de momentos mais prazerosos e descontraídos, onde, ainda sim, o assunto do mestrado era recorrente. Por terem contribuído para que a superação dos obstáculos tenha sido menos difícil.

Ao colega Leonardo Furtado por ter se disponibilizado a ajudar em uma parte de fundamental importância para essa dissertação junto ao laboratório de biologia molecular da Embrapa Meio-Norte.

Ao Luciano Sena, pelas incontáveis vezes em que os procurei com dúvidas sobre os ovinos, nas quais ele sempre foi prontamente solícito em me ajudar.

A Milena Rodrigues pelas valiosas ajudas nos procedimentos de laboratório.

Ao João Paulo por se dispor a passar um dia inteiro me ajudando aprender a fazer extração de DNA.

A senhora Carlese Camapum, gestora geral do Centro de Ensino Ribamar Torres onde trabalho, por ter sido tão sensível e compreensiva com a minha situação

e por ter buscado meios para que eu mantivesse meu trabalho e também pudesse concluir esta pesquisa.

Ao meu amigo Amaury Rezende pela gentileza de produzir o abstract desse trabalho.

Aos meus pais, que sempre tinham uma palavra de conforto quando o desespero batia e eu achava que nada ia dar certo. Que sempre foram o porto seguro onde eu podia encontrar paz e tranquilidade.

Por último, mas não menos importante, a André Felipe, “meu” PIBIC, por todas as vezes que esteve disponível, não só no laboratório, mas também em suporte de informática e logística. Pelas diversas vezes que, sem reclamar, ficou até altas horas da noite fazendo procedimentos de eletroforese. Pela responsabilidade e compromisso todas as vezes em que precisei delegar uma tarefa. Enfim, por toda ajuda, sem a qual não sei se seria capaz de executar esse trabalho em tempo hábil.

Muito obrigado!

“The key is man’s power of accumulative selection: nature gives successive variations; man adds them up in certain directions useful to him”.- Darwin, p. 35, 6^a ed. *The Origin of Species*. 1920.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Ovinocultura no Brasil e no Mundo	14
2.2 Melhoramento Genético e a Raça Santa Inês	16
2.3 Marcadores SNPs e PCR-RFLP	19
2.4 Cromossomo 11 e Cromossomo 6 de <i>Ovis aries</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Amostragem, coleta de dados fenotípicos e obtenção do DNA	25
3.2 Teste de normalidade e avaliação inicial dos dados fenotípicos.....	26
3.3 Genes avaliados e prospecção de SNPs	26
3.4 Amplificação e genotipagem dos <i>loci</i> polimórficos via PCR-RFLP	27
3.5 Análise estatística	28
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO.....	50
Manuscrito a ser submetido à revista PeerJ (Polimorfismo no gene <i>LCORL</i> associado a medidas corporais e de carcaça em ovinos Santa Inês).....	50

RESUMO

SILVA JÚNIOR, M. B. **Triagem e validação de SNPs para uso em seleção assistida por marcadores moleculares em ovinos Santa Inês**. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

No Brasil, a demanda por carne ovina é superior à sua produção, levando à necessidade de importação desse produto. A ausência de programas de melhoramento definidos justifica o déficit na produção e indica a necessidade de esforços em pesquisas que busquem o aumento da produtividade. Objetivou-se com este trabalho identificar polimorfismos do tipo SNP em sequências de genes candidatos para características de medidas corporais e de desenvolvimento de carcaça em ovinos. Foram coletadas informações de área, comprimento e profundidade de olho de lombo, altura da garupa, comprimento corporal, circunferência torácica, altura da cernelha, altura da pata, profundidade torácica e comprimento da garupa em 293 animais de ambos os sexos. Onze genes candidatos foram selecionados na literatura (*RPL26*, *SLC2A4*, *DVL2*, *CHRNA1*, *TP53*, *POLR2A*, *CTC1*, *PIK3R5*, *MYH10*, *NCAPG* e *LCORL*), para a triagem de SNPs, visando sua genotipagem com técnicas de PCR-RFLP. Os polimorfismos presentes foram associados aos fenótipos dos animais amostrados por meio de análises de regressão. Dos genes avaliados, apenas o *LCORL* mostrou polimorfismo com sítio de restrição para a enzima *BstI*, a qual pôde ser utilizada para genotipar as variáveis Adenina e Guanina, na posição 149.731. Os resultados mostraram que esse SNP é uma mutação não sinônima que causa a substituição do aminoácido Serina, na posição 417, por uma Glicina no peptídeo codificado. As análises estatísticas apontaram que as variáveis genóticas estão significativamente associadas a medidas de tamanho corporal e de qualidade de carcaça em ovinos da raça Santa Inês. As medias de área, comprimento e profundidade de olho de lombo, altura da garupa, comprimento corporal e circunferência torácica apresentaram diferenças significativas para os diferentes genótipos. O genótipo com menor frequência nos rebanhos estudados ($f_{GG} = 0,018$) apresentou maiores valores médias para todas essas características.

Palavras-chave: *LCORL*, tamanho corporal, carcaça, PCR-RFLP

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, M. B. **Screening and validation of SNPs in use of assisted selection by molecular markers in Santa Inês sheep.** 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2018.

In Brazil, the demand for sheep meat is higher than its production, leading to the need of importing this product. The absence of specific improvement programmes justifies the production deficit and indicates the necessity of efforts in research that look into increasing productivity. This work is aimed at identifying polymorphisms of the SNP type in gene sequences candidates for features of body measurements and carcass development in sheep. Information on area, length and depth of loin eye, croup height, body length, thoracic circumference, height of the withers, paw height, chest depth and croup length were collected in 276 animals from both sexes. Eleven candidate genes were selected for the work (RPL26, SLC2A4, DVL2, CHRN1, TP53, POLR2A, CTC1, PIK3R5, MYH10, NCAPG and LCORL) for the screening of SNPs for genotyping with PCR-RFLP techniques. The present polymorphisms were associated to the phenotypes of the animals sampled by means of regression analysis. Out of the genes evaluated, only LCORL showed restriction polymorphism for the *Bsr*I enzyme, which could be used to genotype the Adenine and Guanine variables at position 149731. The results showed that this SNP is a non-synonymous mutation that causes the substitution of the amino acid Serine at position 417 by a Glycine in the encoded peptide. Statistical analysis indicated that the genotypic variables are significantly associated to the measures of body size and carcass quality in Santa Inês sheep. The measures of the area, length and depth of loin eye, croup height, body length and thoracic circumference presented meaningful differences for the different genotypes. The genotype with lower frequency in the studied flocks ($f_{(GG)} = 0.018$) showed higher mean values for all these characteristics.

Key words: *LCORL*, body size, carcass, PCR-RFLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Amostras de DNA extraídas a partir de sangue	30
Figura 2	- Posições do nucleotídeo (A-149.731) e aminoácido (Ser-417) mutados na sequência do gene <i>LCORL</i> e do polipeptídeo codificado em <i>Ovis aries</i>	32
Figura 3	- Digestão do <i>amplicom</i> de 445 pb do gene <i>LCORL</i> de ovinos Santa Inês com a enzima <i>BsrI</i>	34
Figura 4	- Efeito significativo da substituição alélica no SNP149.731_A>G do gene <i>LCORL</i> estimado por regressão linear em características de qualidade de carcaça e tamanho corporal de ovinos Santa Inês	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Genes candidatos associados a características de tamanho corporal e qualidade de carcaça em ovinos	27
Tabela 2	- Identificação da posição dos genes e SNPs selecionados no genoma de <i>Ovis aries</i> , evidenciando sua sequência e respectivas enzimas/sítios de restrição	31
Tabela 3	- Características dos <i>primers</i> para amplificação dos sítios polimórficos dos genes <i>LCORL</i> e <i>NCAPG</i> e tamanho dos produtos amplificados.....	33
Tabela 4	- Frequência observadas e esperadas para os genótipos do SNP149.731A>G no gene <i>LCORL</i> em ovinos	35
Tabela 5	- Médias das medidas corporais e de carcaça e efeito de substituição alélica (β) calculados para os ovinos Santa Inês amostrados seis propriedades localizadas nos estados do Piauí e Maranhão	35

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos estão entre os primeiros animais a serem domesticados pelo homem com a finalidade de geração de produtos alimentícios. Esses pequenos ruminantes, hoje criados por todo o mundo, provavelmente foram domesticados na Ásia e de lá se difundiram para outros continentes (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000).

O rebanho mundial de ovinos atualmente é de cerca de 1,2 bilhão de cabeças (FAO, 2016). A Austrália e Nova Zelândia ocupam posições de destaque no mercado mundial de carne e lã, em virtude de suas cadeias produtivas altamente tecnificadas e eficientes (VIANA, 2008). No Brasil, onde o rebanho é de aproximadamente 18,4 milhões de cabeças, as regiões mais produtoras são Sul e Nordeste, esta última representando mais de metade do total nacional. O Piauí é o sexto maior produtor de ovinos, com um rebanho da ordem de 1,2 milhão de cabeças (IBGE, 2017). Nesse cenário, a demanda do mercado interno brasileiro ainda é bem maior que a oferta do produto, havendo necessidade de importação, principalmente oriunda Uruguai (VIANA; MORAES; DORNELES, 2015).

Entre as raças de ovinos presentes na pecuária nacional, destaca-se a Santa Inês, desenvolvida na Bahia por meio do cruzamento de raças de lã, deslanadas e animais sem raça definida, dando origem a um ovino deslanado com grande capacidade adaptativa às condições climáticas da região Nordeste (PAIVA et al., 2005). Santa Inês tem sido buscada por produtores de todo o país para aumentar seus plantéis. Isso se deve a algumas características que a mesma possui como rusticidade, grande porte e excelente habilidade materna. Porém, a raça tem passado por um processo de melhoramento cujo foco principal é a estética dos animais, deixando de lado características produtivas e de interesse econômico (CARNEIRO et al., 2006).

Em decorrência do descompasso entre a oferta e demanda da carne ovina, mesmo com o país possuindo um rebanho de destaque mundial, se tornam importantes os esforços para o melhoramento desses animais, com o objetivo de aumentar sua produtividade. A carne ovina, em especial a de cordeiro, que é a de maior aceitabilidade no mercado brasileiro (GARCIA et al., 2016), apresenta perfil bioquímico de elevado padrão de qualidade, com baixos teores de colesterol e ácidos graxos saturados e elevados níveis de gorduras poli-insaturadas (GOIS et al., 2016).

Dentre as diferentes opções para se trabalhar o melhoramento, a busca por informações genéticas associadas a características fenotípicas mostra-se como uma opção viável, promovendo o método conhecido como seleção assistida por marcadores moleculares (SAM). Essa técnica pode fornecer informações precoces sobre os animais, pois estes podem ser selecionados logo após o nascimento. Além da precocidade da informação, a SAM traz a vantagem não ser influenciada por fatores ambientais (BORÉM; CAIXETA, 2016). Em animais com genoma sequenciado, como é o caso do *Ovis aries*, a SAM pode ser aplicada de forma ainda mais efetiva e por meio de diferentes abordagens, como, por exemplo, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*).

É possível, portanto, identificar polimorfismos dentro da sequência de um gene reportado como significativamente associado a uma característica de interesse, tais como tamanho do animal e qualidade da carcaça. No caso dos SNPs, os polimorfismos podem estar em uma região reguladora do gene ou podem estar dentro uma sequência codificante. Nesse caso pode haver a substituição de aminoácidos na cadeia proteica e, conseqüentemente, mudança na estrutura espacial desta (INIESTA; GUINÓ; MORENO et al., 2005). Essa substituição alélica pode estar relacionada ao nível de desenvolvimento de caracteres de interesse no animal (SILVA, 2015).

A viabilidade da SAM é ainda mais pronunciada quando técnicas simples de detecção dos alelos são utilizadas para genotipar os animais. Como exemplo, a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), onde os genes são amplificados por PCR e os fragmentos gerados são tratados com enzimas de restrição para identificação do polimorfismo, pode ser empregada de modo rápido e com baixo custo para executar a genotipagem de grande número de animais.

Este trabalho teve como objetivos (I) realizar um levantamento de genes previamente relacionados com características de tamanho corporal e qualidade de carcaça em ovinos; (II) identificar polimorfismos do tipo SNP nas sequências desses genes; (III) fenotipar animais quanto a características de desenvolvimento de carcaça e tamanho corporal; (IV) genotipar os mesmos animais quanto aos SNPs selecionados por meio da técnica de PCR-RFLP; (V) buscar associação entre as características obtidas nas análises fenotípicas e os genótipos identificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura no Brasil e no Mundo

Os ovinos domesticados (*Ovis aries* L.) são pequenos ruminantes da família Bovidae, subfamília Caprinae. Sua domesticação ocorreu na Ásia, na região do Crescente Fértil, atual Irã, cerca 10 mil anos atrás (ZEDER, 2008). De lá foram levados para a África e sul da Europa já domesticados (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000).

Esses animais foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem, tendo sua criação destinada a fornecer alimentos, como carne e leite, e lã para produção de vestimentas. Quase todas as raças são descendentes do muflão selvagem asiático (*Ovis orientalis* Gmelin, 1774) (MCMANUS; PAIVA; ARAÚJO (2010).

Em relação aos primeiros ovinos que chegaram ao Brasil quando da colonização europeia, não há registros de sua entrada vindos diretamente da Europa, mas sabe-se que esses animais foram introduzidos no país pelo Paraguai e Argentina na segunda metade do século XVI e que eram de raças de origem europeia e africana (MCMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; MARQUES et al., 2015).

Atualmente os ovinos são criados pelo mundo inteiro. De acordo com a FAO (2016) o rebanho mundial de ovinos era de mais de 1,2 bilhões de cabeças em 2014, apresentando um crescimento anual da ordem de 1,5% nos cinco anos antecessores, enquanto o acréscimo na produção de carne não acompanhou o mesmo ritmo, ficando em 0,6% no mesmo período. Nesse cenário, o Brasil detinha o 18º maior rebanho do mundo. Segundo Viana (2008), os maiores produtores de ovinos são países da África, Ásia e Oceania. China detém o maior rebanho, seguida por Austrália, Índia, Irã, Sudão e Nova Zelândia. Ainda de acordo com o mesmo autor, Austrália e Nova Zelândia dominam os mercados mundiais de carne e lã, em virtude de seus sistemas de criação de alta produtividade.

O Brasil possuía um rebanho de mais de 18,4 milhões de cabeças de ovinos em 2016 de acordo com a Pesquisa da Produção da Pecuária Municipal, sendo a região Nordeste responsável por 63,0% do efetivo nacional e o estado do Piauí, com cerca de 1,2 milhões de cabeças, é o sexto maior rebanho do país (IBGE, 2017). No Piauí, esse número indica um discreto aumento após sucessivas quedas registradas desde 2011.

O Brasil possui registradas na Associação de Criadores de Ovinos (ARCO), credenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 27 raças de ovinos, tanto produtoras de lã quanto deslanadas (MCMANUS et al. (2013a). As raças mais populares são Dorper e Santa Inês (MCMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010) e os maiores rebanhos estão na Bahia e Rio Grande do Sul (IBGE, 2017).

A carne ovina, que já foi considerada um subproduto de consumo principalmente rural, passou a ter posição importante no mercado de carne (PEREIRA NETO, 2004). Martins et al. (2016) afirmam que o mercado interno brasileiro é altamente consumidor de carne ovina, tendo em vista o volume de importação do produto, ainda que o consumo anual per capita de cerca de 700 gramas estar bem abaixo do de outras carnes (39 kg de carne bovina e 13 kg de carne suína) (ANUALPEC, 2011). O mercado doméstico brasileiro para carne ovina apresenta forte sazonalidade devido a questões de cunho cultural e religioso, elevando o consumo desse produto nos meses finais do ano, por causa das festas e o clima de confraternização, havendo assim um excesso de demanda interna, o que leva a necessidade de importação de carne, vinda principalmente do Uruguai (VIANA; MORAES; DORNELES, 2015).

A carne ovina, em especial a de animais produzidos em pasto, apresenta uma elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados, superior aos valores mínimos recomendados, sendo benéfica para a saúde humana (GOIS, et al., 2016). A carne de cordeiros da raça Santa Inês foi avaliada quanto a sua qualidade em animais alimentados com diferentes dietas, o resultado mostrou que aqueles animais alimentados com capim apresentam baixas concentrações de colesterol e ácidos graxos saturados e um alto teor de ácidos graxos monoinsaturados (MADRUGA et al., 2005).

Em virtude da existência do crescente mercado consumidor e da demanda significativamente superior à oferta de carne ovina no mercado brasileiro, se fazem necessários esforços que atuem para maximizar sua produção e, dentre esses, podemos citar os trabalhos de melhoramento genético com seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), visando o melhoramento de carcaça do animal, o que está diretamente associado a maior produção de carne. A associação positiva entre um marcador e uma característica de interesse indica a região no genoma que é responsável pela variação dessa característica, o que já é suficiente para utilização

desse marcador na SAM (SIDER; ZAROS, 2008). As características de carcaça, que estão associados a maior produtividade de carne, apresentam valores de herdabilidade entre moderados e baixos. Roden et al. (2003) analisaram a herdabilidade da profundidade e largura do músculo *longissimus dorsi* em ovinos Scottish Blackface e obtiveram valores de 0,27 e 0,08, respectivamente. Isso justifica a utilização da SAM que permite a seleção do genótipo precoce logo após o nascimento (BENEVIDES et al., 2002).

A SAM também é reconhecidamente importante para a seleção daqueles caracteres em que a avaliação fenotípica apresenta elevado custo, ou exige ambientes específicos, ou quando as avaliações são subjetivas, ou ainda, quando o caráter de interesse só se manifesta em fases avançadas do desenvolvimento, nesses casos a SAM pode ser realizada nos estágios iniciais, reduzindo significativamente o tempo necessário para um ciclo de seleção (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Características com valores de herdabilidade elevados e de fácil avaliação podem ser selecionadas por meio de seleção fenotípica (BORED et al., 1999).

2.2 Melhoramento Genético e a Raça Santa Inês

Hazel (1943) afirmou que a seleção artificial é um procedimento complicado e incerto, flutuante e as vezes errôneo levando a obtenção ganhos menores do que poderiam ser alcançados, em virtude da ampla variância genética de caracteres que se busca melhorar e devido ao efeito múltiplo da maioria, senão de todos, os genes.

O sucesso do melhoramento genético animal depende, essencialmente, da adoção de precisos métodos de seleção, os quais demandam a predição dos valores genéticos dos animais candidatos à seleção (RESENDE; PEREZ, 1997).

Modelos estatísticos, como o BLUP (melhor predição linear não viesada), desenvolvido por HENDERSON em 1949, por exemplo, realizam a predição de valores genéticos e também determina os efeitos ambientais sobre as observações feitas em um animal (HENDERSON, 1984).

A partir da década de 90, com os avanços em estatística computacional, que permitem estimar melhor a herdabilidade de características de interesse no melhoramento genético animal, aliados ao desenvolvimento na área de biologia molecular, a avaliação genética de características melhorou bastante (KADARMIDEEN; ROHR; JANSS, 2006).

No entanto, o processo de seleção dos melhores animais ou mais produtivos, continua sendo uma tarefa difícil, principalmente quando baseada apenas na observação de seu fenótipo em um dado momento. Os traços de interesse econômico, como por exemplo, a produção de carne, tem bases genéticas, mas também são fortemente influenciadas por condições ambientais, sendo apenas as características genéticas transmitidas e, além do mais, nem todo o potencial genético é capaz de ser transmitidos as gerações seguintes (LÔBO; VILELLA; FACÓ, 2005).

Assim o melhoramento assistido por marcadores traz algumas vantagens sobre dados fenotípicos, podendo comparar genótipos mesmo que sejam amostrados em ambientes ou estágio de desenvolvimento diferentes (BORÉM; CAIXETA, 2016). Os marcadores moleculares permitiram acessar polimorfismos no DNA. Têm sido utilizados em análises genéticas em várias situações, como por exemplo, na caracterização de raças, identificação de clones, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e construção de mapas genéticos. Os marcadores podem diferir em características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectável e informação genética, especificidade dos *loci* e reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, é possível a utilização direta das informações de DNA na seleção, de forma a permitir alta eficiência seletiva e grande rapidez na obtenção de ganhos genéticos (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Como a carne é um dos produtos maior importância na ovinocultura, os programas de melhoramento genético desses animais, inclusive em países onde essa atividade é altamente produtiva e tecnificada, como a Nova Zelândia, se baseiam em informações de caracteres relacionados ao crescimento e produção de carne (SANTOS et al. 2015).

Na região Nordeste do Brasil, que abriga o maior rebanho de ovinos do país, os animais deslanadas tem papel de destaque, em especial a raça Santa Inês. São animais de grande porte, podendo os machos atingirem até 120 kg; a pele e a carne são de excelente qualidade, esta apresentando um baixo teor de gordura; são precoces e rústicos, se adaptando a qualquer sistema de criação; as fêmeas são prolíferas e com boa qualidade materna; e são considerados resistentes a parasitas gastrointestinais (SOUSA; LÔBO, MORAIS, 2003).

Santa Inês é uma raça de ovinos deslanados oriunda da Bahia, sendo a maior entre as raças deslanadas (PAIVA, 2005). Foi originada do cruzamento entre raças produtoras de lã e deslanadas (PAIVA et al., 2005). Segundo Morais (2001), a raça

Santa Inês teve origem do cruzamento das raças Bergamácia, Morada Nova e Crioula. Porém Paiva (2005), defende a teoria que esses animais seriam resultantes de cruzamentos intercorrentes entre as raças Bergamácia, Morada Nova, Somálias e ovinos sem raça definida (SRD) após períodos de seleção natural e seleção genealógica realizada por criadores e técnicos. Ovinos Santa Inês são encontrados em todas as regiões do Brasil, principalmente na região Nordeste, pois apresentam grande adaptabilidade às condições da região devido a tolerância aos ambientes de temperaturas elevadas e também por apresentarem elevada rusticidade e menor exigência nutricional (SOUSA; BENICIO; BENICIO, 2015). Ainda segundo os mesmos autores, a crescente demanda por carne ovina no país tem elevado o interesse por essa raça.

Mesmo apresentando todas essas características vantajosas a criação e manejo, o primeiro trabalho efetivo de melhoramento da raça Santa Inês teve início em 1990 e foi coordenado pela Embrapa Caprinos (Ceará), projeto intitulado “Seleção de ovinos deslanados para o melhoramento genético dos rebanhos experimentais e privados no Nordeste do Brasil” (LÔBO; VILELLA; FACÓ, 2005).

No entanto, a raça Santa Inês ainda não possui efetivos programas voltados para o melhoramento de caracteres de produtividade de reprodução que sejam capazes de fazer dessa raça tão competitiva quanto raças de ovinos exóticos que têm sido melhoradas por vários anos (REGO NETO et al., 2018).

Rego Neto et al. (2014) chamam a atenção para a diminuição na quantidade de registros de ovinos Santa Inês junto a ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos), o que sugere uma diminuição no tamanho efetivo de rebanho dessa raça no estado. Isso se caracteriza como uma prática comum na ovinocultura: raças novas surgem e são intensamente criadas, no caso de Santa Inês em função do porte e velocidade de crescimento, porém sem avaliação genética adequada, posteriormente deixam de ser utilizadas e passam a correr risco de extinção, havendo a necessidade de programas de conservação genética (CARNEIRO et al., 2006)

A seleção praticada nos ovinos Santa Inês preocupou-se apenas com a padronização da raça, baseando-se principalmente em caracteres morfológicos, levando bons animais no que diz respeito a aspectos produtivos a serem descartados. Os animais comercializados em feiras, por exemplo, têm seu valor baseado primordialmente em caracteres morfológicos em detrimento das características de

produção (CARNEIRO et al., 2006). Ojeda (1999) já havia identificado em outras raças de ovinos esse mesmo padrão de seleção visual e estética.

2.3 Marcadores SNPs e PCR-RFLP

Os polimorfismos de nucleotídeo único, mais conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são alterações pontuais resultantes da substituição de uma única base em um determinado loco no genoma. Em teoria, a troca poderia ser por qualquer uma das demais bases nitrogenadas, porém os SNPs possuem natureza bialélica, isto é, são encontradas apenas duas variantes em cada espécie. (BORÉM; CAIXETA, 2016). Comumente o SNP é uma mutação do tipo transição, ou seja, uma base púrica é substituída por outra ou uma pirimídica por outra, mas também podem haver, com menor frequência, transversões, quando uma purina é trocada por uma pirimidina e vice-versa. Segundo Shaw (2013), os SNPs são o tipo de variação genética mais comum em humanos e corre em média um a cada 300 pb. Esses marcadores são frequentes por se tratarem de pequenas mutações pontuais, como substituição de uma base ou pequenos eventos de inserção ou deleção (FALEIRO, 2007). Assim devido a essa ampla distribuição pelo genoma, os SNPs são marcadores moleculares com grande potencial em estudos de diversidade genética.

No genoma ovino, com cerca de 2,86 Gb (PEREIRA et al., 2013), os modernos chips de SNPs (Infinium HD SNP BeadChip600K) são capazes genotipar SNPs espaçados em 5kb, aproximadamente.

A identificação de SNPs se dá por meio de sequenciamento, o que pode dificultar ou encarecer o uso desse marcador na pesquisa científica, porém para aqueles animais com genoma sequenciado e disponível em plataformas e bancos de dados, como *Ovis aries*, o trabalho com SNPs se torna menos oneroso.

Em face a sua distribuição por todo o genoma, os SNPs podem estar presentes inclusive em regiões codificantes. A alteração de um único nucleotídeo em uma região codificante pode provocar uma troca de aminoácido da proteína resultante podendo levar a alterações em sua função (INIESTA; GUINÓ; MORENO, 2005).

Em função da possibilidade de alteração de um único nucleotídeo provocar uma mudança na estrutura e função da proteína codificada, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos buscando genotipar populações domesticadas quanto a um SNP em genes que tem sua contribuição comprovada em características de interesse econômico. Curi et al. (2008), estudando o polimorfismo de nucleotídeo único em

bovinos, genotiparam animais *Bos indicus* e *Bos taurus* × *Bos indicus* de cinco raças quanto a um SNP do gene *CAST* localizado no cromossomo 7, buscando identificar associação entre o genótipo do SNP e a característica de maciez da carne. O resultado mostrou que nas raças originadas a partir de *B. taurus* × *B. indicus* a frequência do alelo que favorece a característica analisada é consideravelmente maior que nas demais raças estudadas.

Um SNP na região 5' que flanqueia o gene *IGF-I* (*Oar2*) de ovinos da raça Coloured Polish Merino, mostrou-se significativamente associado a características de qualidade carcaça como a largura do músculo *longissimus dorsi* e o padrão de distribuição de gordura dos animais, bem como à caracteres de avaliação subjetiva como cor e sabor da carne (GROCHOWSKA et al., 2017).

Setoguchi et al. (2011) analisando os efeitos da alteração de um único nucleotídeo no gene *NCAPG* em bovinos adolescentes das raças Japanese Black e German Holstein, identificaram associação entre as curvas de crescimento ósseo e um SNP desse gene em região codificante, que provoca a substituição de um aminoácido isoleucina por uma metionina no polipeptídeo traduzido. Os alelos para esse SNP não apresentaram efeito de dominância, sendo observado apenas efeito aditivo do genótipo que codifica o aminoácido metionina sobre o genótipo codificante de isoleucina. Outro trabalho analisou a relação desse mesmo SNP com características como área e espessura de olho de lombo e marmoreio da carne em bovinos da raça Japanese Black, mostrando que os três genótipos encontrados possuem efeito significativamente diferente na média dessas características (TONG et al., 2016).

Como os SNPs são a substituição de um nucleotídeo por outro, isso afeta sequências que são sítios de corte de enzimas de restrição. Se um SNP se localiza diretamente no sítio de uma enzima, esta pode ser usada para genotipar os organismos quanto a base presente naquele SNP, já que a sequência será clivada quando um nucleotídeo estiver presente, mas não quando for outro ocupando a posição. SNPs próximos em um mesmo cromossomo tendem a se manter juntos, pois a chance de separação por recombinação é baixa (SHAW 2013). Assim, o polimorfismo de comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) pode ser utilizado para identificar padrões de SNPs que são segregados juntos.

A técnica que se caracteriza pela amplificação de uma sequência contendo o polimorfismo pela utilização de *primers* específicos através da reação em cadeia da polimerase, seguida pelo uso de enzimas de restrição para clivagem desses

fragmentos e posterior genotipagem do nucleotídeo na região polimórfica, devido a formação de bandas em comprimentos diferentes em gel de eletroforese, é conhecida como PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) (RASMUSSEN, 2012).

Um estudo com 82 ovelhas da raça Iraqui Awassi, utilizou PCR-RFLP para identificar polimorfismo no gene *BMPr-1B*, buscando associa-lo a fertilidade em ovinos. Os resultados gerados por diferença no tamanho dos fragmentos tratados com a enzima de restrição *Ava II*, mostraram que esse gene não apresenta significativa associação com a fertilidade em ovelhas dessa raça (NADA et al., 2014). Um outro estudo com essa mesma enzima de restrição, por meio de PCR-RFLP, estudando duas raças de ovinos indianos, mostrou que polimorfismo no gene *FecB*, estão fortemente associados fertilidade nesses animais (PRAVEENA; RAMANA; PANKAJ, 2017).

Alguns trabalhos também têm sido desenvolvidos a procura de marcadores que possam ser utilizados na seleção para o melhormente de características de medidas corporais e de carcaça em diferentes espécies de mamíferos de interesse econômico para produção de carne. Polimorfismos do tipo SNP no gene *NCAPG*, identificados através da técnica de PCR-RFLP, mostrou que esse gene está fortemente associado a características de crescimento em bovinos de corte da raça Qinchuan e que esse polimorfismo pode ser utilizado como marcador SAM para o tamanho corporal ótimo nesses animais (LIU et al., 2015a).

Em ovinos, Gorlov et al. (2017) identificou polimorfismo no gene *GH* em animais da raça Salsk através da técnica de PCR-RFLP utilizando a endonuclease *HaeIII* e conseguiu relaciona-lo a características de tamanho corporal. Cordeiros com genótipo heterozigoto parentaram melhores médias de peso de carcaça e ganho diário de peso em idade de abate em comparação aos indivíduos homozigotos.

O gene *LEP* de *Ovis aries* foi estudado em animais da raça Sanjabi e mostrou-se positivamente associado a características do tamanho corporal e da cauda. Um SNP que causa uma mutação não sinônima, responsável pela substituição do aminoácido arginina por glutamina na proteína codificada, foi identificado pela técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos de PCR. As análises das informações fenotípicas e dos genótipos dos animais para o SNP identificado mostraram significativa associação entre o SNP e características de comprimento da cauda, bem como altura e largura corporal do animal (BAKHTIAR et al., 2017).

Devido a possibilidade de genotipar os organismos por meio da análise da eletroforese em géis de agarose, a técnica de PCR-RFLP apresenta resultados rápidos, confiáveis e a um custo relativamente baixo, se comparada a outras formas de genotipagem, como o sequenciamento direto das amostras, por exemplo.

2.4 Cromossomo 11 e Cromossomo 6 de *Ovis aries*

Como mencionado anteriormente, a espécie *Ovis aries* apresenta 27 pares de cromossomos, sendo Oar6 e Oar11 têm sido reportados como fortemente associados a características de tamanho corporal nesses animais. Trabalhos de associação genômica ampla (GWAS), por meio da análise de desequilíbrio de ligação entre SNPs desses cromossomos conseguiram identificar diversos genes que estão significativamente associados ao tamanho desses animais, assim como a características de crescimento e de qualidade de carcaça (AL-MAMUN et al., 2015; BOLORMAA et al., 2016; KOMINAKIS et al., 2017).

O gene *TP53* (*tumor protein p53*) tem sua função associado com a supressão de tumores, interrompendo a sequência do ciclo celular normal e reduzindo o risco do desenvolvimento de câncer. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado que esse gene também influencia no tamanho corporal de mamíferos, tendo sido reportado que o maior número de cópias desse gene no genoma está relacionado a animais maiores em elefantes e baleias (SULAK et al., 2016).

Outro gene apontado como fortemente associado ao tamanho corporal de ovinos é *RPL26* (*ribosomal protein L26*). Através de análise multiômica (transcriptoma, proteoma e metaboloma) foi confirmado que, em ratos, esse gene está relacionado ao peso e ao índice de gordura corporal desses animais (LI et al., 2018).

Também no Oar11 o gene *MYH10* (*myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle*) foi apontado como associado significativamente ao tamanho de ovinos. Em outros animais, esse gene já tem seu papel descrito associando-o a qualidade de carcaça. Em porcos recém-nascidos e em idade de desmame, o gene *MYH10* mostrou um papel relevante no desenvolvimento da musculatura (AYUSO et al., 2016).

POLR2A (*RNA polymerase II subunit A*) é outro gene do cromossomo 11 de ovinos que tem sido associado ao tamanho desses animais. Pesquisas recentes apontaram esse gene como fortemente associado a característica de estrutura corporal em *Bos taurus* (RANDHAWA et al., 2015).

O gene *CHRNA1* no cromossomo 11 (*holinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1*) foi apontado por KOMINAKIS et al. (2017) como associado a característica de tamanho corporal de ovinos. Seu papel está associado ao transporte transmembrana e, em ratos, foi mostrado que alterações em sua estrutura são responsáveis por desordens musculares como perda ou diminuição do controle voluntário desse tecido (BURNISTON et al., 2013).

Ainda em Oar11, *SLC2A4* (*solute carrier family 2 member 4*) é outro gene que foi relacionado como candidato para características de medias corporais em *Ovis aries*. Esse gene também foi associado a característica de desenvolvimento de carcaça em outras espécies de mamíferos. Através de técnicas de GWAS, RNA-seq e associação *network*, *SLC2A4* destacou-se como gene candidato associado ao desenvolvimento do músculo *longissimus dorsi* em suínos (PUIG-OLIVERAS et al., 2016).

Diversos trabalhos de associação genômica ampla (GWAS) têm mostrado que os genes *NCAPG* (*Non-SMC Condensin I Complex Subunit G*) e *LCORL* (*Ligand Dependent Nuclear Receptor Corepressor Like*) estão associados a características de tamanho corporal em diferentes espécies de animais (AL-MAMUN et al., 2015; BOLORMAA et al., 2016; LIU et al., 2015b; MATIKA et al., 2016;)

Segundo informações do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o gene *NCAPG* está relacionado com a condensação e estabilização dos cromossomos durante a mitose e meiose, codificando uma subunidade do complexo da condensina ativada por fosforilação. Em *Ovis aries* esse gene está localizado no cromossomo 6 (Oar6), possuindo uma sequência de 78.186 bp e 22 éxons. Devido a *splicing* alternativo, são traduzidas três variantes (isoformas) do polipeptídeo, possuindo 1.017, 1.021 e 1.030 aminoácidos.

Polimorfismos em regiões próximas ou diretamente na sequência de *NCAPG* têm sido estudadas por se mostraram associadas a características de tamanho em diferentes animais.

Estudos de GWAS por meio de análise de desequilíbrio de ligação, mostraram que um SNP fortemente ligado ao gene *NCAPG*, é significativamente associado a altura em cavalos puro sangue inglês, explicando quase 7% da variação genética para essa característica na raça (BOYKO et al., 2014).

Em bovinos, diversos estudos têm comprovado que SNPs ligados a esse gene ou mutações diretas na sua sequência estão associados a traços de tamanho.

Setoguchi et al. (2009) realizando estudo de desequilíbrio de ligação através de SNPs e microssatélites, mostrou que polimorfismos em regiões vizinhas e na própria sequência do gene *NCAPG* estão fortemente associados a características de tamanho em raças de gado japonês. Um SNP que causa uma mutação não sinônima substituindo Ile-442 por Met-442 em *NCAPG* foi significativamente associado ao peso da carcaça em bovinos Japanese Black. Em raças americanas e europeias de gado de corte também foram encontrados SNPs em desequilíbrio de ligação com os genes *NCAPG-LCORL*, sendo esses SNPs considerados significativamente associados a características de peso de carcaça (LINDHOLM-PERRY et al., 2011).

O gene *LCORL*, aparentemente está relacionado com o processo de espermatogênese, mas os polimorfismos em sua sequência têm mostrado estarem associados com medidas de estruturas ósseas e altura em mamíferos adultos. Esse gene pode apresentar múltiplas variantes em função de *splicing* alternativo. Em ovinos, está localizado em Oar6 e sua sequência com 151.356 bp possui sete éxons, que codificam quatro isoformas do mesmo polipeptídeo, que pode apresentar 1.781, 1.784, 1860 ou 1.862 aminoácidos na cadeia (NCBI).

Staiger et al. (2016), estudando cavalos na raça Tennessee Walking, investigou a associação entre polimorfismos do tipo SNP na região reguladora *upstream* do gene *LCORL* por meio de GWAS, empregando análise de desequilíbrio e ligação, e o efeito de mutações do tipo *indel* na cadeia desse gene utilizando *primers* específicos. Ambos os métodos de investigação mostraram que esses polimorfismos possuem significativa associação com medidas corporais desses animais.

Estudos recentes com bovinos também apontam significativa associação entre polimorfismos na cadeia de *LCORL* e em regiões próximas, em desequilíbrio de ligação, com crescimento e medidas de carcaça. Por meio de PCR-RFLP, duas variantes em regiões de íntrons e quatro na região promotora desse gene foram identificadas, mostrando-se significativamente associadas ao peso dos animais e da carcaça em bovinos Qinchuan em idade de abate (HAN et al., 2017).

O *locus NCAPG-LCORL* tem mostrados efeito pleiotrópico. Estudos tem mostrados que alelos desses genes estão associados a altura, ganho de peso e espessura reduzida da gordura subcutânea em diferentes espécies (HOSHIBA et al., 2013; LINDHOLM-PERRY et al., 2011; SETOGUCHI et al., 2009; WEIKARD et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras coletadas e utilizadas para realização desse trabalho fazem parte de projeto de pesquisa o qual já foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPI: “Análise de polimorfismos de nucleotídeo único para infecção por endoparasitas em ovino da raça Santa Inês”, sob o número 24/13; e “Estudo genômico aplicado ao melhoramento genético de ovinos Santa Inês para características de carcaça”, número 340/17.

3.1 Amostragem, coleta de dados fenotípicos e obtenção do DNA

Animais da raça Santa Inês (n=293), pertencentes a seis criatórios localizados nos estados do Piauí e Maranhão e registrados junto à Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO), foram amostrados para a pesquisa. Estes tiveram características relacionadas ao desenvolvimento de carcaça e tamanho mensuradas, sendo elas: área de olho de lombo (AOL) comprimento de olho de lombo (COL) profundidade de olho de lombo (POL), altura da garupa (AG), comprimento corporal (CC), circunferência torácica (CT), altura da cernelha (AC), altura da pata (AP), profundidade torácica (PT) e comprimento da garupa (CGA), as quais evidenciam de maneira satisfatória as dimensões corporais do animal. As medidas de área, comprimento e profundidade de olho de lombo, que mensuram o músculo *longissimus dorsi*, foram obtidas *in vivo* por ultrassom.

Após a obtenção das medidas, uma amostra de sangue foi obtida de cada animal para realização das análises moleculares. O sangue utilizado para extração de DNA foi coletado da veia jugular após a realização da antissepsia do local (álcool iodado), com auxílio de agulha acoplada diretamente em tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA, sendo os tubos armazenados em caixa térmica com gelo e posteriormente estocados em freezer -20°C, no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí.

Amostras de DNA foram extraídas a partir do sangue usando Kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Hilden, Germany) segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. A qualidade da extração foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5× por 60 minutos a 90V, corado em brometo de etídio e registrado sob luz ultravioleta em fotodocumentador (*L-PIX Loccus Biotecnologia*) (Figura 1) e o DNA quantificado em NanoDrop™ 2000 (*Thermo Scientific*) e estocado em freezer a -20°C.

3.2 Teste de normalidade e avaliação inicial dos dados fenotípicos

Após a obtenção dos dados fenotípicos, as medidas foram plotadas em planilha, onde foi verificada a normalidade dos dados com o auxílio do programa Excel 2013 utilizando-se a função (=distnormp.n). Em seguida, foram avaliadas as estimativas de variância e desvio padrão de cada variável envolvida nos estudos.

3.3 Genes avaliados e prospecção de SNPs

Foi realizado um levantamento prévio em estudos de associação genômica ampla (GWAS) que relacionaram genes com significativa associação com as características de interesse (AL-MAMUN et al., 2015; BOLORMAA et al., 2016; KOMINAKIS et al., 2017), sendo selecionados onze genes candidatos (Tabela 1).

Em seguida, a sequência destes genes foi obtida no NCBI para a localização de SNPs inseridos em suas sequências ou nas regiões flangeadoras aos mesmos. A definição da posição dos SNPs foi realizada com base no repositório de informações de mapa disponível no site da Illumina (<https://support.illumina.com/downloads/ovinesnp50-v1-0.html>).

No caso dos SNPs localizados dentro de regiões de éxons, foi verificada a ocorrência de substituição de aminoácidos no polipeptídeo codificado. Para isto, a sequência completa do RNA mensageiro da proteína foi obtida no NCBI e analisada utilizando-se o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Tabela 1 – Genes candidatos associados a características de tamanho corporal e qualidade de carcaça em ovinos.

Cromossomo	Gene	Tamanho*	Função	Referências
Oar 11	<i>RPL26</i>	5425 pb	Codifica uma proteína ribossômica componente da subunidade 60S.	KOMINAKIS et al., 2017; LI et al., 2018.
	<i>SLC2A4</i>	5637 pb	Codifica uma proteína facilitadora do transporte de glicose regulado pela insulina.	KOMINAKIS et al., 2017; PUIG-OLIVERAS et al., 2016.
	<i>DVL2</i>	7922 pb	É traduzido em uma proteína da família Dsh, importante na determinação do tamanho de embriões e adultos.	KOMINAKIS et al., 2017.
	<i>CHRNA1</i>	9275 pb	Codifica a subunidade beta do receptor da acetilcolina, que promove a abertura de um canal de condução de íons através da membrana plasmática.	BURNISTON et al., 2013; KOMINAKIS et al., 2017
	<i>TP53</i>	12903 pb	Codifica uma proteína supressora de tumores que pode induzir interrupção do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA.	KOMINAKIS et al., 2017; SULAK et al., 2016.
	<i>POLR2A</i>	20546 pb	Codifica a subunidade maior da RNA polimerase II em eucariotos.	KOMINAKIS et al., 2017; RANDHAWA et al. 2015.
	<i>CTC1</i>	22918 pb	Codifica um componente do complexo CST, que atua na proteção dos telômeros.	KOMINAKIS et al., 2017;
	<i>PIK3R5</i>	34215 pb	Desempenha papéis importantes no crescimento, proliferação e diferenciação celular e no fluxo intracelular.	KOMINAKIS et al., 2017;
Oar6	<i>MYH10</i>	155053 pb	Codifica um membro da superfamília da miosina.	AYUSO et al., 2016; KOMINAKIS et al., 2017
	<i>NCAPG</i>	78186 pb	Codifica proteína, responsável pela condensação e estabilização de cromossomos durante mitose e meiose.	AL-MAMUN et al., 2015; BOLORMAA et al., 2016; LIU et al., 2015b;
	<i>LCORL</i>	151356 pb	Codifica um fator de transcrição que atua na espermatogênese. Os polimorfismos na sequência deste gene estão associados com medidas do tamanho da estrutura esquelética e altura do adulto em humanos.	MATIKA et al., 2016

* informações baseadas no GenBank – NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

3.4 Amplificação e genotipagem dos *loci* polimórficos via PCR-RFLP

Uma vez determinada a presença dos SNPs, avaliou-se a ocorrência de sítios de restrição na posição dos mesmos para posterior genotipagem. Na presença dos sítios de restrição, foram desenhados *primers* flanqueando a região dos SNPs,

estabelecendo-se um limite de aproximadamente 500 pb para o amplicon gerado. Estes procedimentos foram realizados com o auxílio do programa GeneRunner, versão 6.3.0.3 (Hastings Software, Inc, N.Y. - <http://www.generunner.com>). Para o desenho dos *primers* foram estabelecidos os seguintes parâmetros: T_m variando entre 47 e 65°C; diferença de T_m entre os *primers* de no máximo 2°C; conteúdo GC (%) entre 38 a 60% e comprimento do *primer* de 18 a 22 bases.

As reações de amplificação (PCR) seguiram padrões iniciais descritos a seguir, e foram, posteriormente, otimizados de acordo com os resultados obtidos. Foi utilizado 10 ng de DNA em reações com volume final de 20 μ l. Foram também utilizados: 0,5 μ M de cada *primer*, 1 \times de tampão QuatroG, 0,5 U de Taq DNA-Polimerase QuatroG, 200 μ M de cada dNTP e 3 mM de MgCl₂. As condições da PCR seguiram os seguintes parâmetros: 95°C por 7 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a temperatura inicial de acordo com a T_m teórica calculada, por 60 s, extensão a 72°C por 60 s e extensão final a 72°C por 7 min.

Os ensaios de restrição seguiram as recomendações especificadas nas enzimas utilizadas e foram realizados em duplicata. Para aqueles indivíduos com genótipo inconclusivo nas primeiras corridas eletroforéticas o procedimento foi realizado em triplicata. Os resultados gerados foram verificados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 0,5 \times por 90 minutos a 90V, corado em brometo de etídio e registrado sob luz ultravioleta em fotodocumentador (*L-PIX Loccus Biotecnologia*).

3.5 Análise estatística

Considerando que os SNPs apresentam informações bi-alélicas, genericamente, os alelos A e B apresentarão frequências p e q na população amostrada, sendo que:

$$p = f_{(AA)} + 0,5f_{(AB)} \quad e \quad (1)$$

$$q = f_{(BB)} + 0,5f_{(AB)} \quad (2)$$

Onde $f_{(AA)}$ é a frequência observada do genótipo AA, $f_{(AB)}$ é a frequência observada do genótipo AB e $f_{(BB)}$ é a frequência observada do genótipo BB.

Com as informações geradas, estimou-se se a população amostrada encontrava-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde as frequências esperadas dos

genótipos foram calculadas com base em suas frequências alélicas, sendo as frequências esperadas do genótipos AA, AB e BB calculadas como segue:

$$f_{exp(AA)} = p^2 \quad (3)$$

$$f_{exp(AB)} = 2pq \quad (4)$$

$$f_{exp(BB)} = q^2 \quad (5)$$

A ocorrência do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinada após a realização do teste de qui-quadrado, utilizando os números observados e esperados de genótipos. As probabilidades associadas ao qui-quadrado foram avaliadas com o teste exato de Fisher, implementado na função “fisher.test” do programa R (R Development Core Team, 2018), sendo estabelecida a significância em 0,05.

Para a associação dos resultados genotípicos com os fenotípicos foi considerado um modelo estatístico que incluiu os efeitos de fazenda e do genótipo do SNP como covariável (efeito linear) e o erro associado a cada observação como efeito aleatório, utilizando-se o procedimento MIXED do programa SAS (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A equação do modelo estabelecido segue abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + SNP_j + e_{ij} \quad (6)$$

Onde Y_{ij} foi a característica observada (AOL, COL, POL, AG, CC, CT, AC, AP, PT e CGA); μ foi a média dessa característica; F_i foi o efeito de fazenda de criação do animal; SNP_j foi o efeito fixo do genótipo do j-ésimo SNP (AA, AG ou GG, o qual foi recodificado, na mesma ordem, para 2, 1 e 0); e e_{ij} foi o efeito aleatório associado resíduo com média zero e variância σ^2 . A significância foi declarada a $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

As amostras de DNA extraídas utilizando-se o Kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Hilden, Germany) apresentaram boa qualidade e quantidade suficiente para a realização das reações de PCR (Figura 1).

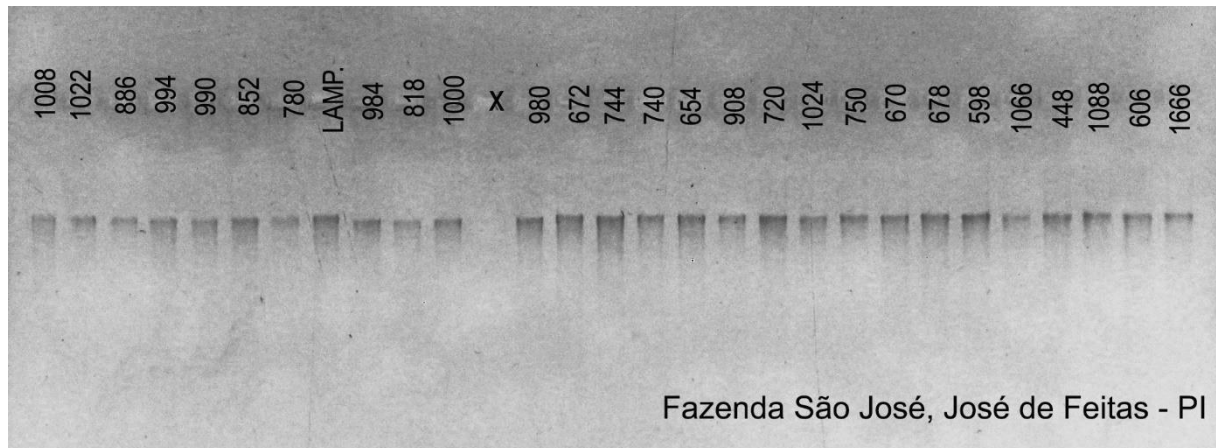


Figura 1. Amostras de DNA extraídas a partir de sangue utilizando-se Kit *DNeasy Blood & Tissue*. Amostras numeradas de acordo com o número do animal no banco de dados do Departamento de Zootecnia. (X) controle negativo.

Em Oar11, apenas o gene *MYH10* possui SNP em sua sequência, enquanto os dois genes localizados em Oar6, *NCAPG* e *LCORL*, apresentaram o polimorfismo de nucleotídeo único (Tabela 2). Para o gene *MYH10* não foi encontrada nenhuma enzima descrita na literatura com sítio de restrição na região do polimorfismo. Em Oar6, *NCAPG* apresentou dois SNPs em sua sequência, sendo a posição 26.960_G>A identificada como sítio de restrição da enzima *SimI*. Enquanto o gene *LCORL* possui quatro polimorfismos de nucleotídeo único, porém, estando apenas a variável 149.731_A>G em região possível de genotipagem em gel de agarose com enzima de restrição (*BstI*) (Figura 2).

Tabela 2 - Identificação da posição dos genes e SNPs selecionados no genoma de *Ovis aries*, evidenciando sua sequência e respectivas enzimas/sítios de restrição.

Cromossomo	Gene	SNP	Posição do Gene no Cromossomo	Posição do SNP no Cromossomo	Posição do SNP no gene	Sequência flanqueadora	Enzima de restrição
11	<i>RPL26</i>	-	27499965..27505389	-	-	-	-
	<i>SLC2A4</i>	-	26575379..26581015	-	-	-	-
	<i>DVL2</i>	-	26530589..26538510	-	-	-	-
	<i>CHRNA1</i>	-	26712856..26722130	-	-	-	-
	<i>TP53</i>	-	26894492..26907394	-	-	-	-
	<i>POLR2A</i>	-	26742685..26763230	-	-	-	-
	<i>CTC1</i>	-	27368333..27391250	-	-	-	-
	<i>PIK3R5</i>	-	27880120..27914334	-	-	-	-
	<i>MYH10</i>	A/G	27584808..27739860	27654920	70113	AGTGAGTTAAATTTTACCAA	-
6	<i>NCAPG</i>	G/A	37179188..37257373	37206147	26960	CATCTCTAGGGTCAAATACAT	<i>SimI</i> (GGTC)
		C/D		37246412	67225	TCAGTGAACACATCTAGTCTT	-
	<i>LCORL</i>	T/V	37274935..37426290	37296229	21295	TGTGTATTGATTTTCAGTCAG	-
		G/H		37329315	54381	AATATGATGAGAGTACGGTAG	-
		G/H		37386559	111625	GGTAAACCAGTAGTGTGTCT	<i>BsrI</i> (GGTCA)*
		A/G		37424665	149731	CCATCAAACCAAGTTCCAATTC	<i>BsrI</i> (GGTCA)

Os símbolos D, H e V foram utilizados de acordo com a nomenclatura recomendada pela IUPAC para representar nucleotídeos desconhecidos.

*sítios de restrição da mesma enzima posicionados muito próximos, impossibilitando a genotipagem em gel de agarose.

** informações baseadas no GenBank – NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

A partir da informação de posicionamento dos éxons nas sequências gênicas obtidas no GenBank, foi possível determinar se os SNPs analisados localizavam-se em sequências codificantes ou não. No gene *NCAPG*, que possui 22 éxons em *Ovis aries*, o SNP26.960_G>A situa-se no primeiro íntron. Já na sequência do gene *LCORL* do mesmo organismo, há sete éxons, estando o SNP_149.731A>G posicionado no último éxon.

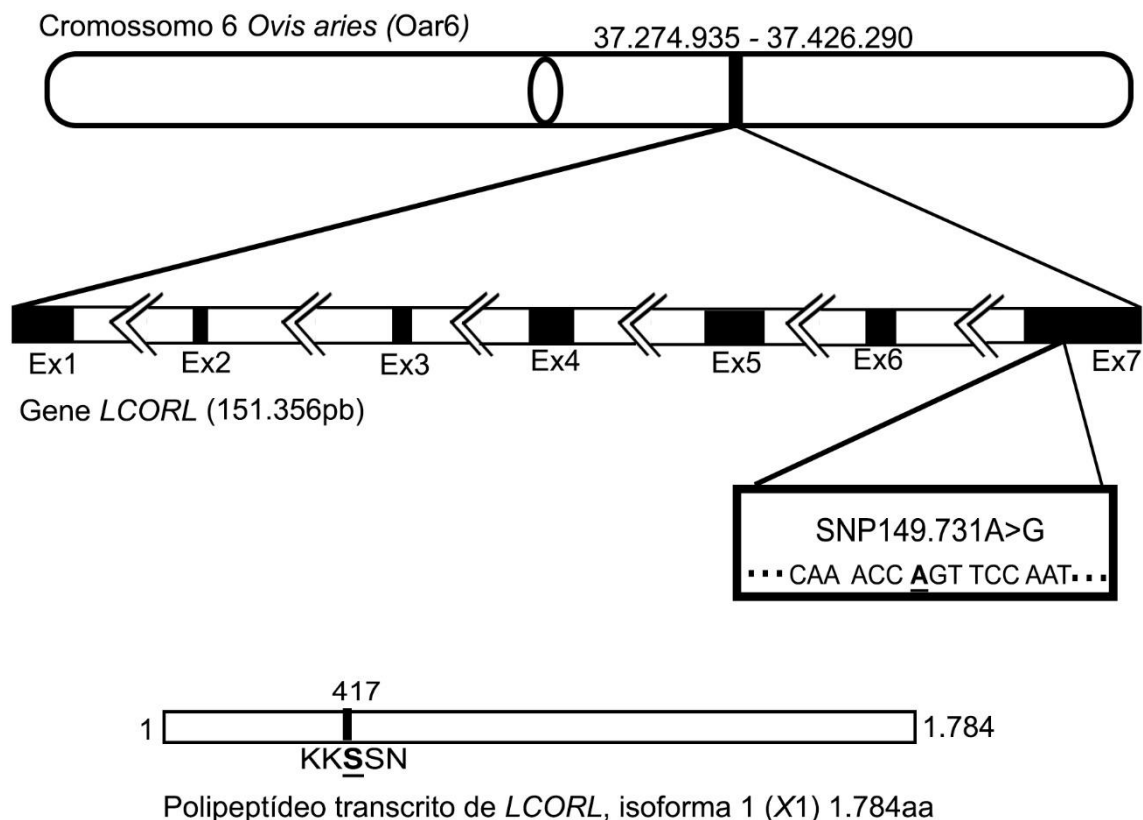


Figura 2. Posições do nucleotídeo (A-149.731) e aminoácido (Ser-417) mutados na sequência do gene *LCORL* e do polipeptídeo codificado em *Ovis aries*.

Devido ao SNP do gene *LCORL* posicionar-se em uma sequência de éxon, realizou-se a comparação da sequência de aminoácidos traduzidos a partir desse éxon com a sequência completa da proteína disponível no NCBI utilizando o software MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Dessa forma foi possível determinar a posição e o aminoácido codificado pela trinca de nucleotídeos associados ao SNP em questão.

Para cada um dos genes, foram geradas duas sequências de *primer* (Tabela 3). Os resultados que renderam as melhores amplificações por PCR foram com 10 ng de DNA em uma reação com volume final de 20 µl. O par NF2/NR foi otimizado para

reações contendo 0,5 μM de cada *primer*, 1 \times de tampão QuatroG, 0,5 U de Taq DNA-Polimerase QuatroG, 200 μM de cada dNTP e 3 mM de MgCl_2 . As condições da PCR seguiram os seguintes parâmetros: 95°C por 7 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, anelamento a 53°C por 60 s, extensão a 72°C por 60 s e extensão final a 72°C por 7 min. As reações para o par LF/LR1 foram realizadas utilizando-se 0,5 μM de cada *primer*, 1 \times de tampão QuatroG, 0,5 U de Taq DNA-Polimerase QuatroG, 200 μM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl_2 . PCR *touchdown*: 95°C por 7 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, temperatura de anelamento começando a 59°C, decrescendo 0,5°C a cada ciclo durante 6 ciclos e 57°C nos 24 ciclos seguintes por 60 s, extensão a 72°C por 60 s e extensão final a 72°C por 7 min.

Tabela 3 – Características dos *primers* para amplificação dos sítios polimórficos dos genes *LCORL* e *NCAPG* e tamanho dos produtos amplificados.

Genes	Primer	Sequência 5'→3'	T _m (°C)	Amplicon (pb)
<i>LCORL</i>	LF	TTGATACTGCTTTGGGAACCAC	53	445
	LR1	AACCCAGTAACCCTGCATTCC	54	
	LF	TTGATACTGCTTTGGGAACCAC	53	435
	LR2	CCCTGCATTCCCTTCACTCTTTC	54	
<i>NCAPG</i>	NF1	ACAGATGGACTACAAGCATAGG	51	401
	NR	ATGTGCCATTGCTGAGAAC	51	
	NF2	CAAGCATAGGTTAAATTGCAG	48	389
	NR	ATGTGCCATTGCTGAGAAC	51	

A genotipagem do SNP149.731_A>G do gene *LCORL* foi realizada utilizando-se uma alíquota de 5 μl do produto de PCR para 0,1 μl da enzima *BsrI* e 1 μl de tampão 1 \times , de modo a perfazer um volume total de 10 μl por amostra. As amostras foram incubadas a 65°C por 10 min para digestão dos fragmentos de DNA, seguido de desnaturação enzimática a 80°C por 20 min em termociclador *Applied Biosystems*®, de acordo com o protocolo do fabricante da enzima, *New England Biolabs*®. Através desse método, os fragmentos de 445 pb amplificados por PCR, foram digeridos por *BsrI* em dois fragmentos contendo 328 e 117 pb naqueles animais com o alelo **A**, mas não nos que possuíam o alelo **G**. Dessa forma, os homozigotos **GG**, os homozigotos **AA** e os heterozigotos **AG** produziram, respectivamente, uma banda (445 pb), duas bandas (328 e 117 pb) e três bandas (445, 328 e 117 pb) (Figura 3).

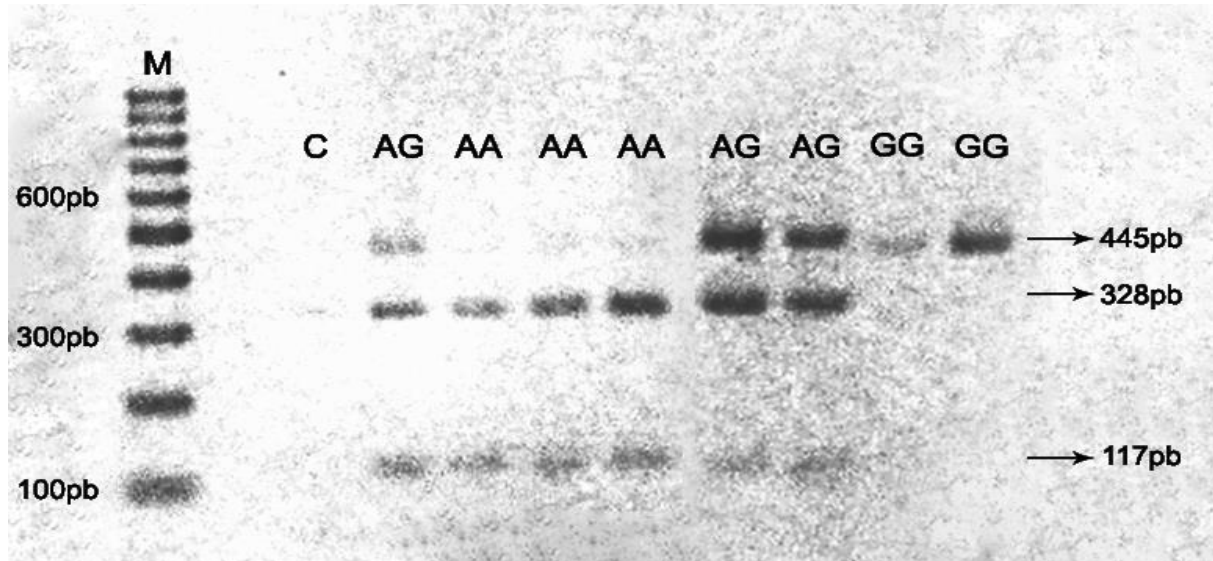


Figura 3. Digestão do *amplicom* de 445 pb do gene *LCORL* de ovinos Santa Inês com a enzima *BsrI*. (M) marcador de tamanho molecular, (C) controle negativo. Genótipos GG: banda com 445 pb; AG: bandas com 445 pb, 328 pb e 117 pb; AA: bandas com 328 pb e 117 pb.

Os pares de *primers* NF1/NR e LF/LR2 não apresentaram *amplicons* com definição satisfatória para visualização após eletroforese. Considerando ainda a indisponibilidade da enzima *SimI* no mercado nacional, apenas os *amplicons* gerados pelo par de *primers* LF/LR1 foram analisados nesse trabalho.

Por meio da análise das sequências de éxons e da sequência de aminoácidos da isoforma X1 do polipeptídeo traduzido do gene *LCORL* de *Ovis aries*, foi possível identificar a posição e o aminoácido mutado na cadeia proteica. De acordo com as informações do posicionamento do nucleotídeo, ficou constatado que o mesmo se posicionou como primeira base do códon. Portanto, o SNP149.731_A>G é uma mutação não sinônima, que causa substituição de um aminoácido por outro. A serina codificada pela trinca **AGT** na posição 417 (Ser-417) da proteína é substituída por uma glicina codificada por **GGT** (Gly-417).

Após a genotipagem de todos os animais, os resultados mostraram que essa mutação (variável **G**) apresenta frequência baixa nos rebanhos analisados nesse estudo. Enquanto o alelo **A** apresenta frequência de 0,911, o alelo **G** tem frequência de 0,089, sendo os valores obtidos após a análise das frequências genotípicas observadas (Tabela 4). Foi ainda constatado que os números observados de genótipos encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,41$), havendo pouca variação quando os mesmos foram comparados aos valores esperados (Tabela 4). Devido à baixa frequência do alelo G, o genótipo GG também apresentou-se como o

menos frequente, sendo observado apenas 5 animais entre os 276 animais genotipados.

Os genótipos obtidos foram, então, correlacionados com as informações fenotípicas. Os valores de médias das medidas avaliadas mostram que o genótipo GG apresenta melhor desempenho em características de qualidade carcaça e de tamanho corporal dos animais (Tabela 5).

Tabela 4 - Frequência observadas e esperadas para os genótipos do SNP149.731_A>G no gene *LCORL* em ovinos Santa Inês de fazendas do Piauí e Maranhão

Genótipo	Nº de animais	Frequência obs.	Frequência esp.	Nº esp. de animais
AA	232	0,840	0,830	229,17
AG	39	0,141	0,162	44,65
GG	5	0,018	0,008	2,17

Tabela 5 - Médias das medidas corporais e de carcaça e efeito de substituição alélica (β) calculados para os ovinos Santa Inês amostrados seis propriedades localizadas nos estados do Piauí e Maranhão.

Características	Pvalor	Genótipos			Beta(β)
		AA	AG	GG	
AOL	0,0296*	8,801±2,847	10,021±2,941	10,512±2,015	-0,771
COL	0,0177*	4,420±0,663	4,709±0,672	4,944±0,373	-0,192
POL	0,0028*	2,408±0,451	2,750±1,117	2,644±0,413	-0,244
AG	0,0193*	75,362±3,082	76,923±3,765	76,600±2,702	-0,978
CC	0,0017*	72,733±4,949	73,923±6,702	74,600±6,066	-2,155
CT	0,0104*	90,099±7,714	93,269±8,238	90,600±10,040	-2,448
AC	0,3027	74,647±3,819	76,513±4,520	74,800±2,280	-0,569
AP	0,0842	40,121±2,959	41,308±3,012	41,000±2,121	-0,755
PT	0,6857	34,526±3,257	35,205±3,684	33,800±2,588	0,185
CGA	0,3038	20,739±3,392	21,987±3,463	22,800±2,387	-0,362

AOL, Área de olho de lombo (cm²); COL, Comprimento de olho de lombo (cm); POL, Profundidade de olho de lombo (cm); AG, Altura da garupa (cm); CC, Comprimento corporal (cm); CT, Circunferência torácica (cm); AC, Altura da cernelha (cm); AP, Altura da pata (cm); PT, Profundidade torácica (cm); CGA, Comprimento da garupa (cm). (*) medidas com valores de média significativamente diferentes para cada genótipo ($P < 0,05$).

Das dez medidas corporais e de carcaça analisadas neste trabalho, seis mostraram significativa diferença entre as médias de cada genótipo utilizando-se o método de estimativa REML para $P < 0,05$. As três medidas de qualidade de carcaça (AOL, COL e POL) e três medidas de tamanho corporal (AG, CC e CT) tiveram efeito significativo para substituição alélica, tendo o genótipo de frequência mais baixa, GG, apresentado maiores médias para essas características (Figura 4).

Todas as medidas analisadas apresentaram correlação positiva com a substituição alélica, mostrando que o aumento na frequência alelo G nos rebanhos ovinos Santa Inês traria ganhos na produtividade de carne.

Entre as medidas que não mostraram efeito significativamente associado a substituição alélica ($P > 0,05$), a altura da pata (AP), que está diretamente relacionada a altura total do animal, tem valor com sugestiva associação ao genótipo ($P = 0,0842$). Sendo observado o mesmo genótipo o associado as maiores médias que nas demais medidas com associação mais significativa.

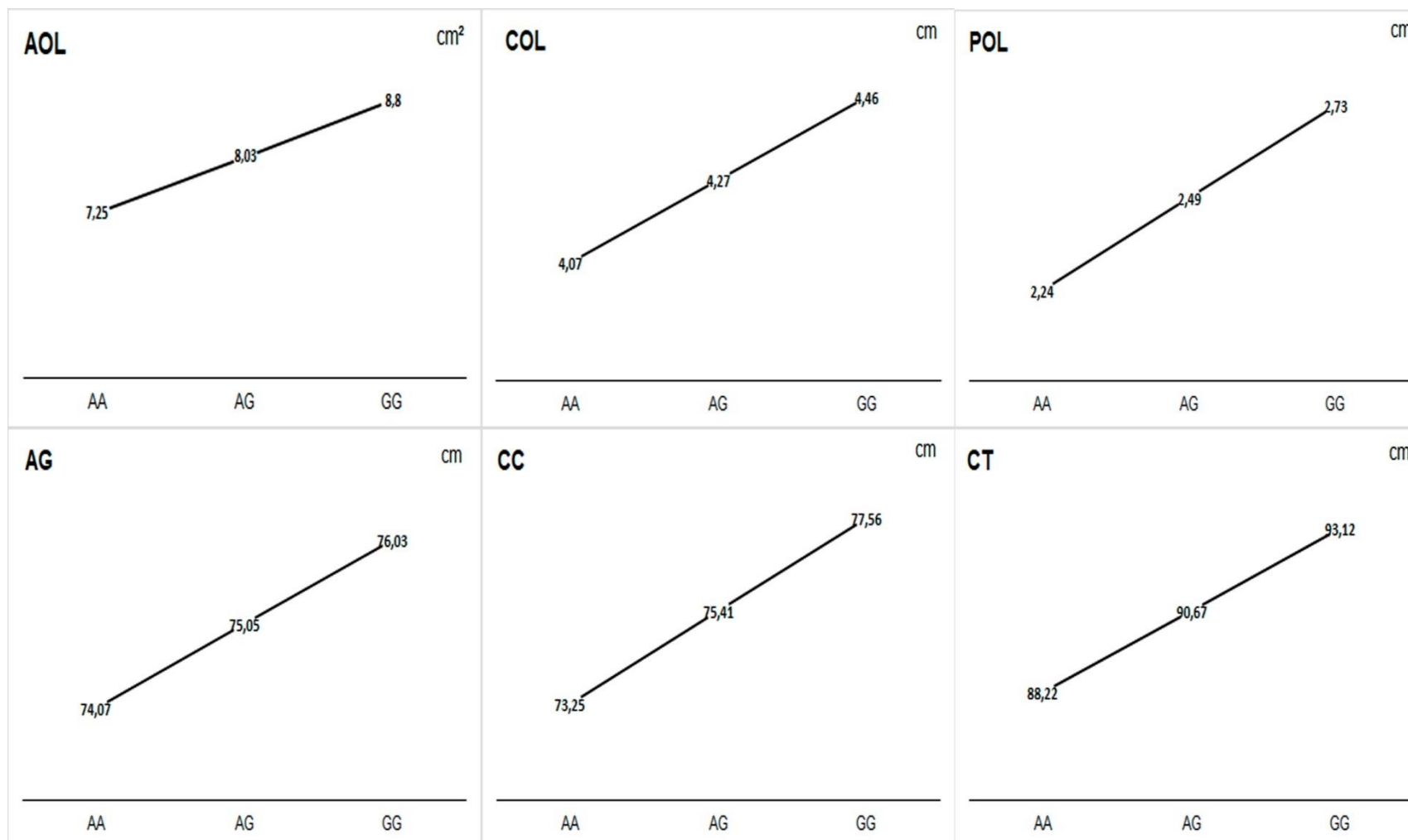


Figura 4. Efeito significativo da substituição alélica ($P < 0,05$) no SNP149.731_A>G do gene *LCORL* estimado por regressão linear em características de qualidade de carcaça e tamanho corporal de ovinos Santa Inês ($Y = \alpha + \beta x$, onde Y é a média da característica e x é o valor atribuído ao genótipo). AOL (área de olho de lombo); COL (comprimento de olho de lombo); POL (profundidade de olho de lombo); AG (altura da garupa); CC (comprimento corporal); CT (circunferência torácica).

5. DISCUSSÃO

Após as triagens realizadas nos genes-alvo, apenas o gene *LCORL* mostrou-se eficaz para aplicação em seleção assistida por marcadores moleculares já que mostrou correlação significativa com a maioria das características fenotípicas avaliadas. Salienta-se que as triagens foram realizadas na tentativa de se obter informações genotípicas a baixo custo, com o uso de técnicas simples e rápidas.

A substituição do aminoácido na posição 417 da proteína pode trazer mudanças na estrutura tridimensional da proteína, uma vez que essa é mantida por interações químicas entre moléculas de diferentes pontos da cadeia. A substituição de uma serina por uma glicina pode causar algum tipo de alteração conformacional na proteína codificada por *LCORL*, uma vez que serina apresenta uma cadeia lateral polar (-OH), enquanto a glicina é classificada como um aminoácido de cadeia lateral apolar, pois seu radical é formado apenas por um átomo de hidrogênio e a ligação C-H é apolar (CAMPBELL, 2000).

Os genes *NCAPG* e *LCORL* estão associados a características de crescimento e altura em ovinos (AL-MAMUN et al., 2015; MATIKA et al., 2016). No entanto, é difícil identificar qual dos genes é mais efetivamente responsável por essas variações, uma vez que a região onde se localizam apresenta elevado desequilíbrio de ligação (ROCHUS et al., 2018). Estudos mostram que esse QTL vem sofrendo seleção em ovinos, tanto de raças produtoras de leite quanto de carne, estando relacionados a ambas as características (ROCHUS et al., 2018; RUIZ-LARRAÑAGA et al., 2018).

Porém, é sabido que variações na sequência de *LCORL* afeta características como comprimento e peso ao nascer e altura em mamíferos adultos, inclusive humanos (VAN DER VALK et al., 2014).

Mesmo variações em regiões intrônicas mostraram influenciar significativamente características de tamanho ao nascer, bem como tamanho e estrutural corporal em bovinos adultos de raças de corte europeias (SAHANA et al., 2015).

Han et al. (2017) identificou significativo efeito da substituição alélica em um SNP na região de íntron do gene *LCORL* para peso de carcaça em bovinos da raça Qinchuan, sugerindo que o gene é um forte candidato a marcador para seleção assistida para qualidade de carcaça para essa raça. De modo similar, com base nos resultados significativos encontrados para medias de carcaça, pode-se sugerir a

utilização do SNP analisado neste trabalho como marcador de seleção para o melhoramento de ovinos Santa Inês.

A área de olho de lombo (AOL), por exemplo, é uma importante medida para mensuração da composição corporal em ovinos, uma vez que apresenta alta e positiva correlação com a distribuição de músculos na carcaça (MCMANUS et al., 2013b). Segundo Dode et al. (1986), quando comparados animais de mesma idade, aqueles com maior área de músculo *longissimus dorsi*, apresentam maior desenvolvimento muscular na carcaça. AOL em ovinos adultos representam o índice de maior confiabilidade do desenvolvimento e tamanho do tecido muscular (MORENO; BOAVENTURA NETO, 2016). Neste trabalho foi encontrado significativo efeito da substituição alélica ($P=0,0296$) sobre as medidas de área de olho de lombo para o SNP analisado.

Área de olho de lombo apresenta correlação positiva com as medidas de comprimento e profundidade do músculo *longissimus dorsi*, sendo medidas que podem ser utilizadas na avaliação de características da carcaça de ovinos em função de sua precisão (PINHEIRO; JORGE, YOKOO; 2010).

Através de análises de GWAS utilizando dados de desequilíbrio de ligação, SNPs do gene *LCORL* mostraram-se significativamente associados com medidas de área de olho de lombo em bovinos de corte da raça Canchim (SANTIAGO et al., 2017). Esses resultados confirmam que os polimorfismos no gene *LCORL* implicam diretamente na qualidade de carcaça tanto em bovino quanto em ovinos.

O fato de o genótipo GG para SNP analisado apresentar frequência baixa nos rebanhos analisados, apesar de seu efeito significativo sobre medidas de qualidade de carcaça, pode indicar que os ovinos da raça Santa Inês vêm sofrendo uma seleção que busca apenas melhorias estéticas com vistas a animais de exposição, menosprezando características que podem aumentar a produtividade desses animais (CARNEIRO et al., 2006). Uma possível explicação para a baixa frequência desse genótipo nesses ovinos de corte, é que genes não ligados *LCORL* e com maior efeito sobre medidas de tamanho corporal estejam sendo selecionados, em detrimento de *LCORL* que se mostrou mais fortemente associado ao rendimento de carcaça. Porém, mais estudos devem ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

Tong et al. (2016) encontraram resultados semelhantes aos expostos aqui ao estudarem polimorfismos na sequência do gene *NCAPG*, em bovinos da raça Japanese Black. O genótipo com melhores médias para características de qualidade

de carcaça como área e espessura de olho de lombo e marmoreio da carne (GG), apareceu em frequência consideravelmente baixa (0,06), enquanto os genótipos de pior desempenho (GT e TT) aparecem em frequência bem mais elevada (0,403 e 0,537, respectivamente). Esses dados, de maneira análoga aos encontrados neste trabalho, mostram que a seleção artificial promovida pelos criadores, pode, em alguns casos, levar a diminuição da frequência de genótipos que estão associados a características de melhor rendimento na produção de carne.

Outra característica que demonstra que a seleção pode não ser direcionada especificamente para o gene *LCORL* é o fato do mesmo apresentar-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg no estudo realizado. Como uma das premissas do equilíbrio é justamente a ausência de seleção, podemos inferir que a distribuição dos alelos ocorre de forma aleatória na população estudada e sua frequência é explicada apenas pelo próprio processo mendeliano. Assim, pelo menos em caráter experimental, o gene *LCORL* poderia ser priorizado em estratégias de melhoramento assistida por marcadores, para testar os efeitos do aumento da frequência do alelo G na população de ovinos Santa Inês.

Avaliar a qualidade da carcaça animal beneficia a todos os envolvidos na cadeia de produção e consumo de produtos cárneos. O produtor conseguirá melhor preço e maior produtividade, a indústria aumentará o rendimento e o consumidor, por sua vez, terá acesso a cortes com melhor nível de qualidade (ARÉVALO et al., 1997). A carcaça é o elemento mais importante do animal, pois representa a maior porção comestível do corpo, e dessa forma, o objetivo comercial mais rentável (GERALDO et al., 2017).

Pesquisas recentes com outras espécies de mamíferos mostram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho ao avaliar características de tamanho corporal. Sevane et al. (2017), ao estudar polimorfismos do tipo SNP em regiões próximas ao gene *LCORL* em cavalos puro sangue espanhol, encontraram efeito significativo da substituição alélica nos SNPs avaliados associados a medidas de altura e comprimento corporal dos animais. Estudando essa mesma mutação, que se localiza na região *upstream* do gene *LCORL* em nessa espécie, Metzge et al. (2013) descobriram que a substituição alélica desse SNP afeta diretamente os níveis de expressão de *LCORL*. O efeito dessa variação se manifesta diretamente na altura de cavalos de diferentes raças. Os pôneis, por exemplo, apresentam uma frequência próxima de 1 para o genótipo que confere os menores níveis de expressão de *LCORL*.

Dentre as medidas de tamanho corporal avaliadas nesse trabalho, o comprimento corporal (CC) foi a que mostrou o mais significativo efeito de substituição alélica ($P=0,0017$). Similarmente as medidas de carcaça, o genótipo com maiores valores de médias foi o de menos frequência nos rebanhos analisados (GG). Resultados semelhantes foram encontrados por Liu et al. (2015a), que demonstraram a correlação entre SNPs do gene *NCAPG* com medidas de comprimento corporal em bovinos de corte da raça Chinese Qinchuan. O genótipo que com maiores valores de média de comprimento corporal (151,42 cm) também foi o de menor frequência nos rebanhos amostrados (0,123). Os genótipos com menores médias (146,69 cm e 139,22cm) aparecem em frequências significativamente mais elevadas (0,470 e 0,404, respectivamente). Mais uma vez os dados vêm corroborar que a seleção realizada em rebanhos de corte pode não estar priorizando os melhores genótipos para as características importantes para a produção de carne. Além do mais, esses achados vêm reforçar a importância da SAM no melhoramento genéticos dos diferentes rebanhos.

Como já mencionado anteriormente, o gene *LCORL* demonstra efeito pleiotrópico afetando diferentes características de tamanho e composição de carcaça em mamíferos (LINDHOLM-PERRY et al., 2011). Esse gene também tem sido reportado como codificador de um fator de transcrição associado ao processo de espermatogênese em bovinos e equinos (CHUNG; SZYDA; FRASZCZAK, 2016; TOZAKI et al., 2017). Isso pode ser um indício de que o gene *LCORL* possa estar relacionado aos níveis de hormônios andrógenos em mamíferos. Esses hormônios, produzido pelos testículos e, em menor quantidade, também pelos ovários de mamíferos têm, entre outros, papel nos processos de espermatogênese e aumento de massa muscular (NIESCHLAG; BEHRE, 2012; MOREIRA, 2015).

Os níveis de testosterona, por exemplo, afetam diretamente a composição da carcaça em ovinos. A proporção de gordura nesses pequenos ruminantes é menor nos machos não castrados, intermediária nos castrados e maior nas fêmeas. Já a deposição de músculo é maior nos machos não castrados, intermediária nos castrados e menor nas fêmeas, já que a testosterona aumenta o crescimento muscular (CEZAR; SOUSA, 2007).

No entanto, estudos futuros e com diferentes análises são necessários para a confirmação do papel de *LCORL* nos níveis de hormônios androgênicos em mamíferos.

6. CONCLUSÕES

Dos onze genes considerados para triagem na presente pesquisa, apenas *LCORL* e *NCAPG* apresentaram SNPs polimórficos em suas sequências, identificadas como sítios de restrição para genotipagem com método PCR-RFLP.

Os *primers* desenhados para amplificação da região flanqueadora do polimorfismo do tipo SNP na sequência do gene *LCORL* em ovinos Santa Inês mostrou-se eficiente e específico para a amplificação por PCR nas condições especificadas neste trabalho.

O SNP 149.731_A>G do gene *LCORL*, que promove a substituição do aminoácido Ser-417 por Gly-417 na proteína codificada, proporciona significativa diferença em medidas de tamanho corporal e estrutura de carcaça em ovinos da raça Santa Inês e pode ser aplicado como um marcador molecular com vistas ao uso em seleção assistida.

Nas amostras avaliadas, não foram encontradas evidências de pressão seletiva ocasionada sobre o gene *LCORL* e, portanto, o mesmo pode ser indicado como alvo potencial no melhoramento, visando o aumento da frequência do alelo G, o qual causa maior efeito nas características de crescimento e carcaça dos animais da raça Santa Inês.

REFERÊNCIAS

- AL-MAMUN, H. A.; KWAN. P.; CLARK S. A.; FERDOSI, M. H.; TELLAM, R.; GONDRO, C. Genome-wide association study of body weight in Australian Merino sheep reveals an orthologous region on OAR6 to human and bovine genomic regions affecting height and weight. **Genetics Selection Evolution**, v.47, n.66, 2015.
- ANUALPEC 2011: **Anuário Estatístico da Pecuária de Corte**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011.
- ARÉVALO, K. B. O.; JARDIM, P. O. C.; OSÓRIO, J. C. S.; PIMENTEL, M. A.; LÜDER, W. E. Espessura da gordura de cobertura e área do músculo *longissimus dorsi* no peso e composição física de cortes do serrote. **Revista Brasileira de Agrocência**, v.3, n.1, p.43-49, 1997.
- AYUSO, M.; FERNÁNDEZ, A.; NÚÑEZ, Y.; BENÍTEZ, R.; ISABEL, B.; FERNÁNDEZ, A. I.; REY, A. I.; GONZÁLEZ-BULNES, A.; MEDRANO, J. F.; CÁNOVAS, A.; O. CRISTINA.; LÓPEZ-BOTE, C. J. Developmental stage, muscle and genetic type modify muscle transcriptome in pigs: effects on gene expression and regulatory factors involved in growth and metabolism. **PLoS One**, v.11, n.12, 2016.
- BAKHTIAR, R.; ABDOLMOHAMMADI, A. HAJARIAN, H.; NIKOUSEFAT Z.; DAVOOD; NEYESTANAKI, K. Identification of 332G>A polymorphism in exon 3 of the leptin gene and partially effects on body size and tail dimension in Sanjabi sheep. **International Journal of Bioengineering and Life Sciences**, v.11, n.7, 2017.
- BENAVIDES, M. V.; WEIMER, T. A.; BORBA, M. F. S.; BERNE, M. E. A.; SACCO, A. M. S. Association between microsatellite markers of sheep chromosome 5 and faecal egg counts. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 2, p. 97-105, 2002.
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, vol. 27, n. 3 p. 513-520, 1997.
- BOLORMAA, S.; HAYES, B. J.; WERF, J. H. J.; PETHICK, D.; GODDARD, M. E.; DAETWYLER, H. D. Detailed phenotyping identifies genes with pleiotropic effects on body composition. **BMC Genomics**, v.17 n.224, 2016.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2016. p. 9, 69
- BOYKO, A. R.; BROOKS S. A.; BEHAN-BRAMAN, A.; CASTELHANO, M.; COREY, E.; OLIVEIRA, K. C.; SWINBURNE, J. E.; TODHUNTER, R. J.; ZHANG, Z.; AINSWORTH D. M.; ROBINSON, N. E. Genomic analysis establishes correlation between growth and laryngeal neuropathy in Thoroughbreds. **BMC Genomics**, v.15, n.259, 2014.
- BURNISTON, J. G.; MEEK, T. H.; PANDEY, S. N.; BROITMAN-MADURO, G.; MADURO, M. F.; BRONIKOWSKI, A. M.; GARLAND JUNIOR, T.; CHEN, Y. W. Gene expression profiling of gastrocnemius of “minimuscle” mice. **Physiological Genomics**, v.45, n.6, p.228-236, 2013.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Tradução de Henrique Bunselmeyer Ferreira et al. - 3.ed.- Porto Alegre. Artimed, 2000. p. 305-307
- CARNEIRO, P. L. S.; MALHADO, C. H. M.; AZEVÊDO D. M. M. R.; SOUZA, L. G. R.; SILVA, D. C.; ALVES, A. Z.; CAMPELO, J. E. G.; COSTA JÚNIOR, G. S. Estudo de

- populações de ovinos Santa Inês utilizando técnicas de análise multivariada. **Revista Científica de Produção Animal**, v.8, n.1, p.40-50, 2006.
- CEZAR, M.F.; SOUSA, W.H. **Carcaças ovinas e caprinas: obtenção, avaliação e classificação**. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical, 2007.
- CHUNG, N. C.; SZYDA, J.; FRASZCZAK, M. Population Structure Analysis of Globally Diverse Bull Genomes. **bioRxiv**, p.059139, 2016.
- CURI, R. A.; CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, H. N. Alternative genotyping method for the single nucleotide polymorphism A2959G (AF159246) of the bovine *CAST* gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.5, p.657-659, 2008.
- DODE, M. A. N.; JARDIM, P. O. C.; OSÓRIO, J. C. S.; LUDER, W. E.; MACHADO, A. A. Estimativas dos principais cortes e da porção comestível da carcaça, em novilhos holandês. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n7, p.771-776, 1986.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-Moleculares: Aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2007. p. 102
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 1998. 220p.
- Food and Agriculture Organization – FAO. **FAOSTAT Product on live animals**. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- GARCIA, C. A.; CIDRÃO, K.; SPERS, R. C.; COLOMBO, D.; TREVIZAN, B. A. Produção de cordeiros em regime de pasto, com suplementação mineral e proteica em cochos privativos. **Unimar Ciências**, v.25, p.57-67, 2016.
- GERALDO, A. T.; QUIRINO, C. R.; BELTRAME, R. T.; COSTA, R. L. D. Avaliação de carcaça ovina por tomografia computadorizada: Estado da Arte no Brasil e no mundo. **PUBVET**, v.11, n.1, p.91-102, 2017.
- GOIS, G. C.; PESSOA, R. M. S.; SILVA, E. G.; MACEDO, A.; LAURENTINO, A. B. Composição de ácidos graxos na carne ovina. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.13, n.5, p.4806-4814, 2016.
- GORLOV, I. F.; KOLOSOV, Y. A.; SHIROKOVA, N. V.; GETMANTSEVA, L. V.; SLOZHENKINA, M. I.; MOSOLOVA, N. I.; BAKOEV, N. F.; LEONOVA, M. A.; KOLOSOV, A. Y.; ZLOBINA, E. Y. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed. **Small Ruminant Research**, v. 150, p. 11-14, 2017.
- GROCHOWSKA, E.; BORYS, B.; JANISZEWSKI, P.; KNAPIK, J.; MROCZKOWSKI, S. Effect of the *IGF-I* gene polymorphism on growth, body size, carcass and meat quality traits in Coloured Polish Merino sheep. **Archives Animal Breeding**, v.60, p.161-173, 2017.
- HAN, Y. J.; CHEN, Y.; LIU, Y.; LIU, X. L. Sequence variants of the *LCORL* gene and its association with growth and carcass traits in Qinchuan cattle in China. **Journal of Genetics**, v.96, n.1, 2017.
- HAZEL, L.N. The genetic basis for constructing selections indexes. **Genetics**, v.28, p.476-490, 1943.

- HENDERSON, C.R. **Applications of linear models in animal breeding**. University of Guelph, Guelph, 1984.
- HOSHIBA, H.; SETOGUCHI, K.; WATANABE, T.; KINOSHITA, A.; MIZOSHITA, K.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. Comparison of the effects explained by variations in the bovine *PLAG1* and *NCAPG* genes on daily body weight gain, linear skeletal measurements and carcass traits in Japanese Black steers from a progeny testing program. **Animal Science Journal**, v.84, p.529-534, 2013.
- INIESTA, R.; GUINÓ, E.; MORENO, V. Análisis estadístico de polimorfismo genéticos em estudos epidemiológicos. **Gaceta Sanitaria**, v.19, p.333-341, 2005.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa da Produção da Pecuária Municipal 2016 (PPM)**. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm>> Acesso em: 18 mar. 2018.
- KADARMIDEEN, H. N.; ROHR, P.; JANSS, L. L.G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v.17, p.548-564, 2006.
- KOMINAKIS, A.; HAGER-THEODORIDES, A. L.; ZOIDIS, E.; SARIDAKI, A.; ANTONAKOS, G.; TSIAMIS, G. Combined GWAS and ‘guilt by association’-based prioritization analysis identifies functional candidate genes for body size in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v.49, n.41, 2017.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016.
- LI, H.; WANG, X.; RUKINA, D.; HUANG, Q.; LIN, T.; SORRENTINO, V.; ZHANG, H.; SLEIMAN, M. B.; ARENDS, D.; MCDAID, A.; LUAN, P.; ZIARI, N.; VELÁZQUEZ-VILLEGAS, L. A.; GARIANI, K.; KUTALIK, Z.; SCHOONJANS, K.; RADCLIFFE, R. A. PRINS, P.; MORGENTHALER, S.; WILLIAMS, R. W.; AUWERX, J. An Integrated Systems Genetics and Omics Toolkit to Probe Gene Function. **Cell Systems**, v.6, p.90-102, 2018.
- LINDHOLM-PERRY, A. K.; SEXTEN, A. K.; KUEHN, L. A. SMITH, T. P. L.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; FERRELL, C. L.; JENKINS, T. G.; SNELLING, W. M.; FREELY, H. C. Association, effects and validation of polymorphisms within the *NCAPG-LCORL* locus located on BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. **BMC Genetics**, v.12, n.103, 2011.
- LIU, R.; SUN, Y.; ZHAO, G.; WANG, H.; ZHENG, M.; LI, P.; LIU, L.; WEN J. Identification of loci and genes for growth related traits from a genome-wide association study in a slow-Xfast-growing broiler chicken cross. **Genes & Genomics**, n.37, p.829-836, 2015b.
- LIU, Y.; DUAN X.; CHEN S.; HE, H.; LIU, X. *NCAPG* is differentially expressed during longissimus muscle development and is associated with growth traits in Chinese Qinchuan beef cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v.38, n.4, p.450-456, 2015a.
- LÔBO, R. N. B.; VILELLA, L. C. V.; FACÓ, O. Programas de melhoramento genético de caprinos e ovinos: importância prática. In: **I Simpósio de Caprinos e Ovinos da Escola de Veterinária da UFMG**. Belo Horizonte, 2005. Anais...Belo Horizonte, 2005. CD-ROM

- MADRUGA, M. S.; SOUSA, W. H.; R. M. D.; CUNHA, M. G. G.; RAMOS, J. L. F. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.309-315, 2005.
- MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. De selvagens a domésticos. In: **Animais do descobrimento, raças domésticas da história do Brasil**. 1ed. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2000. p.14-27
- MARQUES, I. T. O.; SARMENTO, J. L. R.; BIAGIOTTI, D.; VALE, K. A. G.; CARVALHO, K. S. S.; BRITTO, F. B. Caracterização da diversidade genética de ovinos Santa Inês em fazendas do Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.16, n.3, p.523-534, 2015.
- MARTINS, E. C.; MAGALHÃES, K. A.; SOUZA, J. D. F.; GUIMARÃES, V. P.; BARBOSA, C. M. P.; HOLANDA-FILHO, Z. F. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Boletim Ativos de Ovinos e Caprinos**, v.3, n.2, 2016.
- MATIKA, O.; RIGGIO, V.; ANSELME-MOIZAN, M.; LAW, A. S.; PONG-WONG, R.; ARCHIBALD, A. L.; BISHOP, S. C. Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and in vivo carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs. **Genetics Selection Evolution**, v.48, n.11, 2016.
- MCMANUS, C.; HERMUCHE, P.; PAIVA, S. R.; MORAES, J. C. F.; MELO, C. B.; MENDES, C. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v.1, n.3, 2013a.
- MCMANUS, C.; PAIM, T. P.; LOUVANDINI, H.; DALLAGO, B. S. L.; DIAS, L. T.; TEIXEIRA, R. A. Avaliação ultrassonográfica da qualidade de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.1 2013b.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S. R.; ARAÚJO, R. O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.236-246, 2010.
- METZGER, J.; SCHRIMPF, R.; PHILIPP, U.; DISTL, O. Expression levels of *LCORL* are associated with body size in horses. **PLoS One**, v.8, n.2, p.e56497, 2013.
- MORAIS, O.R. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: PEREIRA, J. C. C. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 3.ed. Belo Horizonte, FEPMUZ, 2001. p.320-330.
- MOREIRA, C. Regulação Sistemas Reprodutores. **Revista de Ciência Elementar**, v.3, n.3, p.167, 2015.
- MORENO, G. M. B.; BOAVENTURA NETO, O. Avaliação e cortes da carcaça em ovinos e caprinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.19 n.2, 2016.
- NADA, S. M.; ABBAS, B.K.; ISHAK, M.A.; SULAIMAN, B.K. Detection of polymorphism in *BMPR-1B* gene associated with litter size in Awassi sheep ewes using PCR-RFLP method. **Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation**, v.2, n.1, p.90-94, 2014.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) – GenBank. Disponível em: <<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: 14 mar. 2018.
- NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M. **Testosterone**: action, deficiency, substitution. United Kingdom: Cambridge University Press, 2012. p.15.

- OJEDA, D.B. Participação do melhoramento genético na produção ovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.2, p.146-149, 1999.
- PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 2005. 118p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- PAIVA, S. R.; SILVÉRIO, V. C.; EGITO, A. A.; MCMANUS, C.; FARIA, D. A.; MARIANTE, A. S.; CASTRO, S. R. ALBUQUERQUE, M. S. M. DERGAM, J. A. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.9, p.887-893, 2005.
- PEREIRA NETO, O. A. Gerenciamento e capacitação da cadeia da ovinocultura. In: (Org.) **Práticas em ovinocultura: ferramentas para o sucesso**. Porto Alegre: SENAR/RS, 2004. p. 1-8.
- PEREIRA, G. L.; ROSA, K. O.; CURTI, R. A.; REGITANO, L. C. A.; MOTA, M. D. S. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. **Ars Veterinaria**, v.29, n.3, p.190-199, 2013.
- PINHEIRO, R. S. B.; JORGE, A. M.; YOKOO, M. J. Correlações entre medidas determinadas *in vivo* por ultrassom e na carcaça de ovelhas de descarte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.1161-1167, 2010.
- PRAVEENA, K.; RAMANA, D. B. V.; PANKAJ, P. K. Booroola gene (*Fec B*) polymorphism and its liaison with litter size in indigenous sheep breeds of Telangana, India. **Journal of Animal Research**, v.7, n.2, p. 227-231, 2017.
- PUIG-OLIVERAS, A.; REVILLA, M., CASTELLÓ, A.; FERNÁNDEZ, A. I.; FOLCH, J. M.; BALLESTER, M. Expression-based GWAS identifies variants, gene interactions and key regulators affecting intramuscular fatty acid content and composition in porcine meat. **Scientific Reports**, v. 6, p.31803, 2016.
- RANDHAWA, I. A.; KHATKAR, M. S.; THOMSON, P. C.; RAADSMA, H. W. Composite selection signals for complex traits exemplified through bovine stature using multibreed cohorts of European and African *Bos taurus*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.5, n.7, p.1391-1401, 2015.
- RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In: MAGDELDIN, S. (Ed.) **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p.315-334.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
- REGO NETO, A. A.; SARMENTO, J. L. R.; SANTOS, N. P. S.; BIAGIOTTI, D.; SANTOS, G. V.; CAMPELO, J. E. G.; SENA, L. S.; FIGUEIREDO-FILHO, L. A. S. Estrutura e distribuição geográfica do rebanho de ovinos Santa Inês no Estado do Piauí. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.2, p.272-280, 2014.
- REGO NETO, A. A.; SARMENTO, J. L. R.; SANTOS, N. P. S.; CAMPELO, J. E. G.; SENA, L. S.; BIAGIOTTI, D.; SANTOS, G. V. Population genetic structure of Santa Inês sheep in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n.3, p. 503-508, 2018.

- RESENDE, M. D. V.; PEREZ, J. R. H. R. Melhoramento animal: predição de valores genéticos pelo modelo animal – BLUP em bovinos de leite, bovinos de corte, ovinos e suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.4, n.1, p.17-29, 1999
- ROCHUS, C. M.; TORTEREAU, F.; PLISSON-PETIT, F.; RESTOUX, G.; MORENO-ROMIEUX, C.; TOSSER-KLOPP, G.; SERVIN, B. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. **BMC Genomics**, v.19, n.1, p.71, 2018.
- RODEN, J. A.; MERRELL, B. G.; MURRAY, W. A.; HARESIGN, W. Genetic analysis of live weight and ultrasonic fat and muscle traits in a hill sheep flock undergoing breed improvement utilizing an embryo transfer programme. **Animal Science**, v.76, p367-373, 2003.
- RUIZ-LARRAÑAGA, O.; LANGA, J.; RENDO, F.; MANZANO, C.; IRIONDO, M.; ESTONBA, A. Genomic selection signatures in sheep from the Western Pyrenees. **Genetics Selection Evolution**, v.50, n.1, p.9, 2018.
- SAHANA, G.; HÖGLUND, J. K.; GULDBRANDTSEN, B.; LUND, M. S. Loci associated with adult stature also affect calf birth survival in cattle. **BMC Genetics**, v.16, n.1, p.47, 2015.
- SANTIAGO, G. G.; SIQUEIRA, F.; CARDOSO, F. F.; REGITANO, L. C. A.; VENTURA, R.; SOLLERO B. P.; SOUZA JÚNIOR, M. D.; MOKRY, F. B.; FERREIRA, A. B. R.; TORRES JÚNIOR, R. A. A. Genomewide association study for production and meat quality traits in Canchim beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.95, n.8, p.3381-3390, 2017.
- SANTOS, B. F.; MCHUGH, N.; BYRNE, T. J.; BERRY, D. P.; AMER, P. R. Comparison of breeding objectives across countries with application to sheep indexes in New Zealand and Ireland. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.132, n.2, p.144-54, 2015.
- SAS. Statistical Analysis System Institute. **SAS user's guide**. Statistic. Cary, NC: SAS Institute INC., 2008.
- SETOGUCHI, K.; FURUTA, M.; HIRANO, T.; NAGAO, T.; WATANABE, T.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in *NCAPG* as a positional candidate. **BMC Genetics**, v.10, n.43, 2009.
- SETOGUCHI, K.; WATANABE, T.; WEIKARD, R.; ALBRECH, E.; KÜHN, C.; KINOSHITA, A.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. The SNP c.1326T>G in the non-SMC condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene encoding a p.Ile442Met variant is associated with an increase in body frame size at puberty in cattle. **Animal Genetics**, v.42, p.650-655, 2011.
- SEVANE, N.; DUNNER, S.; BOADO, A.; CAÑÓN, J. Polymorphisms in ten candidate genes are associated with conformational and locomotive traits in Spanish Purebred horses. **Journal of Applied Genetics**, v.58, n.3, p.355-361, 2017.
- SHAW, G. Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs). **BJU International**, v. 112, p. 664-665, 2013.
- SIDER, L. H.; ZAROS, L. G. **A biologia avançada e o impacto da genômica na produção de caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008.

SILVA, F. F. Utilização da Genômica na Seleção de suínos. In: **XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**. Santa Maria-RS, 2015.

SOUSA, B. B.; BENICIO, A. W. A.; BENICIO, T. M. A. Caprinos e ovinos adaptados aos trópicos. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.3, n.2, p.42-50, 2015.

SOUSA, W.H.; LÔBO, R.N.B.; MORAIS, O.R. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas. In: **II Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**. João Pessoa. Anais...João Pessoa: EMEPA, 2003. CD ROM.

STAIGER, E. A.; AL ABRI, M. A.; PFLUG, K. M.; KALLA, S. E.; AINSWORTH, D. M.; MILLER, D.; RAUDSEPP, T.; SUTTER, N. B.; BROOKS, S. A. Skeletal variation in Tennessee Walking Horses maps to the *LCORL/NCAPG* gene region. **Physiological Genomics**, v.48, p.325–335, 2016.

SULAK, M.; FONG, L.; MIKA, K.; CHIGURUPATI, S.; YON, L.; MONGAN, N. P.; EMES, R. D.; LYNCH, V. J. TP53 copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. **eLife**, v.5, 2016.

TONG, B.; MURAMATSU, Y.; FUKU, N.; HIMIZU, Y.; KATOU, H.; OHTA, T.; KOSE, H.; YAMADA, T. Allele frequency distribution of the *NCAPG* c.1326 T>G SNP associated with growth-related traits in Niigata population of Japanese Black beef cattle. **Open Journal of Animal Sciences**, v.6, p.202-206, 2016.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.1, p.1-5, 2013.

TOZAKI, T.; KIKUCHI, M.; KAKOI, H.; HIROTA, K. I.; NAGATA, S. I. A genome-wide association study for body weight in Japanese Thoroughbred racehorses clarifies candidate regions on chromosomes 3, 9, 15, and 18. **Journal of Equine Science**, v.28, n.4, p.127-134, 2017.

VAN DER VALK, R. J. P. et al. A novel common variant in *DCST2* is associated with length in early life and height in adulthood. **Human Molecular Genetics**, v.24, n.4, p. 1155-1168, 2014.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.4, n.12, 2008.

VIANA, J. G. A.; MORAES, M. R. E.; DORNELES, J. P. Dinâmica das importações de carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.36, n.3, p. 2223-2234, 2015.

WEIKARD, R.; ALTMAIER, E.; SUHRE, K.; WEINBERGER, K. M.; HAMMON, H. M.; ALBRECHT, E.; SETOGUCHI, K. TAKASUGA, A.; KÜHN, C. Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus* growth and lipid deposition. **Physiological Genomics**, v.42A, n.2, p.79-88, 2010.

ZEDER, M. A. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: origins, diffusion, and impact. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v.105, n.33, p.11597-604, 2008.

ANEXO

Manuscrito a ser submetido à revista PeerJ (**Polimorfismo no gene *LCORL* associado a medidas corporais e de carcaça em ovinos Santa Inês**)

1 Polimorfismo no gene *LCORL* associado a medidas corporais e de carcaça em ovinos

2 Santa Inês

3 Manoel Braz da Silva Júnior¹, José Lindenberg Rocha Sarmiento², André Felipe Barbosa Coelho
4 de Resende³, Milena Maria Galeno Patrício Rodrigues⁴, Luciano Silva Sena⁵, Fábio Barros
5 Britto⁶

6 ¹Diretoria de Desenvolvimento Educacional, Instituto Federal de Educação, Ciência e
7 Tecnologia do Maranhão, São João dos Patos, Maranhão, Brasil.

8 ²Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí,
9 Campus Socopo, Teresina, Piauí, Brasil.

10 ³Discente do curso de Graduação em Biologia, Centro de
11 Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Campus Campus Ministro Petrônio
12 Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

13 ⁴Discente do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Centro de
14 Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Socopo, Teresina, Piauí, Brasil.

15 Discente do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de
16 Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Socopo, Teresina, Piauí, Brasil.

17 ⁶Centro de Ciências da Natureza, Campus Ministro Petrônio Portella, Universidade Federal do
18 Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

19 Autor correspondente:

20 Fábio Britto¹

21 Endereço de e-mail: fbbritto@ufpi.edu.br

22 Resumo

23 No Brasil, a demanda por carne ovina é superior à sua produção, levando à necessidade de
24 importação desse produto. Uma das raças de corte mais criadas no país, Santa Inês, tem sofrido
25 seleção dos criadores objetivando principalmente melhorias estéticas, em detrimento de
26 características de produtividade. O objetivo deste trabalho foi associar polimorfismos do tipo
27 SNP em sequência do gene *LCORL* com medidas corporais e de desenvolvimento de carcaça
28 em ovinos. Foram coletadas informações de área, comprimento e profundidade de olho de
29 lombo, altura da garupa, comprimento corporal, circunferência torácica, altura da cernelha,
30 altura da pata, profundidade torácica e comprimento da garupa em 293 animais de ambos os
31 sexos. Foram utilizadas análises de regressão para associar os polimorfismos presentes aos
32 fenótipos dos animais amostrados. O SNP g.149731A>G do gene *LCORL* está localizado no
33 sítio de restrição da enzima *BsrI*, a qual pôde ser utilizada para genotipar as variáveis alélicas
34 Adenina (A) e Guanina (G). Os resultados mostraram que esse SNP é uma mutação não
35 sinônima que causa a substituição do aminoácido Serina, na posição 417, por uma Glicina no
36 peptídeo codificado. As análises estatísticas indicaram que as variáveis genotípicas (AA, AG e
37 GG) estão significativamente associadas a medidas de tamanho corporal e de qualidade de
38 carcaça em ovinos da raça Santa Inês. As medias de área, comprimento e profundidade de olho
39 de lombo, altura da garupa, comprimento corporal e circunferência torácica apresentaram

40 diferenças significativas para os diferentes genótipos, sendo GG o associado com o maior
41 desenvolvimento corporal e de carcaça, embora o mesmo tenha aparecido em menor frequência
42 ($f_{(GG)} = 0,018$). Este fato mostra que não tem havido pressão seletiva sobre o gene *LCORL*,
43 argumento que sustenta pelo fato de *locus* encontrar-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg na
44 população estudada.

45 **Palavras-chave:** *LCORL*, tamanho corporal, carcaça, PCR-RFLP

46 1. Introdução

47 Atualmente os ovinos são criados pelo mundo inteiro. De acordo com a FAO (2016) o
48 rebanho mundial de ovinos era de mais de 1,2 bilhões de cabeças em 2014, apresentando um
49 crescimento anual da ordem de 1,5% nos cinco anos antecessores, enquanto o acréscimo na
50 produção de carne não acompanhou o mesmo ritmo, ficando em 0,6% no mesmo período.

51 O Brasil possuía um rebanho de mais de 18,4 milhões de cabeças de ovinos em 2016 de
52 acordo com a Pesquisa da Produção da Pecuária Municipal, sendo a região Nordeste
53 responsável por 63,0% do efetivo nacional e o estado do Piauí, com cerca de 1,2 milhões de
54 cabeças, é o sexto maior rebanho do país (IBGE, 2017). No entanto, a produção nacional de
55 carne é insuficiente para o abastecimento do mercado interno, o que leva a necessidade de
56 importação de carne, vinda principalmente do Uruguai (Viana, Moraes & Dorneles, 2015). Em
57 2016, o Brasil importou mais de 6,3 mil toneladas de carne ovina *in natura*, o que representa
58 aproximadamente 37,5 milhões de dólares (AGROSTAT/MAPA).

59 As raças mais populares no país são Dorper e Santa Inês (Mcmanus, Paiva & Araújo,
60 2010). Porém a seleção praticada nos ovinos Santa Inês preocupou-se apenas com a
61 padronização da raça, baseando-se principalmente em caracteres morfológicos, em detrimento
62 das características de produção (Carneiro et al., 2006). Dessa maneira, é importante a realização
63 de investigações que levem ao descobrimento de marcadores genéticos associados a
64 características de produtividade que possam ser utilizados em programas de melhoramento por
65 meio da seleção assistida por marcadores (SAM).

66 O gene *LCORL* tem se mostrado um marcador promissor associado a características de
67 tamanho corporal e qualidade carcaça em diferentes espécies de animais. Em cavalos da raça
68 Tennessee Walking, foram encontrados polimorfismos neste gene que possuem significativa
69 associação com medidas corporais (Staiger et al., 2016). Estudos recentes com bovinos também
70 apontam significativa associação entre polimorfismos na cadeia de *LCORL* e em regiões
71 próximas, em desequilíbrio de ligação, com crescimento e medidas de carcaça. Por meio de
72 PCR-RFLP, duas variantes em regiões de íntrons e quatro na região promotora desse gene
73 foram identificadas, mostrando-se significativamente associadas ao peso dos animais e da

74 carcaça em bovinos Qinchuan em idade de abate (Han et al., 2017). O gene *LCORL* tem
75 demonstrado efeito pleiotrópico, onde alelos desses genes estão associados à altura, ganho de
76 peso e espessura reduzida da gordura subcutânea em diferentes espécies (Hoshiba et al., 2013;
77 Lindholm-Perry et al., 2011; Setoguchi et al., 2009; Weikard et al., 2010).

78 Assim, esse trabalho objetivou associar polimorfismos do tipo SNP na sequência do
79 gene *LCORL* com dados fenotípicos de tamanho corporal e de carcaça em ovinos de corte da
80 Raça Santa Inês dos estados de Piauí e Maranhão. As análises também levaram em consideração
81 o emprego da genotipagem por PCR-RFLP, tentando estabelecer um protocolo acessível,
82 prático e rápido, para ser utilizado em práticas de seleção assistida.

83 **2. Material e Métodos**

84 *2.1 Amostragem*

85 Nessa pesquisa foram utilizados 293 ovinos adultos de ambos os sexos, provenientes de
86 seis criatórios dos estados do Piauí e Maranhão e registrados junto à Associação Brasileira dos
87 Criadores de Ovinos (ARCO). Foram analisadas características relacionadas ao
88 desenvolvimento de carcaça e tamanho, sendo: área de olho de lombo (AOL) comprimento de
89 olho de lombo (COL) profundidade de olho de lombo (POL), altura da garupa (AG),
90 comprimento corporal (CC), circunferência torácica (CT), altura da cernelha (AC), altura da
91 pata (AP), profundidade torácica (PT) e comprimento da garupa (CGA). As medidas de área,
92 comprimento e profundidade de olho de lombo, que mensuram o músculo *longissimus dorsi*,
93 foram obtidas *in vivo* por ultrassom.

94 *2.2 Extração de DNA*

95 Amostras de 4,0 ml de sangue de cada animal foram coletadas para realização das
96 análises moleculares. O sangue utilizado foi coletado da veia jugular após a realização da
97 antisepsia do local (álcool iodado), com auxílio de agulha acoplada diretamente em tubos à
98 vácuo contendo anticoagulante EDTA, sendo os tubos armazenados em caixa térmica com gelo
99 e, posteriormente, estocados em freezer a -20°C, no Laboratório de Biologia Molecular do
100 Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí.

101 As amostras coletadas e utilizadas para realização do trabalho fazem parte de projetos
102 de pesquisa os qual já foram submetido e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais
103 (CEUA) da UFPI: “Análise de polimorfismos de nucleotídeo único para infecção por
104 endoparasitas em ovino da raça Santa Inês”, sob o número 24/13; e “Estudo genômico aplicado

105 ao melhoramento genético de ovinos Santa Inês para características de carcaça”, número
106 340/17.

107 O DNA foi extraído com o Kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Hilden, Germany)
108 segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. A qualidade da extração foi verificada através
109 de eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5× por 60 minutos a 90V, corado
110 em brometo de etídio e registrado sob luz ultravioleta em fotodocumentador (*L-PIX Loccus*
111 *Biotechnologia*) e o DNA quantificado em NanoDrop™ 2000 (*Thermo Scientific*) e estocado em
112 freezer a -20°C.

113 2.4 Amplificação e genotipagem via PCR-RFLP

114 Para a identificação do polimorfismo, utilizamos a sequência de *LCORL* de *Ovis aries*
115 obtida no NCBI (>NC_019463.2), com o auxílio de informações de mapa disponíveis no site
116 da Illumina (<https://support.illumina.com/downloads/ovinesnp50-v1-0.html>).

117 Para a obtenção dos fragmentos contendo o polimorfismo em *LCORL*, utilizamos o
118 programa GeneRunner, versão 6.3.0.3 (Hastings Software, Inc, N.Y. -
119 <http://www.generunner.com>) para a confecção dos *primers* flanqueando a região do SNP,
120 estabelecendo-se um limite de aproximadamente 500 pb para o amplicon gerado. As sequências
121 de *primers* obtidas seguem os seguintes parâmetros: T_m variando entre 47 e 65°C; diferença de
122 T_m entre os *primers* de no máximo 2°C; conteúdo GC (%) entre 38 a 60% e comprimento do
123 *primer* de 18 a 22 bases.

124 Foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo único na sequência de *LCORL* g.
125 149731A>G (CCATCAAACCAGTTCCAATTC) situado exatamente no sítio de restrição da
126 enzima *BsrI*, a qual foi utilizada para a genotipagem dos animais.

127 Os *primers* desenhados para a amplificação dessa região de polimorfismo foram: 5’
128 TTGATACTGCTTTGGGAACCAC 3’ (*forward*) e 5’ AACCCAGTAACCCTGCATTCC 3’
129 (*reverse*), com T_m de 53°C e 54°C, respectivamente. O amplicon gerado foi de 445 pb.

130 As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 0,5 µM de cada *primer*, 1× de tampão
131 QuatroG, 0,5 U de Taq DNA-Polimerase QuatroG, 200 µM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl₂.
132 PCR *touchdown*: 95°C por 7 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, temperatura de anelamento
133 começando a 59°C, decrescendo 0,5°C a cada ciclo durante 6 ciclos e 57°C nos 24 ciclos
134 seguintes por 60 s, extensão a 72°C por 60 s e extensão final a 72°C por 7 min.

135 Para a genotipagem do SNP g.149731A>G do gene *LCORL* utilizamos uma alíquota de
136 5 µl (~ 2300 ng de DNA amplificado) do produto de PCR para 0,1 µl da enzima *BsrI* e 1 µl de
137 tampão 1×, de modo a perfazer um volume total de 10 µl por amostra. As amostras foram

138 incubadas a 65°C por 10 min para digestão dos fragmentos de DNA, seguido de desnaturação
139 enzimática a 80°C por 20 min em termociclador *Applied Biosystems*®, de acordo com o
140 protocolo do fabricante da enzima, *New England Biolabs*®. Através desse método, os
141 fragmentos de 445 pb amplificados por PCR, foram digeridos por *BsrI* em dois fragmentos
142 contendo 328 e 117 pb nos animais com o alelo **A**, mas não nos que possuíam o alelo **G**. Dessa
143 forma, os homozigotos **GG**, os homozigotos **AA** e os heterozigotos **AG** produziram,
144 respectivamente, uma banda (445 pb), duas bandas (328 e 117 pb) e três bandas (445, 328 e
145 117 pb) (Figura 1).

146 2.5 Análise estatística

147 Para as informações moleculares, foi determinada a ocorrência do equilíbrio de Hardy-
148 Weinberg no locus *LCORL*. Desvios significativos foram avaliadas com o nível de
149 significância a 0,05 utilizando o teste exato de Fisher, implementado na função “fisher.test” do
150 programa R (R Development Core Team, 2018).

151 Após a obtenção dos dados fenotípicos, as medidas foram plotadas em planilha, onde
152 foi verificada a normalidade dos dados utilizando-se o programa Excel 2013, utilizando-se a
153 função (=distnormp.n). Também avaliamos as estimativas de variância e desvio padrão de cada
154 variável envolvida no estudo.

155 Para a análise de associação entre os dados genotípicos e fenotípicos foi considerado
156 um modelo estatístico que incluiu os efeitos de fazenda e do genótipo do SNP como covariável
157 (efeito linear) e o erro associado a cada observação como efeito aleatório, utilizando-se o
158 procedimento MIXED do programa SAS (Versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA): Y_{ij}
159 = $\mu + F_i + SNP_j + e_{ij}$. Onde Y_{ij} foi a característica observada (AOL, COL, POL, AG, CC, CT,
160 AC, AP, PT e CGA); μ foi a média dessa característica; F_i foi o efeito de fazenda de criação do
161 animal; SNP_j foi o efeito fixo do genótipo do j -ésimo SNP (AA, AG ou GG, o qual foi
162 recodificado, na mesma ordem, para 2, 1 e 0); e e_{ij} foi o efeito aleatório associado resíduo com
163 média zero e variância σ^2 . A significância foi declarada a $P < 0,05$.

164 3. Resultados

165 O gene *LCORL* em ovinos apresenta sete éxons, estando o SNP g.149731A>G
166 posicionado no último. Por meio da análise das sequências de nucleotídeos do éxon e da
167 sequência de aminoácidos da isoforma X1 do polipeptídeo traduzido, foi identificada a posição
168 e o aminoácido alternativo na cadeia proteica. De acordo com as informações do

169 posicionamento deste nucleotídeo, foi constatado que o mesmo se posicionou como primeira
 170 base do códon 417 do RNAm transcrito. Portanto, o SNP *g.149731A>G* é uma mutação não
 171 sinônima, que causa substituição do aminoácido serina (codificado pela trinca AGT) por uma
 172 glicina (codificada por GGT).

173

174

175

176

177

178

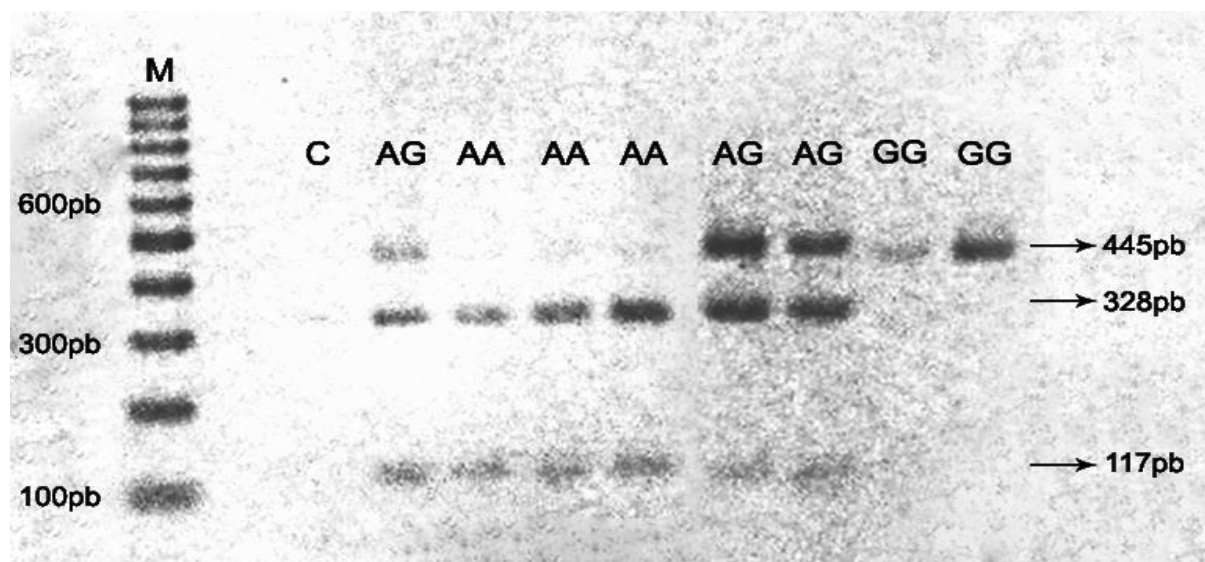
179

180

181

182

183



184

185

Figura 1. Digestão do *amplicom* de 445 pb do gene *LCORL* de ovinos Santa Inês com a enzima *BsrI*. (M) marcador de tamanho molecular, (C) controle negativo. Genótipos GG: banda com 445 pb; AG: bandas com 445 pb, 328 pb e 117 pb; AA: bandas com 328 pb e 117 pb.

186

187

188

189

190

191

192

193

Após a genotipagem de todos os animais, os resultados mostraram que a variável alélica **G** apresenta frequência baixa nos rebanhos analisados nesse estudo (0,089), em comparação ao alelo **A** (0,911). Estes valores foram obtidos após a análise das frequências genotípicas observadas (Tabela 1). Foi ainda constatado que os números observados de genótipos encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,41$), havendo pouca variação quando os mesmos foram comparados aos valores esperados (Tabela 1). Devido à baixa frequência do alelo G, o genótipo GG também apresentou-se como o menos frequente, sendo observado apenas 5 animais entre os 276 animais genotipados.

194

195

Tabela 1 - Frequência observadas e esperadas para os genótipos do SNP *g.149731A>G* no gene *LCORL* em ovinos Santa Inês de fazendas do Piauí e Maranhão

Genótipo	Nº de animais	Frequência obs.	Frequência esp.	Nº esp. de animais
AA	232	0,840	0,830	229,17
AG	39	0,141	0,162	44,65
GG	5	0,018	0,008	2,17

196

197 Os genótipos obtidos foram, então, correlacionados com as informações fenotípicas. Os
 198 valores de médias das medidas avaliadas mostram que o genótipo GG apresenta melhor
 199 desempenho em características de qualidade carcaça e de tamanho corporal dos animais. No
 200 entanto, a associação do SNP com as medidas de carcaça foram mais significativas do que com
 201 as características de tamanho (Tabela 2).

202 **Tabela 2** - Médias das medidas corporais e de carcaça e efeito de substituição alélica (β)
 203 calculados para os ovinos Santa Inês amostrados seis propriedades localizadas nos estados do
 204 Piauí e Maranhão.

Características	Pvalor	Genótipos			Beta(β)
		AA	AG	GG	
AOL	0,0296*	8,801±2,847	10,021±2,941	10,512±2,015	-0,771
COL	0,0177*	4,420±0,663	4,709±0,672	4,944±0,373	-0,192
POL	0,0028*	2,408±0,451	2,750±1,117	2,644±0,413	-0,244
AG	0,0193*	75,362±3,082	76,923±3,765	76,600±2,702	-0,978
CC	0,0017*	72,733±4,949	73,923±6,702	74,600±6,066	-2,155
CT	0,0104*	90,099±7,714	93,269±8,238	90,600±10,040	-2,448
AC	0,3027	74,647±3,819	76,513±4,520	74,800±2,280	-0,569
AP	0,0842	40,121±2,959	41,308±3,012	41,000±2,121	-0,755
PT	0,6857	34,526±3,257	35,205±3,684	33,800±2,588	0,185
CGA	0,3038	20,739±3,392	21,987±3,463	22,800±2,387	-0,362

AOL, Área de olho de lombo (cm²); COL, Comprimento de olho de lombo (cm); POL, Profundidade de olho de lombo (cm); AG, Altura da garupa (cm); CC, Comprimento corporal (cm); CT, Circunferência torácica (cm); AC, Altura da cernelha (cm); AP, Altura da pata (cm); PT, Profundidade torácica (cm); CGA, Comprimento da garupa (cm). (*) medidas com valores de média significativamente diferentes para cada genótipo ($P < 0,05$).

205 Das dez medidas corporais e de carcaça analisadas neste trabalho, seis mostraram
 206 significativa diferença entre as médias de cada genótipo utilizando-se o método de estimativa
 207 REML para $P < 0,05$. As três medidas de qualidade de carcaça (AOL, COL e POL) e três
 208 medidas de tamanho corporal (AG, CC e CT) tiveram efeito significativo para substituição
 209 alélica, tendo o genótipo de frequência mais baixa, GG, apresentado maiores médias para essas
 210 características.

211 4. Discussão

212 A substituição de uma serina por uma glicina pode causar algum tipo de alteração
 213 conformacional na proteína codificada por *LCORL*, uma vez que serina apresenta uma cadeia

214 lateral polar (-OH), enquanto a glicina é classificada como um aminoácido de cadeia lateral
215 apolar, pois seu radical é formado apenas por um átomo de hidrogênio e a ligação C-H é apolar
216 (Campbell, 2000).

217 A região do gene *LCORL* está associada a características de crescimento e altura em
218 ovinos (Al-Mamun et al., 2015; Matika et al., 2016). Tanto que nessa região, um outro gene,
219 *NCAPG*, também tem se mostrado associado a essas características corporais, sendo difícil
220 identificar qual dos genes é mais efetivamente responsável por essas variações, uma vez que a
221 região onde se localizam apresenta elevado desequilíbrio de ligação (Rochus et al., 2018).
222 Estudos mostram que esse QTL vem sofrendo seleção em ovinos, tanto de raças produtoras de
223 leite quanto de carne, estando relacionados a ambas as características (Rochus et al., 2018;
224 Ruiz-Larrañaga et al., 2018). Porém, é sabido que variações na sequência de *LCORL* afeta
225 características como comprimento e peso ao nascer e altura em mamíferos adultos, inclusive
226 humanos (Van Der Valk et al., 2014).

227 Mesmo variações em regiões intrônicas mostraram influenciar significativamente
228 características de tamanho ao nascer, bem como tamanho e estrutural corporal em bovinos
229 adultos de raças de corte europeias (Sahana et al., 2015).

230 Han et al. (2017) identificou significativo efeito da substituição alélica em um SNP na
231 região de íntron do gene *LCORL* para peso de carcaça em bovinos da raça Qinchuan, sugerindo
232 que o gene é um forte candidato a marcador para seleção assistida para qualidade de carcaça
233 para essa raça. De modo similar, com base nos resultados significativos encontrados para
234 médias de carcaça, sugeriremos a utilização do SNP g.149731A>G como marcador de seleção
235 para o melhoramento de ovinos Santa Inês.

236 A área de olho de lombo (AOL), por exemplo, é uma importante medida para
237 mensuração da composição corporal em ovinos, uma vez que apresenta alta e positiva
238 correlação com a distribuição de músculos na carcaça (Mcmanus et al., 2013). Segundo Dode
239 et al. (1986), quando comparados animais de mesma idade, aqueles com maior área de músculo
240 *longissimus dorsi*, apresentam maior desenvolvimento muscular na carcaça. AOL em ovinos
241 adultos representam o índice de maior confiabilidade do desenvolvimento e tamanho do tecido
242 muscular (Moreno & Boaventura Neto, 2016). Neste trabalho foi encontrado significativo efeito
243 da substituição alélica ($P < 0,0296$) sobre as medidas de área de olho de lombo para o SNP
244 analisado.

245 Área de olho de lombo apresenta correlação positiva com as medidas de comprimento
246 e profundidade do músculo *longissimus dorsi*, sendo medidas que podem ser utilizadas na

247 avaliação de características da carcaça de ovinos em função de sua precisão (Pinheiro, Jorge &
248 Yokoo; 2010).

249 Através de análises de associação genômica ampla, SNPs do gene *LCORL* mostraram-
250 se significativamente associados com medidas de área de olho de lombo em bovinos de corte
251 da raça Canchim (Santiago et al., 2017). Esses resultados confirmam que os polimorfismos no
252 gene *LCORL* implicam diretamente na qualidade de carcaça tanto em bovinos quanto em
253 ovinos.

254 Apesar do efeito significativo sobre medidas de qualidade de carcaça, o fato do genótipo
255 GG para SNP analisado apresentar frequência baixa nos rebanhos analisados pode indicar que
256 os ovinos da raça Santa Inês vêm sofrendo pressões seletivas que buscam apenas melhorias
257 estéticas com vistas a animais de exposição, em detrimento de características que podem
258 aumentar a produtividade desses animais (Carneiro et al., 2006). Uma possível explicação para
259 a baixa frequência desse genótipo nos ovinos de corte, é que outros genes não ligados ao
260 *LCORL* e com maior efeito sobre medidas de tamanho corporal estejam sendo selecionados
261 com maior intensidade. Porém, mais estudos devem ser realizados para a confirmação dessa
262 hipótese.

263 Tong et al. (2016) encontraram resultados semelhantes aos nossos estudando
264 polimorfismos na sequência do gene *NCAPG*, em bovinos da raça Japanese Black. O genótipo
265 com melhores médias para características de qualidade de carcaça como área e espessura de
266 olho de lombo e marmoreio da carne (GG), apareceu em frequência consideravelmente baixa
267 (0,06), enquanto os genótipos de pior desempenho (GT e TT) aparecem em frequência bem
268 mais elevada (0,403 e 0,537, respectivamente). Esses dados, de maneira análoga aos
269 encontrados neste trabalho, mostram que a seleção artificial promovida pelos criadores, pode,
270 em alguns casos, levar a diminuição da frequência de genótipos que estão associados a
271 características de melhor rendimento na produção de carne.

272 Outra característica que demonstra que a seleção pode não ser direcionada
273 especificamente para o gene *LCORL* é o fato do mesmo apresentar-se em equilíbrio de Hardy-
274 Weinberg no estudo realizado. Como uma das premissas do equilíbrio é justamente a ausência
275 de seleção, podemos inferir que a distribuição dos alelos ocorre de forma aleatória na população
276 estudada e sua frequência é explicada apenas pelo próprio processo mendeliano de segregação
277 e distribuição aleatória de gametas. Assim, pelo menos em caráter experimental, o gene *LCORL*
278 poderia ser priorizado em estratégias de melhoramento assistida por marcadores, para testar os
279 efeitos do aumento da frequência do alelo G na população de ovinos Santa Inês.

280 Avaliar a qualidade da carcaça animal beneficia a todos os envolvidos na cadeia de
281 produção e consumo de produtos cárneos. O produtor conseguirá melhor preço e maior
282 produtividade, a indústria aumentará o rendimento e o consumidor, por sua vez, terá acesso a
283 cortes com melhor nível de qualidade (Arévalo et al., 1997). No aspecto da produção, a carcaça
284 é o elemento mais importante do animal, pois representa a maior porção comestível do corpo
285 e, dessa forma, o objetivo comercial mais rentável (Geraldo et al., 2017).

286 Pesquisas recentes com outras espécies de mamíferos mostram resultados semelhantes
287 aos encontrados neste trabalho ao avaliar características de tamanho corporal. Em regiões
288 próximas ao gene *LCORL* de cavalos puro-sangue espanhol foi encontrado efeito significativo
289 da substituição alélica nos SNPs avaliados associados a medidas de altura e comprimento
290 corporal dos animais (Sevane et al., 2017). Além disto, foi verificado que este mesmo
291 polimorfismo afeta diretamente os níveis de expressão de *LCORL* (Metzge et al, 2013). O efeito
292 dessa variação se manifesta diretamente na altura de cavalos de diferentes raças. Os pôneis, por
293 exemplo, apresentam uma frequência próxima de 1 para o genótipo que confere os menores
294 níveis de expressão de *LCORL*.

295 Dentre as medidas de tamanho corporal avaliadas nesse trabalho, o comprimento
296 corporal (CC) foi a que mostrou o mais significativo efeito de substituição alélica ($P=0,0017$).
297 Similarmente as medidas de carcaça, o genótipo com maiores valores de médias foi o de menos
298 frequência nos rebanhos analisados (GG). Resultados semelhantes foram encontrados em
299 bovinos Chinese Qinchuan no gene *NCAPG*, que apresenta forte desequilíbrio de ligação com
300 o gene *LCORL* e teve polimorfismo associados com medidas de comprimento corporal (Liu et
301 al., 2015). O genótipo que com maiores valores de média de comprimento corporal (151,42 cm)
302 também foi o de menor frequência nos rebanhos amostrados (0,123). Os genótipos com
303 menores médias (146.69 cm e 139.22cm) aparecem em frequências significativamente mais
304 elevadas (0,470 e 0,404, respectivamente). Mais uma vez os dados vêm corroborar que a seleção
305 realizada em rebanhos de corte pode não estar priorizando os melhores genótipos para as
306 características importantes para a produção de carne. Além do mais, esses achados vêm reforçar
307 a importância da SAM no melhoramento genéticos dos diferentes rebanhos.

308 Como já mencionado anteriormente, o gene *LCORL* demonstra efeito pleiotrópico
309 afetando diferentes características de tamanho e composição de carcaça em mamíferos
310 (Lindholm-Perry et al., 2011). Esse gene também tem sido reportado como codificador de um
311 fator de transcrição associado ao processo de espermatogênese em bovinos e equinos (Chung,
312 Szyda & Fraszczak, 2016; Tozaki et al., 2017). Isso pode ser um indício de que o gene *LCORL*
313 tenha alguma relação com a produção de hormônios andrógenos em mamíferos. Esses

314 hormônios, produzidos pelos testículos e, em menor quantidade, pelos ovários de mamíferos
315 têm, entre outros, papel nos processos de espermatogênese e aumento de massa muscular
316 (Nieschlag & Behre, 2012; Moreira, 2015).

317 Os níveis de testosterona, por exemplo, afetam diretamente a composição da carcaça em
318 ovinos. A proporção de gordura nesses pequenos ruminantes é menor nos machos não
319 castrados, intermediária nos castrados e maior nas fêmeas. Já a deposição de músculo é maior
320 nos machos não castrados, intermediária nos castrados e menor nas fêmeas, já que a testosterona
321 aumenta o crescimento muscular (Cezar & Sousa, 2007).

322 5. Conclusão

323 O SNP 149.731_A>G do gene *LCORL*, que promove a substituição do aminoácido Ser-
324 417 por Gly-417 na proteína codificada, proporciona significativa diferença em medidas de
325 tamanho corporal e estrutura de carcaça em ovinos da raça Santa Inês e pode ser aplicado como
326 um marcador molecular com vistas ao uso em seleção assistida.

327 Nas amostras avaliadas, não foram encontradas evidências de pressão seletiva
328 ocasionada sobre o gene *LCORL* e, portanto, o mesmo pode ser indicado como alvo potencial
329 no melhoramento, visando o aumento da frequência do alelo G, o qual causa maior efeito nas
330 características de crescimento e carcaça dos animais da raça Santa Inês.

331

332

333

334 Referências

- 335 1. Al-Mamun HA, Kwan P, Clark SA, Ferdosi MH, Tellam R, Gondro C. 2015.
336 Genome-wide association study of body weight in Australian Merino sheep reveals an
337 orthologous region on OAR6 to human and bovine genomic regions affecting height
338 and weight. *Genetics Selection Evolution* 47(66) DOI: 10.1186/s12711-015-0142-4
339 2. Arévalo KBO, Jardim POC, Osório JCS, Pimentel MA, Lüder WE. 1997. Espessura
340 da gordura de cobertura e área do músculo *longissimus dorsi* no peso e composição
341 física de cortes do serrote. *Revista Brasileira de Agrociência* 3: 43-49 DOI:
342 10.18539/cast.v3i1.184
343 3. Campbell, M. K. 2000. *Bioquímica*. Tradução de Henrique Bunselmeyer Ferreira et al.
344 -3.ed.- Porto Alegre: Artimed, 305-307
345 4. Carneiro PLS, Malhado CHM, Azevêdo DMMR, Souza LGR, Silva DC, Alves AZ,
346 Campelo JEG, Costa Júnior GS. 2006. Estudo de populações de ovinos Santa Inês
347 utilizando técnicas de análise multivariada. *Revista Científica de Produção Animal*
348 8:40-50 DOI: 10.15528/404
349 5. Cezar MF, Sousa WH. 2007. *Carcaças ovinas e caprinas: obtenção, avaliação e*
350 *classificação*. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical.

- 351 6. Chung NC, Szyda J, Fraszczak M. 2016. Population Structure Analysis of Globally
352 Diverse Bull Genomes. *bioRxiv*: 059139 DOI: 10.1101/059139.
- 353 7. Dode MAN, Jardim POC, Osório JCS, Luder WE, Machado AA. 1986. Estimativas
354 dos principais cortes e da porção comestível da carcaça, em novilhos holandês.
355 *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 21(7): 771-776.
- 356 8. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. *FAOSTAT Product on live*
357 *animals*. 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>>. Acesso
358 em: 18 mar. 2018.
- 359 9. Geraldo AT, Quirino CR, Beltrame RT, Costa RLD. 2017. Avaliação de carcaça ovina
360 por tomografia computadorizada: Estado da Arte no Brasil e no mundo. *PUBVET* 11:
361 91-102 DOI: 10.22256/PUBVET.
- 362 10. Han YJ, Chen Y, Liu Y, Liu XL. 2017. Sequence variants of the *LCORL* gene and its
363 association with growth and carcass traits in Qinchuan cattle in China. *Journal of*
364 *Genetics* 96 DOI 10.1007/s12041-016-0732-0.
- 365 11. Hoshiba H, Setoguchi K, Watanabe T, Kinoshita A, Mizoshita K, Sugimoto Y,
366 Takasuga A. 2013. Comparison of the effects explained by variations in the bovine
367 *PLAG1* and *NCAPG* genes on daily body weight gain, linear skeletal measurements
368 and carcass traits in Japanese Black steers from a progeny testing program. *Animal*
369 *Science Journal* 84: 529-534, DOI: 10.1111/asj.12033.
- 370 12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. *Pesquisa da Produção da*
371 *Pecuária Municipal 2016 (PPM)*. 2017. Disponível em:
372 <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm>> Acesso em: 18 mar. 2018.
- 373 13. Kumar S, Stecher G, Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics
374 Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7):
375 1870-1874 DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- 376 14. Lindholm-Perry AK, Sexten AK, Kuehn LA; Smith TPL, King DA, Shackelford SD,
377 Wheeler TL, Ferrell CL, Jenkins TG, Snelling WM, Freetly HC. 2011. Association,
378 effects and validation of polymorphisms within the *NCAPG-LCORL* locus located on
379 BTA6 with feed intake, gain, meat and carcass traits in beef cattle. *BMC Genetics*
380 12(103) DOI: 10.1186/1471-2156-12-103.
- 381 15. Liu Y, Duan X, Chen S, He H, Liu X. 2015. *NCAPG* is differentially expressed during
382 *longissimus* muscle development and is associated with growth traits in Chinese
383 Qinchuan beef cattle. *Genetics and Molecular Biology* 38(4): 450-456, DOI:
384 10.1590/S1415-475738420140287.
- 385 16. Matika O, Riggio V, Anselme-Moizan M, LAW AS, Pong-Wong R, Archibald AL,
386 Bishop SC. 2016. Genome-wide association reveals QTL for growth, bone and in vivo
387 carcass traits as assessed by computed tomography in Scottish Blackface lambs.
388 *Genetics Selection Evolution* 48(11) DOI: 10.1186/s12711-016-0191-3.
- 389 17. Mcmanus C, Paim TP, Louvandini H, Dallago BSL, Dias LT, Teixeira RA. 2013.
390 Avaliação ultrassonográfica da qualidade de carcaça de ovinos Santa Inês. *Ciência*
391 *Animal Brasileira* 14 DOI: 10.5216/cab.v14i1.12336
- 392 18. Mcmanus C, Paiva SR, Araújo RO. 2010. Genetics and breeding of sheep in Brazil.
393 *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 236-246 DOI: 10.1590/S1516-
394 35982010001300026.
- 395 19. Metzger J, Schrimpf R, Philipp U, Distl O. 2013. Expression levels of *LCORL* are
396 associated with body size in horses. *PLoS One* 8(2): e56497 DOI:
397 10.1371/journal.pone.0056497.
- 398 20. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. *Estatísticas de*
399 *Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro - AGROSTAT*. 2016. Disponível em:
400 <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>> Acesso em: 12 jun. 2018.

- 401 21. Moreira, C. *Regulação Sistemas Reprodutores*. 2015. *Revista de Ciência Elementar*
402 3(3): 167 DOI: 10.24927/rce2015.167.
- 403 22. Moreno GMB, Boaventura Neto O. 2016. Avaliação e cortes da carcaça em ovinos e
404 caprinos. *Ciência Veterinária nos Trópicos* 19 (2).
- 405 23. National Center for Biotechnology Information (NCBI) – GenBank. Disponível em:
406 <<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: 14 mar. 2018.
- 407 24. Nieschlag E, Behre HM. 2012. *Testosterone: action, deficiency, substitution*. United
408 Kingdom: Cambridge University Press.
- 409 25. Pinheiro RSB, Jorge AM, Yokoo MJ. 2010. Correlações entre medidas determinadas
410 *in vivo* por ultrassom e na carcaça de ovelhas de descarte. *Revista Brasileira de*
411 *Zootecnia* 39(5): 1161-1167 DOI: 10.1590/S1516-35982010000500030.
- 412 26. R Development Core Team. 2018. *R: a language and environment for statistical*
413 *computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- 414 27. Rochus CM, Tortereau F, Plisson-Petit F, Restoux G, Moreno-Romieux C, Tossier-
415 Klopp G, Servin B. 2018. Revealing the selection history of adaptive loci using
416 genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC Genomics*
417 19: 71 DOI: 10.1186/s12864-018-4447-x.
- 418 28. Ruiz-Larrañaga O, Langa J, Rendo F, Manzano C, Iriondo, M, Estonba A. 2018.
419 Genomic selection signatures in sheep from the Western Pyrenees. *Genetics Selection*
420 *Evolution* 50: 9 DOI: 10.1186/s12711-018-0378-x.
- 421 29. Sahana G, Höglund JK, Guldbandsen B, Lund MS. 2015. Loci associated with adult
422 stature also affect calf birth survival in cattle. *BMC Genetics* 16: 47 DOI:
423 10.1186/s12863-015-0202-3.
- 424 30. Santiago GG, Siqueira F, Cardoso FF, Regitano LCA, Ventura R, Sollero BP, Souza
425 Júnior MD, Mokry FB, Ferreira ABR, Torres Júnior RAA. 2017. Genomewide
426 association study for production and meat quality traits in Canchim beef cattle.
427 *Journal of Animal Science* 95(8): 3381-3390 DOI: 10.2527/jas.2017.1570.
- 428 31. SAS. Statistical Analysis System Institute. 2008. *SAS user's guide*. Statistic. Cary,
429 NC: SAS Institute INC.
- 430 32. Sevane N, Dunner S, Boado A, Cañon J. 2017. Polymorphisms in ten candidate genes
431 are associated with conformational and locomotive traits in Spanish Purebred horses.
432 *Journal of Applied Genetics* 58(3): 355-361 DOI: 10.1007/s13353-016-0385-y.
- 433 33. Staiger EA, Al Abri MA, Pflug KM, Kalla SE, Ainsworth DM, Miller D, Raudsepp T,
434 Sutter NB, Brooks SA. 2016. Skeletal variation in Tennessee Walking Horses maps to
435 the *LCORL/NCAPG* gene region. *Physiological Genomics* 48: 325-335 DOI:
436 10.1152/physiolgenomics.00100.2015.
- 437 34. Tong B, Muramatsu Y, Fuke N, Himizu Y, Katou H, Ohta T, Kose H, Yamada T.
438 2016. Allele frequency distribution of the *NCAPG c.1326T>G* SNP associated with
439 growth-related traits in Niigata population of Japanese Black beef cattle. *Open Journal*
440 *of Animal Sciences* 6: 202-206, DOI: 10.4236/ojas.2016.63026.
- 441 35. TOZAKI T, KIKUCHI M, KAKOI H, HIROTA KI, NAGATA SI. 2017. A genome-
442 wide association study for body weight in Japanese Thoroughbred racehorses clarifies
443 candidate regions on chromosomes 3, 9, 15, and 18. *Journal of Equine Science* 28(4):
444 127-134 DOI: 10.1294/jes.28.127.
- 445 36. Van Der Valk RJP et al. 2014. A novel common variant in *DCST2* is associated with
446 length in early life and height in adulthood. *Human Molecular Genetics* 24(4): 1155-
447 1168 DOI: 10.1093/hmg/ddu510.
- 448 37. Viana JGA, Moraes MRE, Dorneles JP. 2015. Dinâmica das importações de carne
449 ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. *Semina: Ciências Agrárias*
450 36(3): 2223-2234 DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n3Supl1p2223.

451 38. Weikard R, Altmaier E, Suhre K, Weinberger KM, Hammon HM, Albrecht E,
452 Setoguchi K, Takasuga A, KÜHN C. 2010. Metabolomic profiles indicate distinct
453 physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus*
454 growth and lipid deposition. *Physiological Genomics* 42A(2): 79-88, DOI:
455 10.1152/physiolgenomics.00120.2010.

456