



CLAUDIANA ESTEVES

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SNP's
RELACIONADOS À QUALIDADE DE CARNE
OVINA**

LAVRAS – MG

2016

CLAUDIANA ESTEVES

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SNP's RELACIONADOS À
QUALIDADE DE CARNE OVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Peter Bitencourt Faria

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Esteves, Claudiana.

Prospecção e caracterização de SNP's relacionados à qualidade de
carne ovina / Claudiana Esteves. – Lavras : UFLA, 2016.

128 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Peter Bitencourt Faria.

Bibliografia.

1. Polimorfismo. 2. PCR-SSCP. 3. Maciez da carne. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CLAUDIANA ESTEVES

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SNP's RELACIONADOS À
QUALIDADE DE CARNE OVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Patrícia Maria de França	UNIFENAS
Dra. Kalynka Gabriella do Livramento	UFLA

Dr. Peter Bitencourt Faria
Orientador

**LAVRAS – MG
2015**

Aos meus pais José Antonio e Raimunda,

A minha irmã Helaine, ao meu sobrinho

Vinícius e ao Gustavo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças em todos os momentos de minha caminhada em busca dos meus objetivos.

Ao meu pai, José Antonio, à minha mãe, Raimunda, à minha irmã Helaina, ao meu sobrinho Vinicius e ao Gustavo por todo amor, compreensão e incentivo, contribuindo de forma grandiosa para a realização deste sonho.

À Universidade Federal de Lavras, da qual tenho tanto orgulho em fazer parte, e ao Departamento de Medicina Veterinária (DMV), pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio ao projeto desenvolvido.

Ao meu orientador, Prof. Peter Bitencourt Faria, pela sabedoria, confiança, amizade, competência e ensinamentos, contribuindo de forma efetiva para o engrandecimento desta pesquisa.

A minha coorientadora Kalynka Gabriella do Livramento pela coorientação, pela sabedoria, confiança, amizade, competência e ensinamentos, contribuindo de forma efetiva para o engrandecimento desta pesquisa.

À professora Ana Paula, minha coorientadora, pelos ensinamentos que foram efetivos, contribuindo para a realização da pesquisa.

Ao Professor Márcio Gilberto Zangeronimo, coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, coordenador do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal/Ufla, pela disponibilidade de uso do laboratório.

Aos funcionários do LCBM, pela atenção, auxílio e ensinamentos.

Aos alunos e amigos do LCBM, pelos ensinamentos, companheirismo e pela contribuição efetiva durante a realização deste estudo.

RESUMO GERAL

Objetivou-se com este trabalho, avaliar o polimorfismo por análise de mutações simples (SNP) de sete genes relacionados ao desenvolvimento muscular, à maciez e ao perfil lipídico da carne ovina (Calpastatina - CAST, Miostatina - GDF8, Estearol CoA Dessaturase – SCD, Domínio da Tioesterase – TE, Ácido Graxo Sintase – FASN e Diacilglicerol Aciltransferase -DGAT 1 e 2). Para o experimento, foram utilizados um total de 84 ovinos machos, constituídos em seis grupos genéticos, sendo estes derivados do cruzamento entre as raças: Santa Inês x Santa Inês, Santa Inês x Black Dorper, Santa Inês x White Dorper, Santa Inês x Texel, Santa Inês x Lacaune e Santa Inês x East Friesian. O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 (seis) tratamentos correspondendo aos cruzamentos com aproximadamente 14 (quatorze) repetições, onde cada animal foi considerado uma repetição. Em busca dos polimorfismos, foram realizadas análises baseadas na técnica PCR-SSCP, que revelou diferentes padrões de leituras no gel de poliacrilamida. Os polimorfismos foram identificados a partir do sequenciamento das amostras com o auxílio do software livre Sequence Scanner Software (Applied Biosystems). A técnica de SSCP detectou um padrão único de banda nos genes DGAT-1 e SCD; dois padrões de bandas no gene FASN, três padrões nos genes GDF-8 e TE e quatro padrões nos genes CAST e DGAT-2. No gene CAST foram identificados quatro genótipos (AA, AB, BB e BC) e o sequenciamento identificou dois polimorfismos (c.227A>G; c.383A>G) que resultaram na troca do ácido glutâmico por glicina e treonina por alanina respectivamente. Já, para o gene GDF-8 foram observados três genótipos (DD, DE e FF) e o sequenciamento evidenciou a presença de 4 polimorfismos, nos quais não resultaram trocas de aminoácidos. No gene DGAT-2 foram identificados quatro genótipos (MO, MP, NP e MQ) e o sequenciamento, resultou na presença dois polimorfismos (c.229T>C; c.255T>C) que resultaram na troca da fenilalanina por leucina. No gene FASN, foram identificados dois genótipos (RS e RR). No gene TE, foram identificados três genótipos (TV, TT e UV) e o sequenciamento resultou na presença de 4 polimorfismos. Os genes DGAT-1 e SCD não relevaram, neste estudo, a presença de polimorfismo. Os resultados obtidos indicaram que o gene CAST, o gene GDF8 e o DGAT-2 apresentaram polimorfismos com mudanças na sequência de aminoácidos, podendo ou não resultar mudança na conformação final da proteína. Já, os genes DGAT-1 e SCD não apresentaram padrões diferenciados e nem SNPs e o gene FASN apresentou apenas padrões de bandas diferentes, mas sem SNPs.

Palavras-chave: Polimorfismo. PCR-SSCP. Maciez da carne. Deposição de gordura.

GENERAL ABSTRACT

In this study, we sought to evaluate the polymorphism by means of analysis of point mutations (SNP) of seven genes related to muscle development to softness and lipid profile of sheep meat (calpastatin - CAST, myostatin - GDF8, Stearoyl CoA desaturase - SCD, field of thioesterase - TE, Fatty Acid Synthase - FASN and Diacylglycerol Acyltransferase - DGAT 1 and 2). We used 84 male sheep grouped in six genetic clusters obtained from a cross between the following races: Santa Ines × Santa Ines, Santa Inês × Dorper Black, White Dorper × Santa Inês, Santa Inês × Texel, Santa Inês × Lacaune, and Santa Inês × East Friesian. The experiment was established in completely randomized design (CRD) with six treatments corresponding to crossings with about 14 repetitions, each consisting of an animal. Analyzes were carried out seeking for polymorphisms, using the PCR-SSCP technique that showed results with different patterns in polyacrylamide gel. The sequencing of samples with the help of free software Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) was used to identify polymorphisms. The SSCP technique detected a single standard band in DGAT-1 and SCD genes; two banding patterns in FASN gene in three patterns GDF-8 genes and TE four patterns in the CAST gene and DGAT-2. The CAST gene were identified four genotypes (AA, AB, BB and BC) and sequencing identified two polymorphisms (c.227A> G; c.383A> G) which resulted in the exchange of glutamic acid for glycine and threonine to alanine respectively. Since, for the GDF-8 gene were observed genotypes (DD, DE, FF) and sequencing revealed the presence of polymorphisms 4, which resulted in no exchange of amino acids. In DGAT-2 gene were identified four genotypes (MO, MP, NP and MQ) and sequencing resulted in the presence of two polymorphisms (c.229T> C; c.255T> C) which resulted in the exchange of phenylalanine to leucine. In FASN gene, they identified two genotypes (RS and RR). In the TE gene were identified three clones (TV, TT and UV) and sequencing resulted in the presence of 4 polymorphisms. The DGAT-1 and SCD genes do not relevaram this study, the presence of polymorphism. The results indicated that the CAST gene GDF8 gene and DGAT-2 polymorphisms showed changes in amino acid sequence and may or may not result in change in the final conformation of the protein. Already, DGAT-1 and SCD genes did not show different patterns and even SNPs and FASN gene showed only patterns of different bands, but no SNPs.

Key-words: Polymorphism. PCR-SSCP. meat tenderness. Fat deposition.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene CAST, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 622pb, em algumas amostras de DNA ovino.....71
- Figura 2 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando quatro genótipos diferentes (AA, AB, BB e BC) com três alelos diferentes (A,B,C) de SNPs no gene CAST.....72
- Figura 3 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de três amostras diferentes do gene CAST e da sequência do gene CAST depositada no GenBank, número de acesso AF01600776
- Figura 4 Alinhamento parcial, utilizando ferramentas Clustal Omega (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE- EBI, 2015) de três amostras diferentes de proteínas do gene CAST.....77
- Figura 5 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene GDF-8, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 561pb, em algumas amostras de DNA ovino.....79
- Figura 6 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando três genótipos de SNP's (DD, DE e DF) no gene GDF-8.....80
- Figura 7 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site do JustBio (2015), de duas amostras do gene GDF-8 e da sequência do gene GDF-8 depositada no GenBank, número de acesso DQ530260.1.....83

Figura 8	Alinhamento parcial utilizando a ferramenta Clustal Omega (EBI, 2015), de três amostras diferentes de proteínas do gene GDF-8.....	84
----------	--	----

CAPÍTULO 3

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene DGAT-1, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 381pb, em algumas amostras de DNA ovino.....	102
Figura 2	Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando um único genótipo (HI) de SNP no gene DGAT-1.....	103
Figura 3	Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), utilizando uma amostra do gene DGAT-1 e da sequência do gene DGAT-1 depositada no GenBank, número de acesso gb EU178818.1 , As semelhanças são indicadas por asterisco (*).....	104
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene DGAT-2, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 268pb, em algumas amostras de DNA ovino.....	106
Figura 5	Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando quatro genótipos MO, MP, NP, MQ de SNPs no gene DGAT-2.....	107
Figura 6	Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras do gene DGAT-2 e da sequência do gene DGAT-2 depositada no GenBank, número de acesso XM_012154874.1	109

Figura 7	Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site Clustalomega (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE - EBI, 2015), de três amostras diferentes de proteínas do gene DGAT-2.....	110
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene FASN, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 228pb, em algumas amostras de DNA ovino.....	111
Figura 9	Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando dois genótipos (RS e RR) de SNPs no gene FASN.....	112
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene SCD, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 377pb, em algumas amostras de DNA ovino.....	115
Figura 11	Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando um único genótipo GY no gene SCD.....	116
Figura 12	Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras 1 e 2 do gene SCD e da sequência do gene SCD depositada no GenBank, número de acesso gb GQ904712.2	117
Figura 13	Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene TE, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 505pb, em algumas amostras de DNA ovino.....	119
Figura 14	Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando três genótipos TV, TT e UV de SNPs no TE.....	120

Figura 15 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras do gene TE e da sequência do gene SCD depositada no GenBank, número de acesso JN570752.2122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes CAST, GDF-8.....	66
Tabela 2	Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP), segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Calpastatina (CAST) em ovinos	74
Tabela 3	Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Miostatina (GDF-8) em ovinos.....	82

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes DGAT-1, DGAT-2, FASN, SCD e TE.....	97
Tabela 2	Condições estabelecidas de temperatura de anelamento dos primers da PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes DGAT-1, DGAT-2, FASN, SCD e TE.....	98
Tabela 3	Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT-2) em ovinos	108
Tabela 4	Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Ácido Graxo Sintase (FASN) em ovinos	113
Tabela 5	Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Domínio da Tioesterase (TE) em ovinos.....	121

LISTA DE SIGLAS

AFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificado
AGM	Ácido graxo monoinsaturado
AGS	Ácido graxo saturado
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAST	Calpastatina
CLA	Ácido linoleico conjugado
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FASN	Ácido graxo sintase
GDF-8	Miostatina
GMD	Ganho médio diário
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POP7	Performance optimized polymer
QTL	Característica quantitativa
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
SCD	Estearoil-CoA dessaturase
SNP	Polimorfismo nucleotídeo simples
SRD	Sem raça definida
SSCP	Polimorfismo de conformação de cadeia simples
TE	Dominio da tioesterase
TBE	Performance optimized polymer
TGF- β	Trasnforminggrowthfactor β
UTR	Untranslated region

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Ovinocultura	19
2.1.1	Aspectos gerais de produção e consumo de carne ovina no Brasil ...	20
2.1.2	Principais raças de ovinos no Brasil	21
2.2	Qualidade de carne	23
2.3	Polimorfismo genético	28
2.3.1	Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs)	28
2.3.2	Polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP)	30
2.4	Genes relacionados à qualidade de carne	31
2.4.1	Calpastatina (CAST)	32
2.4.2	Miostatina (GDF8)	34
2.4.3	Estearoil CoA Dessaturase (SCD)	37
2.4.4	Ácido Graxo Sintase (FASN) e Domínio da Tioesterase (TE)	39
2.4.5	Diacylglicerol Aciltransferase 1 e 2 (DGAT 1 e 2)	41
	REFERÊNCIAS	43
	CAPÍTULO 2 Prospecção e caracterização de polimorfismo de genes relacionados ao desenvolvimento muscular e maciez da carne	60
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1	Aspectos éticos	64
2.2	Local do experimento	64
2.3	Animais	64
2.4	Extração de DNA genômico	65
2.5	Amplificação do DNA	66
2.6	Eletoforese em gel de Poliacrilamida/Triagem de mutações	67
2.7	Sequenciamento e análise dos dados	68
2.8	Análises Estatísticas	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	CAPÍTULO 3 Prospecção e caracterização de polimorfismo de genes relacionados ao perfil lipídico da carne de ovinos	91
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1	Aspectos éticos	95
2.2	Local do experimento	95

2.3	Animais.....	95
2.4	Extração de DNA genômico	96
2.5	Amplificação do DNA.....	97
2.6	Eletroforese em gel de Poliacrilamida/Triagem de mutações	99
2.7	Sequenciamento e análise dos dados	99
2.8	Analises Estatísticas	100
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4	CONCLUSÕES	124
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXO.....	128

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento genético visam ao aumento da produção, por meio da busca de animais com melhores aptidões zootécnicas. Entretanto, a identificação de fatores que contribuam para melhorar a qualidade da carne no produto final, é uma forma de incrementar a produtividade e tornar o parâmetro decisório no processo de seleção genética. Os atributos de qualidade de carne ou características físico-químicas apresentam variações que estão associadas a vários fatores, dentre eles, destaca-se o fator genético em função dos diferentes potenciais de crescimento, maturidade e precocidade de cada raça ou linhagem (BRESSAN et al., 2001).

O uso das técnicas de biologia molecular com o uso de marcadores aplicados ao processo de seleção genética para carnes com melhores características nutricionais e sensoriais, constitui uma ferramenta a ser implementada cada dia mais nos programas de melhoramento genético. Existe uma grande possibilidade de associação entre os conhecimentos das áreas de genética quantitativa, com suas estimativas de valores genéticos e de genética molecular, com a identificação de marcadores moleculares e polimorfismo de genes em animais de produção. Os trabalhos sobre a qualidade de carne associados a marcadores moleculares estão sendo cada vez mais discutidos (LAGONIGRO et al., 2003; PAGE et al., 2002; SCHENKEL et al., 2005; WHITE et al., 2005).

Os estudos com as principais raças de ovinos no Brasil ainda são reduzidos, havendo necessidade de iniciar a realização dessas pesquisas, para subsidiar os programas de seleção genética, buscando a obtenção de animais para a produção de carnes com os aspectos desejáveis. Conseqüentemente, esta

será uma ferramenta na ovinocultura de corte para adaptar-se às novas demandas do mercado consumidor, buscando oferecer produtos de melhor qualidade e a menores custos.

Dentro desse contexto, objetvou-se, neste trabalho realizar a prospecção e a caracterização de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNPs) de genes relacionados à qualidade de carne ovina em diferentes grupos genéticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovinocultura

A ovinocultura é uma atividade milenar, executada, praticamente, em todos os países do mundo e que alcançou, na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Uruguai, Argentina e Sul do Brasil, uma elevada importância econômica. Em alguns países pobres e áridos, tem uma importância social muito grande, sendo imprescindível para a sobrevivência do homem das regiões secas (MENDES, 2000).

Pertencentes à espécie *Ovis Aries* (ovinos domésticos), gênero *Ovis*, Subfamília *Ovinae* e Ordem *Ungulata*; os ovinos foram domesticados pelo homem primitivo, no período neolítico, mais ou menos 5000 a.C., proporcionando-lhe alimento em forma de carne e leite e proteção, por meio da lã e da pele (BELLUZO; KANETO; FERREIRA, 2001).

Sua disseminação pelo globo deveu-se ao atendimento das populações de diversas regiões nas suas variadas necessidades, juntamente com a influência dos fatores ambientais e de manejo que atuaram decisivamente na determinação do tipo (morfologia e aptidão). Além da facilidade de domesticação e/ou transporte desses animais, aliados à facilidade de adaptação a locais impróprios a outras espécies (BORGES; GONÇALVES, 2002). Atualmente, existem mais de 800 raças de ovinos domésticos espalhadas pelo mundo, das quais a maior concentração encontra-se na Ásia, África e Oceania (BELLUZO; KANETO; FERREIRA, 2001; ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

Conforme dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2014), dentro do contexto mundial, a Austrália e a Nova Zelândia permanecem como os maiores exportadores de carne ovina. Tendo o

primeiro país maior crescimento que o segundo, em razão do aumento da classe média dos países asiáticos como a China e do Oriente Médio.

No Brasil, a criação de ovinos, teve início durante o período de colonização e esteve diretamente relacionada à influência portuguesa e espanhola. Voltados à produção de carne e de lã, os rebanhos de ovinos se concentraram, principalmente no Nordeste e Sul do país (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

O rebanho ovino brasileiro, no ano de 2012, estava em torno de 16,5 milhões de cabeças, com maior número na região do Nordeste, essa com, aproximadamente 9 milhões de cabeças (91% do total da produção) (KITS; SANTOS; DRUM, 2014). O país é o 24º produtor mundial, entre os fatores responsáveis por esse crescimento destacam-se a melhoria de pastagens, a alimentação e os investimentos na genética dos rebanhos (MARTINS; MARCHETTI; GARCIA, 2015).

2.1.1 Aspectos gerais de produção e consumo de carne ovina no Brasil

O consumo de carne ovina pelos brasileiros ainda é reduzido quando comparado ao de outras espécies (bovina, suína, aves). Atualmente, observa-se um aumento do consumo nos grandes centros, principalmente na região Sudeste (VIEIRA et al., 2010). Embora ainda não tenha se tornado um hábito nas refeições de grande parte das famílias brasileiras, o produto está ganhando espaço em restaurantes e churrascarias, portanto é considerada uma atividade de crescimento promissor (KITS; SANTOS; DRUM, 2014).

O consumo brasileiro de carne ovina situa-se em cerca de 400 gramas/ano por pessoa e, assim requer importação do produto, uma vez que a produção brasileira de ovinos ainda não abastece o mercado doméstico com eficiência e qualidade (KITS; SANTOS; DRUM, 2014). Um dos maiores

problemas está relacionado à falta de uma oferta constante, o que resultou em 2013, por exemplo, na importação de aproximadamente nove mil toneladas de carne proveniente do Uruguai, que consegue oferecer um produto com qualidade e preços competitivos em relação ao brasileiro (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

As cadeias produtivas e a comercial estão sendo organizadas para atender cada vez melhor ao mercado e oferecer um produto de qualidade, principalmente em relação a características físico-químicas e sensoriais da carne (ESTEVES et al., 2010). A aceitação da carne ovina pelo consumidor, além do grupo genético, é influenciada por outros fatores como: o tipo de alimentação, a idade ao abate, condições de armazenamento da carcaça fria e da carne após a desossa, entre outros (VIEIRA et al., 2010).

Diante disso, associação de técnicas de melhoramento genético com marcadores moleculares é uma das práticas mais recomendáveis para se conseguir carnes de melhor qualidade, uma vez que, as avaliações de qualidade de carne em geral são realizadas no *post mortem* (BORGES, 2013).

2.1.2 Principais raças de ovinos no Brasil

No Brasil, o principal objetivo da ovinocultura está relacionado à obtenção de animal para a produção de carne. No país, com a crise da lã na década de 80, alguns produtores desfizeram-se dos rebanhos laneiros e outros priorizaram as raças de dupla aptidão ou voltaram para as raças de produção de carne, importando reprodutores específicos para carnel, o que proporcionou uma maior produção de carne ovina no Brasil (ÁVILA et al., 2013; NOCCHI, 2001; SILVEIRA, 2001).

A raça Santa Inês foi desenvolvida no nordeste brasileiro, resultante do cruzamento intercorrente das raças Bergamacia, Morada Nova, Somalis e outros

ovinos sem raça definida (SRD), sendo os animais caracterizados por serem deslanados, com pelos curtos e sedosos. São animais de maior porte, que alcançam 40 Kg de peso vivo aos seis meses; o peso corporal médio é de 80 Kg para os machos e 60 Kg para as fêmeas. Os animais dessa raça apresentam altos índices de crescimento em relação aos demais ovinos deslanados, como a Morada Nova (SILVA SOBRINHO, 1993). Segundo Corradello (1988), a raça destaca-se pelas características desejáveis para a produção de carne, pois apresenta precocidade, alto rendimento de carcaça e rusticidade. Essa se adapta a qualquer sistema de criação nas mais diversas regiões do país (BELLUZO; KANETO; FERREIRA, 2001).

Outra raça que tem apresentado grande destaque é a Dorper. Esses animais são o resultado do cruzamento entre as raças formadoras Dorset Horn e Persian, sendo criadas com o único propósito de produzir carne o mais eficientemente possível, sob variadas e mesmo desfavoráveis condições ambientais. Também é uma raça que apresenta excelente aptidão para a produção de carne, para a qual utilizam os reprodutores em cruzamentos para melhorar os índices de produção (AOSSOCIAÇÃO BRASILEIA DE CRIADORES DE OVINOS - ARCO, 2015).

Por meio do cruzamento entre as raças Santa Inês e Dorper, é possível obter animais com maior deposição de músculo, melhor conformação e qualidade da carne de cordeiros (AMARAL et al., 2011). A raça White Dorper, inicialmente chamada de “Dorsian”, teve origem na seleção feita por alguns criadores, a partir de ovinos brancos obtidos do cruzamento entre o Dorset Horn x Blackhead Persian ou entre o Dorset Horn x Van Rooy. No Brasil, a utilização da raça White Dorper ainda é recente e com pouco estudo sobre sua capacidade de produção nas condições nacionais.

De origem Holandesa, a raça Texel foi introduzida no Brasil, por volta de 1972. Sendo uma raça utilizada para a produção de carne (caracterizando-se

pela produção de carcaças de boa qualidade, com baixo teor de gordura) e lã (BELLUZO; KANETO; FERREIRA, 2001; BRANDÃO, 2002). Caracteriza-se, de forma geral, por ser uma raça rústica e sóbria, muito dócil e com grande desempenho em sistemas intensivos e semiintensivos. É considerada uma raça paterna (BORGE; GONÇALVES, 2002; OLIVEIRA et al., 2011) e os animais que apresentam lã branca são muito utilizados em cruzamentos industriais com matrizes laneiras ou mistas (SILVA SOBRINHO et al., 2008).

Lacaune é uma raça bastante utilizada para a produção de leite e carne (OLIVEIRA et al., 2011), é de origem francesa e, seu nome deve-se aos montes Lacaune no Tarn. Tem como origem os diversos grupos ovinos que existiam nas províncias de L'Aveyron, Tarn e limítrofes. Considerada de aptidão mista, é explorada para a produção de leite, com o qual se fabricam queijos e outros derivados, a carne proveniente de seus cordeiros é de alta qualidade (ARCO, 2015).

A raça East Friesian é originária do Oeste da República Federal da Alemanha, ao leste da região da Frísia e apresenta boa aptidão para a produção de leite (KUCHTIK et al., 2008), além de apreciável produção de carne e lã. Esses animais possuem excelente precocidade e velocidade de crescimento, apresentando alto potencial para uso em cruzamentos na obtenção de animais para a produção de carne e lã (ARCO, 2015).

2.2 Qualidade de carne

A carne é um produto resultante das contínuas transformações bioquímicas que ocorrem no músculo no *post mortem* do animal, sendo considerada um alimento de alto valor nutricional, desempenhando também uma função plástica, influenciando na formação de novos tecidos e na regulação de processos fisiológicos e orgânicos, além de contribuir com o fornecimento de

energia (COSTA et al., 2008; MONTE et al., 2007, 2012; PINHEIRO et al., 2009).

A qualidade pode ser analisada sob vários pontos de vista: nutricional, higiênico, da facilidade de utilização, da imagem pré-estabelecida, da apresentação e sensorial. A última, definida como as características percebidas pelos sentidos no momento da compra ou do consumo (SIQUEIRA et al., 2002). A qualidade da carne é resultante da combinação entre sabor, suculência, textura, maciez e aparência, constituintes que exercem influência na aceitação do produto pelo consumidor, cujo grau de satisfação depende de respostas psicológicas e sensoriais inerentes a cada indivíduo (COSTA et al., 2008).

Os estudos relacionados à qualidade da carne tornam-se cada vez mais precisos, respaldando-se menos em julgamentos pessoais e mais em testes químicos e físicos. Dentre as características, destacam-se a qualidade química, baseada no estudo dos níveis de proteína, lipídios, colesterol e ácidos graxos; a física relacionada os parâmetros de pH, cor, perda de peso por cocção, capacidade de retenção de água e, a qualidade sensorial avalia o sabor, maciez, aroma, suculência entre outros (MONTE et al., 2012). Por outro lado, esses parâmetros de qualidade são interdependentes e devem ser analisados conjuntamente (MONTE et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009).

O pH é considerado um dos mais importantes parâmetros de qualidade da carne, pois pode interferir nas demais características (BONAGURIO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2009). Ao se respeitar as condições de bem-estar do animal *ante mortem*, o pH do músculo após a morte do animal diminui de aproximadamente 7,2 para 5,5 em decorrência da degradação das fontes de fosfocreatina, glicogênio e o ATP, em decorrência do efeito da sangria do animal, o que ocasiona a transformação em ácido láctico, causada pela ausência de oxigênio nas células, resultando em reações bioquímicas no *post mortem* e

gerando a conversão do músculo em carne (BONAGURIO et al., 2003; ROÇA; SERRANO, 1994).

A cor desempenha importante papel na qualidade sensorial da carne e destaca-se como principal fator de apreciação no momento da compra. Normalmente, a coloração da carne é determinada pela concentração total de mioglobina (proteína envolvida nos processos de oxigenação do músculo) e pelas proporções relativas desse pigmento no tecido muscular, que pode ser encontrado na forma de mioglobina reduzida, com coloração púrpura, oximioglobina, de cor vermelho brilhante e metamioglobina, normalmente marrom (COSTA et al., 2011a; MONTE et al., 2012).

A cor da carne é uma característica que o consumidor analisa no momento da compra, determinando, indiretamente, a vida de prateleira do produto. No entanto, preferência pela cor da carne pode também estar relacionada a questões culturais, como na Espanha, em que o consumidor prefere carnes de coloração mais claras, sendo, portanto, de animais mais jovens. Enquanto em outros países da Europa, preferem-se carnes de animais mais velhos, portanto de coloração um pouco mais escura (COSTA et al., 2011b; MONTE et al., 2012; PINHEIRO et al., 2009).

No Brasil, há uma forte preferência para o consumo da carne de cordeiros jovens, que são mais macios e suculentos, menos escura e avermelhada e contêm menos gordura do que a dos animais mais velhos (DUTRA et al., 2013; PINHEIRO et al., 2009).

A satisfação sensorial é a principal responsável pela manutenção de determinado produto no mercado e, dentre as características de qualidade de carne, a maciez é o fator mais importante na aceitação pelo consumidor (ALCALDE; NEGUERUELA, 2001). Contudo, a maciez e os demais atributos de qualidade apresentam variações que podem oscilar entre limites de aceitação da qualidade (SHACKELFORD et al., 1991), sendo essas diferenças

importantes, tanto entre raças como entre animais da mesma raça (MARSHALL, 1999). A maciez da carne é, frequentemente, o atributo mais importante na satisfação geral do consumidor (SILVA SOBRINHO et al., 2005) e pode ser definida como a facilidade de mastigar a carne com sensações de penetração, corte e resistência à ruptura (PINHEIRO et al., 2009).

O mercado potencialmente promissor para carne ovina no Brasil tem tido uma expansão significativa nos últimos tempos, entretanto, a qualidade do produto ainda é um fator que se interpõe como um grave problema (MONTE et al., 2012), devido à oferta de carcaças de animais com idade avançada e com péssimas características físico-químicas e organolépticas. Esses aspectos têm dificultado o estabelecimento do hábito de consumo, além de uma oferta baixa, irregular e deficiente na maneira de apresentação do produto (PÉREZ; CARVALHO, 2002). Esses fatores devem ser minimizados, pois o novo perfil dos consumidores está mais perceptível à qualidade, o que irá obrigar ao aprimoramento técnico e organizacional na atual cadeia produtiva (COSTA et al., 2011a, MONTE et al., 2012). A busca por alimentos mais saudáveis e a maior exigência em relação à qualidade dos produtos, faz com que o produtor tenha que se preocupar, cada vez mais, em oferecer ao mercado um produto de qualidade, com características mais desejáveis nutricionalmente e sensorialmente (COSTA et al., 2008; MADRUGA, et al., 2008; MONTE et al., 2012; VIEIRA et al., 2010).

Para que esse quadro possa se manter, o produtor tem que se preocupar cada vez mais em oferecer ao mercado um produto de qualidade, principalmente quanto às características físico-químicas e sensoriais da carne (MADRUGA, et al., 2008; MONTE et al., 2012; VIEIRA et al., 2010).

Em um sistema de produção, para a obtenção de um produto de qualidade uniforme, é fundamental que os fatores que exercem influência sejam bem caracterizados. A nutrição, raça, manejo, peso de abate e o sexo dos ovinos

interferem nos parâmetros de qualidade da carne (PINHEIRO et al., 2009), sendo, portanto, fatores preponderantes na definição dos aspectos qualitativos da carne ovina (COSTA et al., 2008).

Entre os outros fatores, o peso do animal é o que mais interfere diretamente como os aspectos qualitativos do produto final, porém está relacionado ainda com outras características como grau de gordura, conformação e idade de abate do animal.

Para atender às exigências do mercado consumidor, o setor produtivo precisa conhecer os fatores que interferem nas características físicas e químicas da carne, pois estas determinam sua qualidade e aceitabilidade (MARTÍNEZ-CEREZO et al., 2005). O valor comercial da carne está baseado no seu grau de aceitação pelos consumidores, o qual está diretamente correlacionado aos parâmetros de palatabilidade do produto.

As características da carne que contribuem com aceitação são aquelas agradáveis aos olhos, nariz e paladar, dentre as quais sobressaem os aspectos organolépticos de sabor e de suculência (MADRUGA et al., 2005; MONTE et al., 2012). O grau de deposição de gordura é um fator que acarreta variação na aceitação da carne pelo consumidor; sendo, assim, deve-se levar em consideração o peso de abate dos animais de forma a coincidir com o ponto em que a gordura está na proporção desejável (COSTA et al., 2008).

Altos teores de gordura depreciam o valor comercial das carcaças, contudo é necessário certo teor de tecido adiposo nestas, como determinantes das boas características sensoriais da carne e também para reduzir as perdas de água no resfriamento. Dessa forma, as carcaças de boa qualidade devem apresentar a elevada proporção de músculos, baixa proporção de ossos e quantidade adequada de gordura intramuscular para garantir a suculência e o sabor da carne (COSTA et al., 2008).

2.3 Polimorfismo genético

As diferenças nas sequências de DNA entre indivíduos da mesma espécie são chamadas de polimorfismos. Esses são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1% (BASTOS, 2010; COSTA et al., 2007; HOLANDA, 2013; SCHAFER; HAWKINS, 1998).

Diversas técnicas são usadas na detecção de polimorfismos, incluindo a análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA replicado ao acaso (RAPD), polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo nucleotídeo simples (SNP), sequenciamento genético, entre outros (GAMA, 2002).

2.3.1 Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs)

O polimorfismo de nucleotídeo simples (*Single Nucleotide Polymorphism* -SNP) é definido como polimorfismos resultantes da substituição de um nucleotídeo por outro, ou seja, é a alteração de uma única base. Essas alterações podem ser variações que ocorrem nas bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina e guanina) em uma determinada sequência e podem diferir entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos de um mesmo indivíduo (COSTA et al., 2007). Normalmente, os marcadores SNPs são bialélicos, ou seja, geralmente são encontrados apenas dois variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C) (CARREIRO, 2012). Um polimorfismo de nucleotídeo simples é denominado de individual, quando ocorre uma mutação dentro de uma sequência de DNA e de haplogrupo, quando ocorrem várias mutações em conjunto (LIMA, 2007).

Estudos realizados com humanos e com espécies de interesse zootécnico, revelaram a presença de milhões de polimorfismos SNP no genoma de um indivíduo (LI et al., 2006). Portanto, além dos marcadores SNP serem abundantes, suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma. O que foi comprovado pelos primeiros trabalhos com sequenciamento de fragmentos específicos de DNA, no qual foi detectado polimorfismo de nucleotídeo simples (CAETANO, 2009; ORITA et al., 1989).

Os SNPs apresentam a desvantagem de serem localizados em sítios hipervariáveis, violando a característica de serem bialélicos. Os alelos são de grande importância, sendo resultados de pequenas variações ocorridas nos genes ao longo das gerações que se fixaram no genoma e resultaram em alterações primárias em nível de DNA e, conseqüentemente, alterações nas seqüências das proteínas (OJOPI et al., 2004).

Quando se compara os SNPs aos marcadores microssatélites, percebe-se que os SNPs apresentam custos mais elevados para prospecção e um baixo polimorfismo, em razão da baixa ocorrência de mutações (BRITO; EDWARDS, 2009). Ao utilizar marcadores SNPs deve-se atentar para uma considerável taxa de heterogeneidade entre os sítios, baixo conteúdo informativo de um único SNP (CARREIRO, 2012; SCHLÖTTERER, 2004).

Segundo Morin, Martien e Taylor (2009), a aplicação de técnicas de estudos de biologia molecular, por meio de SNPs são modelo mais simples, apresentando maior sucesso diante de amostras de DNA antigo e de baixa qualidade, além do fato de apresentar menores erros diante da genotipagem com presença de mutação.

Os SNPs se tornaram os marcadores de escolha para estudos de genoma, uma vez que proporcionam a melhor cobertura do genoma tanto para produção, detecção de doenças e para características de desempenho (KORINGA et al.,

2013). Outra grande vantagem é a facilidade com que grandes números de SNPs podem ser genotipados de uma só vez e com o baixo custo (GORBACH, 2011).

2.3.2 Polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP)

O estudo de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP - *Single-Strand Conformation Polymorphism*) é uma técnica para identificar polimorfismos no DNA, possuindo a vantagem de ser sensível, rápida e de baixo custo. O SSCP possui eficiência que varia entre 60 a 95%, sendo eficiente com fragmentos de DNA entre 80 a 600 pares de base. Além disso, é um método que possibilita avaliar entre as amostras de DNA, aquelas que apresentarão padrões polimórficos, desse modo possibilitando que apenas algumas amostras sejam sequenciadas em comparação ao uso de outras técnicas (ALMEIDA, 2013; PINTO, 2010; SUNNUCKS, et al., 2000).

A SSCP é uma técnica rápida, reprodutível e bastante simples que não necessita de equipamentos caros ou reagentes específicos, em relação a outras técnicas moleculares. O processo envolve a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do fragmento alvo, desnaturação do produto da PCR de cadeia dupla com calor e formamida e, eletroforese num gel de poliacrilamida não desnaturante (AMORIM, 2009). Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA de cadeia simples dobram em forma tridimensional, dependendo da sua sequência primária (ORITA et al., 1989). Os fragmentos de DNA podem, então, ser genotipados como resultado de seus diferentes padrões de migração e depois confirmada pelo sequenciamento Sanger, o qual permite determinar a sequência exata de uma cadeia de DNA. A sensibilidade do SSCP varia, consideravelmente, de 70% a 95% (CHOY et al., 1999; KAKAVAS et al., 2008; KUKITA et al., 1997; RAJATILEKA et al., 2014). A discriminação dos alelos é

feita por comparação dos diferentes perfis de eletroforese após coloração por nitrato de prata (PEREIRA, 2013).

O DNA de cadeia simples tem tendência para formar estruturas secundárias complexas, estabilizadas por ligações químicas fracas, principalmente por pontes de hidrogênio entre as bases. A técnica SSCP baseia-se nas diferentes velocidades de migração dessas estruturas, por efeito da passagem de uma determinada corrente elétrica, num gel não desnaturante, permitindo distinguir fragmentos de DNA, que diferem apenas num nucleotídeo, o que provoca uma alteração estrutural da molécula e permite identificar SNPs (FORTES, 2007).

De acordo com Hayashi et al. (1992), a sensibilidade da técnica de SSCP é diminuída com a presença de fragmentos muito longos de DNA. Isto é, a percepção da análise aumenta em cerca de 80% com sequências menores que 300 pares de base (KUKITA et al., 1997). Contudo, a sensibilidade e simplicidade do método permitem analisar um grande número de amostras e torna-se bastante útil na detecção de polimorfismos (GUERRA, 2012; ORITA et al., 1989).

O fato da técnica de SSCP detectar muitas mutações em variados pontos ou mesmo substituições de nucleotídeos em várias posições de um mesmo fragmento de DNA é uma característica muito importante em relação à técnica de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição - RFLP (ORITA et al., 1989).

2.4 Genes relacionados à qualidade de carne

As características nutricionais da carne apresentam o inconveniente de serem de difícil avaliação *in vivo*, dificultando, portanto a seleção para esses caracteres. O desenvolvimento recente das ferramentas de biologia molecular

abre perspectivas no melhoramento dos caracteres qualitativos da carne, pois vários marcadores genéticos foram descritos e são promissores como auxiliares nos programas de seleção no sentido de conseguir carnes com perfil lipídico mais saudável, para evitar doenças associadas ao consumo de gorduras saturadas (MADRUGA, et al., 2006; WOOD et al., 2003).

Nesse contexto, os genes da Esteroil-CoA Dessaturase (SCD), Domínio da Tioesterase (TE), Ácido Graxo Sintase (FASN), Diacilglicerol Aciltransferase 1 e 2 (DGAT-1 e DGAT-2), assim como outros relacionados à maciez de carne Calpastatina (CAST) e Miostatina (GDF-8) têm potencial como possíveis genes candidatos a serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores, visando à melhoria da maciez ou outros parâmetros físico-químicos (AALI, et al., 2014).

Entretanto, para ovinos, os estudos ainda são recentes, com uma série de genes candidatos que ainda estão sendo pesquisados. O desenvolvimento de mapas genéticos ovinos, contendo marcadores moleculares e genes têm avançado e, são ferramentas essenciais para auxiliar a identificação de regiões genéticas que contêm loci de característica quantitativa (QTL) (COCKETT et al., 2005), que são regiões do genoma responsáveis por expressão de caracteres fenotípicos, que possuem distribuição contínua, como: altura e peso dos animais, teor de gordura entre outros (TOLEDO et al., 2008).

2.4.1 Calpastatina (CAST)

O sistema Calpaína/Calpastatina é compreendido basicamente por três moléculas: duas dependentes de cálcio (proteases μ -calpaína e m-calpaína) e uma terceira enzima, a calpastatina, cuja função é a de inibir atividade as duas calpaínas (BAGATOLI, 2011; BUCCI et al., 2005; GOLL et al., 2003). O referido sistema é responsável pela quebra das miofibrilas (desmina, toponina,

titina e nebulina, por exemplo) no *post mortem*, processo pelo qual a carne se torna macia (CALVO et al., 2014; FORTES, 2007). Segundo estudos, a ação proteolítica das calpaínas no *post mortem* nas fibras musculares ocorre pelo enfraquecimento da interação filamentos finos e disco-Z do sarcolema das fibras musculares, os quais apresentam as maiores relações com o amaciamento no *postmortem*. A ação das calpaínas no disco-Z concentra-se, especificamente, nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T, nas quais encontram seu sítio de ligação e que são degradadas, durante o processo de maturação (DRANSFIELD, 1994; FORTES, 2007). A calpastatina, inibidor endógeno de ambas as calpaínas, é considerada o maior modulador da ação proteolítica das mesmas. O aumento na atividade da calpastatina ocasionará uma diminuição da atividade das calpaínas, resultando em uma menor degradação das proteínas musculares no *post mortem* e contribuindo para redução do amaciamento da carne durante o processo de maturação (AALI et al., 2014; GOLL et al., 1992; KANIA, 2012; KHAN et al., 2012; KOOHMARAIE, 1992; KOOHMARAIE; SEIDMAN, 1987).

Associações foram relatadas entre as variações no gene CAST (gene da calpastatina) relacionadas com as características de carcaça e de qualidade de carne de bovinos (CASAS et al., 2006; SCHENKEL et al., 2006), suínos (CIOBANU et al., 2004; ZHOU; HICKFORD; GONG, 2008) e ovinos (SANTOS et al., 2014). As pesquisas envolvendo ovinos ainda são poucas, em decorrência do fato de haver falta de identificação de aplicabilidade e necessidade de tais técnicas na ovinocultura, bem como a falta de organização do setor frente às tecnologias disponíveis (PAIVA; PIMENTEL, 2008).

O gene CAST está localizado na região 5q15 no cromossomo quinto de ovinos (CRAWFORD et al., 1995; GABOR; TRAKOVICKA; MILUCHOVA, 2009; HEDIGER; ANSARI; STRANZIGER, 1991; RANJBARI et al., 2012). Variações genéticas no gene CAST que atua no efeito das características de

qualidade de carne, tanto em bovinos quanto em ovinos têm sido relatadas por muitos pesquisadores (CASAS et al., 2006; PALMER et al., 2000; SCHENKEL et al., 2006; SUELEMAN et al., 2012; ZHOU; HICKFORD; GONG, 2006).

Na literatura, os estudos buscando avaliar polimorfismo do gene da Calpastatina nas diferentes espécies têm revelado diferentes resultados. Zhou, Hickford e Gong (2006) investigaram variações no exon 6 do gene CAST em bovinos e identificaram substituição não-sinônima, resultando em polimorfismo Gln/Leu no domínio L, cuja função ainda é desconhecida. Enquanto isso, Barendse et al. (2007) investigaram epistasia entre nucleotídeos no gene da Calpaína 1 (CAPN1) e do gene CAST também em bovinos. Palmer et al. (1998) identificaram dois alelos para o CAST, M e N, que diferem por haver um número de sítios de restrição em um alelo, mas não no outro.

Koohmaraie et al. (2002) apresentaram relação entre mudanças nas taxas de atividade da calpastatina e alterações musculares em ovinos com fenótipo ‘callipyge’, sugerindo associação da calpastatina com maior eficiência de crescimento muscular nesses animais.

2.4.2 Miostatina (GDF8)

O gene da miostatina regula, negativamente, o crescimento do músculo esquelético, pertence à família das supercitocinas dos TGF- β (*Transforming growth factor β*). A miostatina, também referida como fator-8 de diferenciação e crescimento (GDF-8), é predominantemente expressa no músculo esquelético, e seus receptores podem se localizar em outros tecidos e sua função é controlar a proliferação de mioblastos e a formação de fibras musculares (CIESLAK et al., 2003), atuando como regulador autócrino negativo (BAGATOLI, 2011; FULZELE et al., 2010; RONG et al., 2007; WANG et al., 2014).

A miostatina está relacionada à qualidade da carne e da carcaça associada à formação de musculatura dupla em bovinos, ovinos, aves e peixes (BAGATOLI, 2011; TEIXEIRA; OLIVEIRA; QUIRINO, 2006). Segundo Cockett et al. (2005), a condição de hiperdesenvolvimento muscular generalizado, observado em bovinos, é chamado de “*double muscling*”, fenótipo remanescente deste também é encontrado em ovinos da raça Texel, chamdo de “*Texel Double muscling*”.

Pesquisas em bovinos demonstraram que determinados polimorfismos do gene GDF-8 estavam diretamente relacionados com o fenótipo musculatura dupla (BELLINGE et al., 2005; GRISOLIA et al., 2009). Em ovinos, o gene teve um efeito importante sobre o desenvolvimento muscular em animais da raça Texel belga e em ovelhas Romney na Nova Zelândia (HICKFORD et al., 2010).

O gene GDF-8 foi demonstrado pela primeira vez em ratos em 1997, para ser um regulador negativo do crescimento potente e desenvolvimento de músculo esquelético, e a perda da miostatina em ratos promove um aumento significativo da massa muscular esquelética, além de promover uma redução significativa de acúmulo de gordura com a idade (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997). Vários estudos têm demonstrado que a miostatina não está somente envolvida na regulação do desenvolvimento muscular e de crescimento, mas também está correlacionada com o acúmulo de gordura e adipogênese (PAN et al., 2012). Diversas pesquisas realizadas em animais, incluindo frangos, ovinos e bovinos mostraram que gene da miostatina é altamente polimórfico e esses polimorfismos demonstraram ser associado a várias características dos animais, tais como peso ao nascer, desenvolvimento de massa muscular, deposição de gordura abdominal, teor de lipídios e assim por diante (ALEXANDER et al., 2008; GRISOLIA et al., 2009; JOHNSON et al., 2009).

Em bovinos, mutações e deleções foram identificadas na região de codificação do gene GDF-8 em duas raças bovinas (Belga-Azul e Piemontês

Belga), nas quais foram selecionadas para serem associadas à característica de musculatura dupla (GAN et al., 2008; KAMBADUR et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997).

O GDF-8 também atua como regulador da adipogênese, em razão da redução da produção e secreção de leptina (MCPHERRON; LEE, 2002), e para a regulamentação da estrutura e função do tendão, durante pré-natal e desenvolvimento pós-natal (HAN et al., 2010; MENDIAS; BAKHURIN; FAULKENR, 2008). A deleção do gene que a codifica ocasiona menor acúmulo de gordura em decorrência da sua ação direta (BAGATOLI, 2011; GUIZONI et al., 2010).

Walling et al. (2001) confirmaram ligação de QTLs - locos de caracteres quantitativos - nos cromossomos 2 e 18, afetando a musculosidade e a taxa de engorda de ovinos. As ligações no cromossomo 2 foram localizadas entre duas regiões. O QTL, afetando características musculares, foi localizado próximo ao OarFCB128, perto do locus da miostatina, o que foi evidenciado por Kijas et al. (2007) com a presença de múltiplos alelos no locus do GDF8. Entretanto, pode haver uma ligação com outro gene, atuando sobre o polimorfismo funcional (HADJIPAVLOU et al., 2008).

A miostatina controla ativamente o crescimento do músculo esquelético e caso haja um alelo “mH” mutante em bovinos, provoca hipertrofia muscular, pois causa perda de função da mesma. Esse alelo não precisa estar em homozigose para causar efeito, uma única cópia do alelo já tem resultados de aumento do *Longissimus dorsi* e diminuição de gordura (BELLINGE et al., 2005).

2.4.3 Estearoil CoA Dessaturase (SCD)

O perfil de ácidos graxos dos ruminantes pode ser afetado por fatores envolvidos com: a) variações entre animais na quantidade de gordura intramuscular, expressão da Δ^9 , Δ^6 e Δ^5 dessaturase e elongase, distribuição e quantidade dos tipos de fibras musculares e metabolismo da biohidrogenação; b) variações entre ingredientes das dietas dos sistemas de terminação, tipo de dieta em relação ao aporte de energia, composição da gordura dos ingredientes em ácidos graxos, disponibilidade de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 (AGs *n-6* e *n-3*), tamanho das partículas e tempo de permanência no trânsito ruminal; c) variações entre as condições ambientais nas quais são submetidos os animais no sistema de terminação envolvendo maior ou menor gasto de energia para a obtenção do bem-estar (DANNENBERGER et al., 2006; SCOLLAN et al., 2006; WOOD et al., 2008; YANG et al., 1999).

A conversão de ácidos graxos saturados (AGS) em ácidos graxos monoinsaturados (AGM), que estão associados à maciez e sabor de carne é realizada pela enzima Estearoil-CoA Dessaturase (SCD) (OLIVEIRA, 2013). Em mamíferos, são registrados em torno de cinco isoformas de SCD, no qual a SCD1 atua nas glândulas mamárias, fígado e tecido adiposo. Já a SCD2, SCD3, SCD4 e SCD5 atuam respectivamente no cérebro, pele e coração (KGWATALALA et al., 2009; OLIVEIRA, 2013). Estearoil-CoA dessaturase (SCD1) é a enzima limitante da velocidade da biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados (AGM). É também conhecida como delta-9-dessaturase, porque catalisa a introdução da primeira ligação dupla cis na posição Δ^9 em um espectro de ácidos graxos saturados (AGS) (NTAMBI, 1999; PAUCIULLO et al., 2012), com preferências para o C16:0 (palmítico) e C18:0 (esteárico). Essa enzima desempenha um papel fundamental no metabolismo de lipídios e de manutenção da fluidez da membrana, com base na importância fisiológica da

relação entre os ácidos graxos saturados e monoinsaturados (FERNANDES et al., 2009).

A enzima SCD é altamente expressa em tecido adiposo, fígado e na glândula mamária de animais em lactação. Na glândula mamária de ruminantes, essa enzima é conhecida por ser responsável pela produção de cerca de 80% das mais comuns formas de ácido linoleico conjugado (CLA, cis-9 trans-11 C18:2 ω 6 isômero) que é segregado no leite (CORL et al., 2001), atuando sobre ácido vacênico circulante (Trans-11 C18:2). O ácido linoléico conjugado tem sido demonstrado que tem vários efeitos benéficos sobre a saúde humana com base em seu potencial anticancerígeno, propriedades antilipogênicas e imunomoduladoras (FERNANDES et al., 2009; PARIZA, 1999).

Vários estudos têm relatado associações significativas entre polimorfismos no gene SCD de bovinos (Estearoil-CoA dessaturase - Δ^9 dessaturase) e composição dos ácidos graxos de carne (tecido intramuscular e depósitos de gordura) e leite (MEDRANO et al., 1999; MELE et al., 2007; TANIGUCHI et al., 2004; ZHANG et al., 2010). Nos ovinos, esse gene é um forte candidato posicional e funcional para um locus de característica quantitativa (QTL) detectado no cromossoma 22 para o ácido linoléico conjugado (CLA), em relação à proporção de ácido graxo vacênico no leite (CARTA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; MIARI et al., 2007).

Em bovinos da raça Japanese Black, Taniguchi et al. (2004) identificaram polimorfismos, por meio de SNPs distintos e classificaram os animais em variantes genéticas VV, VA, e AA e observaram que os tipos AA mostraram quantidade alta de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) entre eles. O tipo da variante da isoforma de SCD contribui para o aumento do teor dos AGM e baixo ponto de fusão da gordura intramuscular. Meles et al. (2007), estudando as mesmas mutações, observaram que no leite as variantes diferiram em AGS, AGM ω 9 e relação ácidos graxos poliinsaturados/saturados

(AGP/AGS), de tal forma que vacas AA mostraram maior quantidade de C18:1 ω 9, AGM e maior relação entre C14: 1 ω 9/C14 do que vacas VV. Kgwatalala et al. (2009) estudaram 14 SNPs no gene SCD1 e identificaram três haplótipos (H1, H2 e H3). Vacas H1 mostraram altos índices de C10:0 e C12:0 e quantidades altas de C10:1 ω 9 e C12:1 ω 9, do que vacas H3. Jiang et al. (2008) também verificaram associação do gene SCD1 com a composição de ácidos graxos da carne e depósitos de gordura em bovinos cruzados Wagyu x Limousin.

2.4.4 Ácido Graxo Sintase (FASN) e Domínio da Tioesterase (TE)

Ácido graxo sintase é a denominação dada para um complexo de sete enzimas, que regulam a síntese de ácidos graxos de cadeia longa codificadas por um único gene localizado no cromossomo 19, que catalisam a formação de ácido palmítico (C16:0), a partir da condensação sequencial de uma molécula de acetil-coA e 7 malonil-CoA, na presença de NADPH (ROSSATO, 2010; ROY et al., 2006; SMITH, 1994; WALKER, 2013).

A expressão do gene FASN, na maioria dos tecidos normais é baixa ou até mesmo ausente, exceto em fígado, tecido adiposo, mamário, durante a lactação, endométrio na fase proliferativa e pulmões dos recém-nascidos (CHIRALA et al., 2001; KUHAJDA et al., 2000; KUSAKABE et al., 2002; ROSSATO, 2010). Ordovás et al. (2008), encontraram um polimorfismo por meio de SNPs do gene da FASN e este, estava relacionado com a modificação no perfil lipídico da gordura do leite de bovinos.

O domínio catalítico da Tioesterase (TE) possui um sulco perto da estrutura do centro catalítico que acomoda a cadeia de ácidos graxos em formação, sendo responsável pela liberação dos ácidos graxos, ao atingirem o comprimento de cadeia ideal, portanto, possui papel fundamental no perfil dos

ácidos graxos sintetizados (ABE et al., 2009; WALKER, 2013) e também é responsável pela reação de síntese dos ácidos C14:0, C12:0 e C10:0. O domínio da TE desempenha um papel crítico na determinação do perfil de ácidos graxos (KIM; NTAMBI, 1999; SOUZA et al., 2012), que é um fator significativo em relação à qualidade da carne (WALKER, 2013), podendo ajudar a produzir carne de bovinos mais saudáveis para o consumo (OZTABAK et al., 2014).

Zang et al. (2008) também identificaram SNP em bovinos, no domínio da Tioesterase (TE). Os bovinos foram genotipados e classificados geneticamente (AA, AG e GG), os animais GG apresentaram no músculo *longissimus dorsi*, baixos percentuais de C14:0, C16:0, total de ácidos saturados e alto conteúdo em C18:1 ω 9 e total de ácidos graxos monoinsaturados do que animais AA. Abe et al. (2009) descrevem para o gene FASN a ocorrência de 8 SNPs, sendo que, 4 mutações conhecidas foram detectadas em bovinos da raça Japanese Black e Limousin. Dessas mutações, duas foram separadas em haplótipos com diferenças significativas na composição de ácido graxo da gordura subcutânea, intermuscular e intramuscular. O haplótipo TW foi associado com aumentos nos valores dos ácidos graxos C18:0 e C18:1 ω 9 e decréscimo em C14:0, C14:1, C16:0 e C16:1.

De forma geral, a relação da composição lipídica do perfil de ácidos graxos influencia no sabor da carne, de acordo com o percentual de monoinsaturados (LABORDE et al., 2001; YEON et al., 2013). Em particular, os ácidos oléico (C18:1 ω 9) compreendem o maior percentual de ácidos graxos no tecido adiposo de bovino com um efeito sobre o sabor (MELTON et al., 1982). Adicionalmente, os ácidos graxos saturados (AGS), tais como os ácidos mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:0) influenciam na ocorrência de doenças cardiovasculares humanas e a concentração de lipoproteína de colesterol de baixa e alta densidade (VLDL e HDL) (TEMME; MENSINK; HORNSTRA, 1997; YEON et al., 2013).

2.4.5 Diacilglicerol Aciltransferase 1 e 2 (DGAT 1 e 2)

Entre as principais enzimas atuantes no metabolismo dos triglicerídeos nos adipócitos, destaca-se a enzima microssomal diacilglicerol aciltransferase, a qual é expressa pelo gene DGAT (CARDOSO, 2008). Essa enzima catalisa a fase final da síntese de triglicerídeos que ocorre na membrana do retículo endoplasmático, afetando o metabolismo de gorduras, incluindo a sua produção e percentual no leite (CASES et al., 1998, 2001; SILVA et al., 2011).

A enzima DGAT (Diacilglicerol Aciltransferase) é encontrada em vários tecidos, mas apresenta maior atividade no fígado, tecido adiposo e glândula mamária lactante (FANG et al., 2012). Nessa mesma enzima, foram identificados dois genes: DGAT1 e DGAT2, ambos catalisam reações semelhantes, mas não possuem nenhuma sequência de nucleotídeos e aminoácidos parecidos (CONTE et al., 2010). A localização de DGAT-1 e de DGAT-2 foi identificada com base nas suas sequências de aminoácidos, sugerido que a predição de DGAT-1 é principalmente na membrana plasmática e DGAT-2 é no retículo endoplasmático (FANG et al., 2012; SUZUKI et al., 2005).

As variantes para o polimorfismos no DNA do gene Diacilglicerol Aciltransferase 1 (DGAT1), que catalisa a reação final dos triglicerídeos, mostraram relação com a composição de gordura e o perfil lipídico (SCHENNINK et al., 2007), em que a variante lisina foi associada com maior quantidade de ácidos graxos saturados (com uma grande fração de C16:0 e pequena fração de C14:0) e baixas quantidades de ácidos graxos insaturados (C18:1 ω 9 e C18:2 ω -6). Uma mutação no exon 8 do gene DGAT-1 na posição 232, gerando a mutação K232A, que provoca a mudança da lisina para alanina na proteína codificada, foi relatada por Grisart et al. (2002), Ross et al. (2007) e Cardoso (2008). Portanto, o alelo K do DGAT1 identificado no leite de gado

holandês, tem sido associado com um elevado teor de ácido graxo palmítico (C16:0), menor teor de mirístico (C14:0), oléico (C18:1 ω 9) e ácido linoléico conjugado (CLA) (SCHENNINK et al., 2007). Além disso, há evidência de polimorfismo K232A no gene DGAT1 que é responsável para um QTL subjacente a várias características de produção leiteira, tais como produção e composição do leite, eficiência na conversão alimentar, resistência a doenças, entre outros aspectos (CONTE et al., 2010; GRISART et al., 2002). De acordo com Fang et al. (2012), o gene DGAT2 tem forte relação com o crescimento dos animais, sendo, portanto, um ótimo marcador genético para características de desenvolvimento corporal.

Diante de todos os fatos demonstrados anteriormente percebe-se que a seleção genética por marcadores SNPs tem um grande potencial e ainda é pouco explorada no Brasil na produção ovina e que os genes CAST, GDF-8, FASN, TE, SCD, DGAT-1 e 2 são excelentes escolhas para estudar essas variações genéticas e entender a sua relação com a qualidade de carne.

REFERÊNCIAS

- AALI, M. et al. Detecting novel SNPs and breed-specific haplotypes at calpastatin gene in Iranian fat- and thin-tailed sheep breeds and their effects on protein structure. **Gene**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 132-139, Mar. 2014.
- ABE, T. et al. Novel mutations of the *fasn* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. **Biochemical Genetics**, New York, v. 47, n. 5/6, p. 397-411, June 2009.
- ALCALDE, M. J.; NEGUERUELA, A. I. The influence of final conditions on meat colour in light lamb carcasses. **Meat Science**, Barking, v. 57, n. 2, p. 117-123, Feb. 2001.
- ALEXANDER, L. J. et al. Limousin specific myostatin allele affects longissimus muscle area and fatty acid profiles in a Wagyu-Limousin F2 population. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1576-1581, May 2008.
- ALMEIDA, L. S. **Análise molecular do gene crtap através da técnica de pcr-sscp-sequenciamento em pacientes com osteogênese imperfeita do Espírito Santo**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.
- AMARAL, R. M. et al. Deposição tecidual em cordeiros Santa Inês, ½ Dorper-Santa Inês e ½ White Dorper-Santa Inês avaliados por ultrassonografia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 658-669, jul./set. 2011.
- AMORIM, J. A. **Levantamento de sarcófagos (diptera) do Brasil incluindo a caracterização molecular de peckia (pattonella) intermutans (Walker)**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS. **Padrões raciais**. Disponível em: <<http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/index.asp>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- ÁVILA, V. S. de et al. O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 11, n. 11, p. 2419-2426, jun. 2013.

BAGATOLI, A. **Expressão gênica da calpastatina e miostina associada com o desempenho e qualidade da carne em ovinos**. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

BARENDSE, W. et al. Epistasis between calpain 1 and inhibitor calpastatin within breeds of cattle. **Genetics**, Baltimore, v. 176, n. 4, p. 2601-2610, Aug. 2007.

BASTOS, A. Q. Q. **Polimorfismo pro12ala do gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPARG) e fatores de risco para doenças cardiovasculares em escolares**. 2010. 153 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

BELLINGE, R. H. et al. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. **Animal Genetics**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 1-6, Feb. 2005.

BELLUZO, C. E. C.; KANETO, C. N.; FERREIRA, G. M. **Curso de atualização em ovinocultura**. Araçatuba: UNESP, 2001. 110 p. Disponível em: <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/curso_atualizacao_ovinocultura_unesp_2001.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2015.

BONAGURIO, S. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com texel abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 1981-1991, jun. 2003.

BORGES, B. O. **Marcadores moleculares associados à qualidade de carne em bovinos nelore**. 2013. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

BORGES, I.; GONÇALVES, L. C. **Manual prático de caprino e ovinocultura**. Belo Horizonte: UFMG/Escola de Veterinária, 2002. 111 p. Apostila.

BRANDÃO, H. M. **Atividade enzimática em distintos depósitos de gordura de diferentes grupos genéticos de ovinos**. 2002. 76 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

BRESSAN, M. C. et al. Efeito do peso ao abate de cordeiros santa inês e bergamácia sobre as características físico-químicas da carne. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 293-303, set./dez. 2001.

BRITO, P. H.; EDWARDS, S. V. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. **Genetica**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 439-455, Apr. 2009.

BUCCI, M. et al. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, Taguatinga, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2005.

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

CALVO, J. H. et al. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 2, p. 775-782, Feb. 2014.

CARDOSO, S. R. **Análises de polimorfismos dos gens DGAT-1 e LEP no desempenho produtivo em bovinos leiteiros da raça girolando**. 2008. 45 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

CARREIRO, C. M. **Origem e diversidade genética de ovinos (ovis aries) crioulos na região do pantanal/MS, Brasil**. 2012. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CARTA, A. et al. Investigating the genetic component of fatty acid content in sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 22-28, Sept. 2008.

CASAS, E. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 520-525, Mar. 2006.

CASES, S. et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase and related family members. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 42, p. 8870-8876, Oct. 2001.

CASES, S. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 95, n. 22, p. 13018-13023, Oct. 1998.

CHIRALA, S. S. et al. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 6, p. 3104-3108, Mar. 2001.

CHOY, Y. S. et al. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. **Annals of Human Genetics**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 383-391, Sept. 1999.

CIÉSLAK, D. et al. Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Czech Journal of Animal Sciences**, Prague, v. 48, n. 2, p. 69-75, 2003.

CIOBANU, D. C. et al. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 2829-2839, Oct. 2004.

COCKETT, N. E. et al. The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 37, p. 65-81, 2005. Supplement 1.

CONTE, G. et al. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 753-763, Feb. 2010.

CORL, B. A. et al. The role of D9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 11, p. 622-630, Nov. 2001.

CORRADELLO, E. F. A. **Criação de ovinos**: antiga e contínua atividade lucrativa. São Paulo: Ícone, 1988. 124 p.

COSTA, A. P. P. et al. Estudo de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 112-131, jan. 2007.

COSTA, R. G. et al. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 497-506, jul./set. 2008.

COSTA, R. G. et al. Qualidade física e sensorial da carne de cordeiros de três genótipos alimentados com rações formuladas com duas relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 1781-1787, set. 2011a.

COSTA, R. G. et al. Salted goat and lamb meat: typical regional product of the city of Petrolina, state of Pernambuco. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 98, n. 1/3, p. 51-54, June 2011b.

CRAWFORD, A. M. et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, Baltimore, v. 140, n. 2, p.703-724, June 1995.

DANNENBERGER, D. et al. Carcass-and meat quality of pasture x concentrate fed Simmental and Holstein bulls. **Archive Tierzucht**, Dummerstorf, v. 49, n. 4, p. 315-328, July/Aug. 2006.

DRANSFILD, E. Modelling postmortem tenderization-V: inactivation of calpains. **Meat Science**, Barking, v. 37, n. 3, p. 391-409, 1994.

DUTRA, M. P. et al. Technological and quality characteristics of cooked ham-type pâté elaborated with sheep meat. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 115, n. 3/4, p. 56-61, Oct. 2013.

ESTEVEVES, R. M. G. et al. Avaliação *in vivo* e da carcaça e fatores determinantes para o entendimento da cadeia da carne ovina. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 16, n. 1/4, p. 101-108, jan./dez. 2010.

FANG, X. et al. Polymorphisms of diacylglycerol acyltransferase 2 gene and their relationship with growth traits in goats. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 1801-1807, Feb. 2012.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agricultural outlook 2014-2023**. Rome: OECD/FAO, 2014. 326 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1024963/1025740/OECD-FAO_Agricultural_Outlook_2014-2023/20082926-0f88-4159-970a-2a1c65795c47>. Acesso em: 16 jul. 2015.

FORTES, M. R. S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem São Paulo**. 2007. 87 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FULZELE, S. et al. Role of myostatin (GDF-8) signaling in the human anterior cruciate ligament. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 28, n. 8, p. 1113-1188, Aug. 2010.

GABOR, M.; TRAKOVICKA, A.; MILUCHOVA, M. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. **Lucrari Stiintificw: Zootehnie si Biotehnologii**, Timisoare, v. 42, n. 2, p. 470-476, 2009.

GAMA, L. T. **Melhoramento genético animal**. Lisboa: Escolar, 2002. 306 p.

GAN, S. Q. et al. Association of SNP haplotypes at the myostatin gene with muscular hypertrophy in sheep. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Korea, v. 21, n. 7, p. 928- 935, July 2008.

GRISART, B. et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, New York, v. 12, n. 2, p. 222-231, Feb. 2002.

GRISOLIA, A. B. et al. Myostatin (GDF8) single nucleotide polymorphisms in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 3, p. 822-830, 2009.

GOLL, D. E. et al. The calpain system and skeletal muscle growth. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 78, n. 4, p. 503-512, 1992.

GOLL, D. E. et al. The calpain system. **Physiological Reviews**, Washington, v. 83, n. 3, p. 731-801, July 2003.

GORBACH, D. **The prediction of single nucleotide polymorphisms and their utilization in mapping traits and determining population structure in production animals.** 2011. 271 p. Dissertation (Master in Genetics) - Iowa State University, Iowa, 2011.

GUERRA, M. S. C. **Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do gene humano TPI (triosefosfato isomerase).** 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Médica) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

GUIZONI, D. M. et al. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 266-271, 2010.

HADJIPAVLOU, G. et al. Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. **International Society for Animal Genetics, Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 346-353, Aug. 2008.

HAN, J. et al. Effect of Myostatin (MSTN) g+6223G>A on production and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, Korea, v. 23, n. 7, p. 863- 866, July 2010.

HAYASHI, K. et al. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. **Genetic Analysis Techniques and Applications**, New York, v. 9, n. 3, p. 73-79, June 1992.

HEDIGER, R.; ANSARI, R. H.; STRANZIGER, G. F. Chromosome banding and gene localizations support extensive conservation of chromosome structure between cattle and sheep. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 57, n. 2/3, p. 127-134, 1991.

HICKFORD, J. G. et al. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Animal Genetics**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 64-72, Feb. 2010.

HOLANDA, M. T. **Frequências dos polimorfismos dos genes do interferon gama (ifng +874 t/a) e do óxido nítrico sintase induzida (nos2a -954g/c) em 313 pacientes na fase crônica da doença de chagas e associação com presença e gravidade de cardiopatia.** 2013. 105 p. Tese (Doutorado em Cardiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

JIANG, Z. et al. Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. **International Journal Biological Sciences**, Lake Haven, v. 4, n. 6, p. 345-351, Sept. 2008.

JOHNSON, P. L. et al. Investigations into the GDF8 g+6273 G-A polymorphism in New Zealand Texel sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 6, p. 1856-1864, June 2009.

KAKAVAS, V. K. et al. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 38, n. 2, p. 155-163, Feb. 2008.

KAMBADUR, R. et al. Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian blue and piedmontese cattle. **Genome Research**, New York, v. 7, n. 9, p. 910-915, Sept. 1997.

KANIA, M. G. Effect of calpastatin gene polymorphism on lamb growth and muscling. **Annals of Animal Science**, Beijing, v. 12, n. 1, p. 63-72, Nov. 2012.

KGWATALALA, P. M. et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 3'UTR SNPs and their influence on milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 126, n. 5, p. 394-403, Oct. 2009.

KHAN, S. H. et al. Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkhi and Kajli sheep and Beetal goat Breeds. **Pakistan Journal Zoologia**, Lahore, v. 44, n. 2, p. 377-382, 2012.

KIJAS, E. T. J. W. et al. Evidence for multiple alleles affecting muscling and fatness at the ovine gdf8 locus. **BMC Genetics**, London, v. 8, n. 80, p. 1-11, Nov. 2007.

KIM, Y. C.; NTAMBI, J. M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 266, n. 1, p. 1-4, Dec. 1999.

KITS, B. B.; SANTOS, C. E.; DRUM, M. **Anuário brasileiro da pecuário 2104**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2014. 64 p.

KOOHMARAIE, M. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 3071-3080, Oct. 1992.

KOOHMARAIE, M. et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 4, p. 345-352, Aug. 2002.

KOOHMARAIE, M.; SEIDMAN, S. C. Effect of post mortem storage on Ca⁺⁺ dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. **Meat Science**, Barking, v. 19, n. 1, p. 187-196, 1987.

KORINGA, P. G. et al. Transcriptome analysis and SNP identification in SCC of horn in (*Bos indicus*) Indian cattle. **Gene**, Amsterdam, v. 530, n. 1, p. 119-126, Nov. 2013.

KUCHTIK, J. et al. Effect of the stage of lactation on milk composition, its properties and the quality of rennet curdling in East Friesian ewes. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 53, n. 2, p. 55-63, 2008.

KUHAJDA, F. P. et al. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. **Nutrition**, Burbank, v. 16, n. 3, p. 202-208, Mar. 2000.

KUKITA, Y. et al. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. **Human Mutation**, New York, v. 10, n. 5, p. 400-407, 1997.

KUSAKABE, T. et al. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. **Histopathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 71-79, Jan. 2002.

LABORDE, F. L. et al. Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 355-365, Feb. 2001.

LAGONIGRO, R. et al. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 371-374, Oct. 2003.

LIMA, L. S. **Identificação de polimorfismos em ESTs da interação cacau-Moniliophthora pernicioso**. 2007. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

LI, X. L. et al. SNP Identification and analysis in part of intron 2 of goat MSTN gene and variation within and among species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, n. 3, p. 285-289, May/June 2006.

MADRUGA, M. S. et al. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 1838-1844, abr. 2006.

MADRUGA, M. S. et al. Perfil aromático e qualidade química da carne de caprinos Saanen alimentados com diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 936-943, maio 2008.

MADRUGA, M. S. et al. Qualidade da carne de cordeiros santa Inês terminados com diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 309-315, jan. 2005.

MARSHAL, D. M. Genetics of meat quality. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. (Ed.). **The genetics of cattle**. New York: CABI, 1999. chap. 21, p. 605-636.

MARTÍNEZ-CEREZO, S. et al. Breed, slaughter weight and ageing time effects on consumer appraisal of three muscles of lamb. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 4, p. 797-805, Apr. 2005.

MARTINS, V. N.; MARCHETTI, M. E.; GARCIA, R. G. Qualidade da carne de ovinos: depende do bem-estar do animal na produção. In: SIMPÓSIO DE REDES DE SUPRIMENTOS E LOGÍSTICA, 1., 2015, Grande Dourados. **Anais...** Grande Dourado, 2015. p. 74-81.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, London, v. 387, n. 6328, p. 83-90, May 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, Nov. 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 109, n. 5, p. 595-601, Mar. 2002.

MEDRANO, J. F. et al. Genetic modification of the composition of milk fat: Identification of polymorphisms within the bovine stearoyl-CoA-desaturase gene. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 71-72, 1999. Supplement 1.

MELES, M. et al. Stearoyl-Coenzyme a desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4458-4465, Sept. 2007.

MELTON, S. L. et al. Flavor and selected chemical components of ground beef from steers backgrounded on pasture and fed corn up to 140 days. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 699-704, May 1982.

MENDES, B. V. **Raças de ovinos, caprinos e bovinos tropicais**. Brasília: ABEAS, 2000. 76 p.

MENDIAS, C. L.; BAKHURIN, K. I.; FAULKNER, J. A. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 1, p. 88-393, Jan. 2008.

MIARI, S. et al. Do polymorphisms at the Scd gene affect the C18:2 cis 9 trans 11 content in sheep milk fat? In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA): FROM EXPERIMENTAL MODELS TO HUMAN APPLICATION, 2., 2007, Villasimius. **Proceedings...** Villasimius, 2007. p. 19-22.

MONTE, A. L. S. et al. Parâmetros físicos e sensoriais de qualidade da carne de cabritos mestiços de diferentes grupos genéticos. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 233-238, abr./jun. 2007.

MONTE, A. L. S. et al. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 8, n. 3, p. 11-17, jul./set. 2012.

MORIN, P. A.; MARTIEN, K. K.; TAYLOR, B. L. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 66-73, Jan. 2009.

NOCCHI, E. D. G. **Os efeitos da crise da lã no mercado internacional e os impactos sócio-econômicos no município de Santana do Livramento**. 2001. 71 f. Dissertação (Mestrado em Integração e Cooperação Internacional) - Universidad Nacional de Rosario, Rosário, 2001.

NTAMBI, J. M. Regulation of Stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 40, n. 9, p. 1549-1558, Sept. 1999.

- OJOPI, E. P. B. et al. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista Psiquiátrica Clínica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2004.
- OLIVERIA, D. M. **Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com fontes de lipídeos**. 2013. 147 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- OLIVEIRA, R. V. et al. **Manual de criação de caprinos e ovinos**. Brasília: Codevasf, 2011. 142 p.
- ORDOVÁS, L. et al. The g.763G-C SNP of the bovine FASN gene affects its promoter activity: implications for the bovine lactating mammary gland. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 34, n. 2, p. 144-148, July 2008.
- ORITA, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 8, p. 2766-2770, Apr. 1989.
- OZTABAK, K. et al. FASN gene polymorphism in indigenous cattle breeds of Turkey. **Folia Biologica**, Krakow, v. 62, n. 1, p. 29-35, 2014.
- PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, Dec. 2002.
- PAIVA, S. R.; PIMENTEL, C. M. Uso de marcadores como ferramenta adicional para conservação e melhoramento da raça Santa Inês. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracaju. **Anais...** Aracajú: SNPA, 2008. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/894697/1/AACUsodemarcadores.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2015.
- PALMER, B. R. et al. Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 1499-1500, May 1998.
- PALMER, B. R. et al. Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. **Animal Biotechnology**, New York, v. 11, n. 1, p. 63-67, 2000.

PAN, H. et al. Association of myostatin gene polymorphisms with obesity in Chinese north Han human subjects. **Gene**, Amsterdam, v. 494, n. 2, p. 237-241, Feb. 2012.

PARIZA, M. W. The biological activities of conjugated linoleic acid. In: YURAWECZ, M. P. (Ed.). **Advances in conjugated linoleic acid research**. Champaign: AOCS Press, 1999. v. 1, chap. 1, p. 12-20.

PAUCIULLO, A. et al. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of river buffalo stearyl CoA desaturase gene (SCD) is associated with milk yield. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 79, n. 4, p. 429-435, Nov. 2012.

PEREIRA, C. I. A. **Estudo de polimorfismos associados ao aumento da expressão de Hemoglobina Fetal (HbF)**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. A. **Considerações sobre carcaças ovinas**. Lavras: UFLA, 2002. (Boletim técnico, 61). Disponível em: <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-61.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

PINHEIRO, R. S. B. et al. Qualidade de carnes provenientes de cortes da carcaça de cordeiros e de ovinos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1790-1796, set. 2009.

PINTO, C. M. M. C. S. **Modelação do risco trombótico da produção portuguesa portadora de FV Leiden por duas variantes alélicas do gene do fibrogénio gama**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

RAJATILEKA, S. et al. Detection of three closely located single nucleotide polymorphisms in the EAAT2 promoter: comparison of single-strand conformational polymorphism (SSCP), pyrosequencing and Sanger sequencing. **BMC Genetics**, London, v. 15, n. 80, p. 1471-2156, July 2014.

RANJBARI, M. et al. Allelic polymorphism of Makoei sheep calpastatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. **Journal of Agricultural Science & Technology**, New York, v. 14, n. 3, p. 533-538, 2012.

ROÇA, R. O.; SERRANO, A. M. Abate de bovinos: conversão do músculo em carne. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 7, set./out. 1994.

RONG, D. U. et al. Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep. **Science in China Series C-Life Sciences**, Beijing, v. 50, n. 5, p. 648-654, Oct. 2007.

ROSS, A. P. W. D. et al. Breeding value estimation for fat percentage using dense markers on Bos Taurus autosome 14. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 4821-4829, Oct. 2007.

ROSSATO, F. A. **Avaliação da morte celular induzida por inibidores da enzima ácidos graxos sintase em linhagem celular derivada de melanoblastos não tumorigênicos de camundongos**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

SANTOS, J. C. G. et al. Polimorfismos no gene CAST em diferentes raças de ovinos do Mato Grosso do Sul, Brasil. In: ENCONTRO DE ENSINO E PESQUISA E EXTENSÃO, 8., 2014, Dourado. **Resumos...** Dourados: UFGD, 2014. v. 1, p. 1-14.

SCHAFFER, A.; HAWKINS J. R. DNA variation and the future of human genetics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 33-39, Jan. 1998.

SCHENKEL, F. S. et al. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatina gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 291-299, Feb. 2006.

SCHENKEL, F. S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 2009-2020, Sept. 2005.

SCHENNINK, A. et al. *DGATI* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. **Animal Genetics**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 467-473, Oct. 2007.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 1, p. 63-69, Jan. 2004.

SCOLLAN, N. et al. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality: review. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p.17-33, Sept. 2006.

SHACKELFORD, S. D. et al. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 171-177, Jan. 1991.

SILVA, S. C. C. et al. Frequencia alélica e genotípica do gene *dgat1* em uma população de bovinos de leite. **Archivos Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 232, p. 1343-1346, dez. 2011.

SILVA SOBRINHO, A. G. da. et al. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 1070-1078, mar. 2005.

SILVA SOBRINHO, A. G. da. **Tópicos em ovinocultura**. Jaboticabal: UNESP/FCAV, 1993. 179 p. Apostila.

SILVEIRA, E. O. da. **Comportamento ingestivo e produção de cordeiros em pastagem de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) manejada em diferentes alturas**. 2001. 152 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SIQUEIRA, E. R. et al. Características sensoriais da carne de cordeiros das raças Hampshire Down, Santa Inês e mestiços Bergamácia x Corriedale abatidos com quatro distintos pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 1269-1272, mar. 2002.

SMITH, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, n. 15, p. 1248-1259, Dec.1994.

SOUZA, F. R. P. et al. Associations of *FASN* gene polymorphisms with economical traits in Nellore cattle (*Bos primigenius indicus*). **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 12, p. 10097-10104, Dec. 2012.

SULEMAN, M. et al. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 11, n. 47, p. 10655-10660, June 2012.

SUNNUCKS, P. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 1699-1710, Nov. 2000.

SUZUKI, R. et al. Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 5, p. 3331-3337, Feb. 2005.

TANIGUCHI, M. et al. Genotype of SCD is associated with fatty acid composition in Japanese black cattle. **Mammalian Genome**, New York, v. 14, n. 2, p. 142-148, Feb. 2004.

TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla: I determinação genética. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Montevideo, v. 14, n. 1, p.17-23, 2006.

TEMME, E. H.; MENSINK, R. P.; HORNSTRA, G. Effects of medium chain fatty acids (MCFA), myristic acid, and oleic acid on serum lipoproteins in healthy subjects. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 38, n. 9, p. 1746-1754, Sept. 1997.

TOLEDO, E. R. et al. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Revista Brasileira de Biomedicina**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 107-114, 2008.

VIEIRA, T. R. L. L. et al. Propriedades físicas e sensoriais da carne de cordeiros Santa Inês terminados em dietas com diferentes níveis de caroço de algodão integral (*Gossypium hirsutum*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 372-377, abr./jun. 2010.

WALKER, C. C. **Genotipagem dos genes estearoil-coa dessaturase (SCD1) e ácido graxo sintase (FASN) em raças bovinas e sua associação com a composição de ácidos graxos na raça brangus**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

WALLING, G. A. et al. Confirmed linkage for QTLs affecting muscling in Texel sheep on chromosomes 2 and 18. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION, 52., 2001, Budapest. **Proceedings...** Budapest, 2001. p. 5-6.

WANG, J. et al. Variation in the ovine WFIKKN2 gene. **Gene**, Amsterdam, v. 543, n. 1, p. 53-57, June 2014.

WHITE, S. N. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos Taurus*, and crossbred descent. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 2001-2008, Sept. 2005.

WOOD, J. D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, Barking v. 66, n. 1, p. 21-32, Jan. 2003.

WOOD, J. D. et al. Fat deposition fatty acid composition and meat quality: a review. **Meat Science**, Barking v.78, n. 4, p. 343-358, Apr. 2008.

YANG, A. et al. Delta9 desaturase activity in bovine subcutaneous adipose tissue of different fatty acid composition. **Lipids**, Chicago, v. 34, n. 9, p. 971-978, Sept. 1999.

YEON, S. H. et al. Genetic variation of FASN is associated with fatty acid composition of Hanwoo. **Meat Science**, Barking, v. 94, n. 1, p. 133-138, May 2013.

ZEN, S. de; SANTOS, M. C. dos; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura. **Boletim Ativos da Pecuária de Caprino e Ovinocultura**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 1-3, set. 2014.

ZHANG, C. L. et al. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene polymorphism in goat breeds. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, n. 9/10, p. 822-828, Oct. 2010.

ZHANG, S. et al. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 62-70, Feb. 2008.

ZHOU, H.; HICKFORD, J. G. H.; GONG, H. Allelic polymorphism of the caprine calpastatin (CAST) gene identified by PCR-SSCP. **Meat Science**, Barking, v.79, n. 2, p. 403-405, June 2008.

ZHOU, H.; HICKFORD, J. G. H.; GONG, H. Polymorphism of the ovine calpastatin gene. **Molecular and Cell Probes**, London, v. 21, n. 3, p. 242-244, June 2006.

CAPÍTULO 2 Prospecção e caracterização de polimorfismo de genes relacionados ao desenvolvimento muscular e maciez da carne

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, avaliar o polimorfismo por análise de mutações pontuais (SNPs) de dois genes (Calpastatina – CAST e Miostatina - GDF8) relacionados à maciez e ao desenvolvimento muscular. Para o experimento, foram utilizados um total de 84 ovinos machos, constituídos de seis grupos genéticos, sendo estes derivados do cruzamento entre as raças: Santa Inês x Santa Inês, Santa Inês x Black Dorper, Santa Inês x White Dorper, Santa Inês x Texel, Santa Inês x Lacaune e Santa Inês x East Friesian. Desta forma, o delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), com 6 (seis) tratamentos correspondendo aos cruzamentos com 14 (quatorze) repetições, onde cada animal foi considerado uma repetição. Para análise molecular, o DNA genômico foi extraído do tecido sanguíneo dos animais e os genes foram amplificados por meio da técnica de PCR. Para identificação dos polimorfismos, foi utilizada a técnica de PCR-SSCP, que identificou diferentes padrões visualizados no gel de poliacrilamida. Para cada padrão diferente identificado, os produtos foram encaminhados para sequenciamento e analisados, usando software livre Sequence Scanner Software (Applied Biosystems). Os dados foram analisados determinando os valores de frequência absoluta e relativas, a partir dos polimorfismos identificados em cada grupo genético. A técnica de SSCP detectou quatro padrões de banda no gene CAST e três padrões de bandas no gene GDF-8. No gene CAST, as frequências dos genótipos observadas foram 7,14%, 20,24%, 71,43% e 1,19% para AA, AB, BB e BC, respectivamente. O sequenciamento de cada amostra evidenciou a presença de 7 polimorfismos, dos quais dois polimorfismos (c.227A>G; c.383A>G), resultaram na troca do ácido glutâmico por glicina e treonina por alanina respectivamente. Já, para o gene GDF-8 foram observados que as frequências genotípicas foram respectivamente 9,53%; 73,81% e 16,66% para DD, DE e FF. Os dados obtidos após o sequenciamento de cada amostra evidenciaram a presença de 4 polimorfismos, nos quais não resultaram mudança na proteína. Os dois genes estudados apresentaram diversos polimorfismos, demonstrando a variabilidade em relação aos grupos genéticos estudados e que estes podem estar associados a modificações em relação às características de crescimento e qualidade da carne de ovinos.

Palavras-chave: Marcador molecular. Calpastatina. Miostatina.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the polymorphism by analysis of point mutations (SNPs) of two genes related to softness and muscle development (calpastatin - CAST and myostatin - GDF8). For the experiment, we used a total of 84 male sheep, made up of six genetic groups, which are derived from a cross between the races: Santa Ines x Santa Ines, Santa Inês x Dorper Black, White Dorper x Santa Inês, Santa Inês x Texel, Santa Inês x Lacaune and Santa Inês x East Friesian. Thus, the design was completely randomized (DIC), with six (6) treatments corresponding to intersections with fourteen (14) repetitions, where each animal was considered a repeat. For molecular analysis, genomic DNA was extracted from blood and animal tissue of the genes were amplified by PCR. To identify polymorphisms, we used the PCR-SSCP technique, which identified different patterns displayed on a polyacrylamide gel. For each different pattern identified, the products were sent to sequencing and analyzed using free software Sequence Scanner Software (Applied Biosystems). Data were analyzed by determining the absolute frequency values, at each genetic polymorphisms identified group. The SSCP technique four band patterns detected in the CAST gene and three patterns of bands on the GDF-8 gene. In the CAST gene frequencies of the genotypes observed were 7,14%, 20,24%, 71,43% and 1,19% AA, AB, BB and BC. In the CAST gene frequencies of the genotypes observed were 7.14%, 20.24%, 71.43% and 1.19% AA, AB, BB and BC, respectively. The sequencing of each sample showed the presence of seven polymorphisms, of which two polymorphisms (c.227A> G; c.383A> G) resulted in the substitution of glutamic acid for glycine and threonine with alanine respectively. As for the GDF-8 gene was observed that the genotype frequencies were respectively 9.53%; 73.81% and 16.66% for DD, DE, FF. The data obtained after the sequencing of each sample revealed the presence of polymorphisms 4, which resulted in no change in the protein. The two genes studied showed several polymorphisms demonstrating the variability in relation to the studied genetic groups and that these may be associated with changes regarding the growth characteristics and quality of sheep meat.

Keywords: Molecular marker. Calpastatin. Myostatin.

1 INTRODUÇÃO

Na produção animal, o aumento da musculatura sempre foi um dos maiores desafios para os pesquisadores e criadores, sendo uma das principais metas nos programas de melhoramento genético (TEIXEIRA; OLIVEIRA; QUIRINO, 2006). Atualmente, como resultado de intensa seleção por muitas gerações têm-se animais que apresentam musculatura desenvolvida, dentre os quais se destacam os bovinos, ovinos e suínos (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2007).

As características qualitativas da carne mostram, normalmente, uma herdabilidade média a alta (MARSHALL, 1999), mas apresentam o inconveniente de serem de difícil avaliação *in vivo*, dificultando a seleção para esses caracteres. O desenvolvimento recente das ferramentas de biologia molecular abre novas perspectivas no melhoramento dos caracteres qualitativos da carne, pois vários marcadores genéticos estão sendo estudados e são promissores como auxiliares nos programas de seleção. Nesse contexto, os genes reguladores do complexo calpaína/calpastatina, assim como outros genes associados ao desenvolvimento muscular (miostatina), apresentam potencial como possíveis genes candidatos a serem utilizados em programas de seleção assistida por marcadores, visando à melhoria da maciez e outros parâmetros de qualidade da carne.

A composição e a qualidade da carne atualmente são características importantes para se determinar a aceitação de novas raças e cruzamentos, além da aplicação de novos métodos de manejo e sistemas de produção animal (ZAPATA et al., 2000).

Os estudos de caracterização de genes associados direta ou indiretamente com aspectos produtivos permitem realizar o mapeamento genético em ovinos, direcionando os programas de melhoramento com vistas a

atender não somente as características quantitativas como também as características qualitativas de carcaça e carne.

Conduziu-se este estudo, com o objetivo de avaliar o polimorfismo dos genes da calpastatina (CAST) e miostatina (GDF8) em diferentes grupos genéticos de ovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais-CEUA/UFLA registrado sob nº 102/12 (ANEXO A).

2.2 Local do experimento

O trabalho foi executado na Universidade Federal de Lavras, no setor de Ovinocultura.

As análises dos genes em estudo foram realizadas no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, situada em Lavras - Minas Gerais

2.3 Animais

Foram utilizados 84 cordeiros, sendo 14 animais (Santa Inês puros -SI) e 70 mestiços: 16 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Black Dorper - BD); 12 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ White Dorper - WD); 19 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Texel - TX); 14 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Lacaune - LCI); 9 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ East Friesian - EF) oriundos de matriz Santa Inês e seis diferentes reprodutores foram usados neste estudo.

Os cordeiros nasceram entre o final de julho a setembro (2012), e o período experimental iniciou quando os cordeiros pesavam, em média $24,19 \pm 2,46$ kg e 3 meses de idade. Os cordeiros foram alimentados com dietas contendo 80% de concentrado e 20% de volumoso, com dieta à base de feno de

aveia, casca de café, farelo de soja, milho, calcário, suplemento mineral e Rumensin® e gordura bypass (Megalac) a 5,3% da ração.

Para a realização dos estudos relacionados à avaliação dos genes, foi realizada a coleta de sangue individual antes do abate. Os ovinos foram abatidos com peso vivo de $43,99 \pm 1,21$ kg, em condições adequadas de abate, conforme a IN 03 de 07/01/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2000), que normatiza o abate humanitário das espécies de açougue e segundo as boas práticas de fabricação para obtenção de carnes com padrões sanitários para o consumo. Os animais antes do abate foram submetidos a um período de 24h de descanso, jejum e dieta hídrica.

Imediatamente após coleta, os tubos contendo as amostras de sangue foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 3000xg por 15 minutos a 5°C, para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para microtubos plásticos, identificados e armazenados a -80°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

2.4 Extração de DNA genômico

Antes do abate, foram coletados 5 mL de sangue dos ovinos em tubos contendo EDTA potássio [50 µL de EDTA (K₃) a 15%]. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de - 80°C. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Regitano (2001).

A concentração e a pureza do DNA extraído foram quantificadas, recorrendo-se à determinação das absorvâncias a 260nm (A260) e a 280nm (A280) num espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer UV/Vis. As amostras foram diluídas com água estéril, para se obter a concentração final pretendida de 10 ng de DNA/µL. Em seguida, foi realizado o

preparo do gel de integridade, sendo confirmado excelente qualidade do DNA genômico.

2.5 Amplificação do DNA

Para a realização dos estudos de DNA, foi efetuada uma pesquisa na literatura, na qual, foram obtidos dois primers para os genes a serem avaliados (CAST (éxon 1) e GDF-8 (éxon 1)), conforme encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes CAST, GDF-8

Gene	Extensão do fragmento (PB)	do Primer <i>Forward</i> (5'-3')	Primer <i>Reverse</i> (5'-3')	Autores	Espécie
CAST	622	TGGGGCCCAATGACG	CCATCGATG	Palmer et al. (1998)	<i>Ovis aries</i>
		GGTGGAGCAGCACTT	CTGATCACC		
GDF8	561	CTGAGGGGAAAAGCAT	ATCAAC	Crisà et al. (2003)	<i>Bovinae</i>
		CCAGCAACAATCAGC	ATAAATAG		

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada a partir de 50 ng de DNA genômico em um volume final de 25 µl, contendo 1 × tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1,25U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, e 0,5 µM de cada primer e H₂O. As reações de PCR foram executadas por um termociclador (Mastercycler - Eppendorf) com o seguinte perfil térmico de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de

95°C durante 30 s, 61°C e 60°C respectivamente para cada gene citado durante 30s e 72°C durante 30s. O prolongamento final foi de 2 min a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% usando tampão TAE e 1 × coloração com 200 ng / ml de brometo de etídio.

Cada PCR foi realizado em volume final de 25 µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 50ng de DNA genômico, 0,20µM de cada primer, 10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e 1,25 UI de Taq DNA polimerase.

O protocolo padrão para as amplificações foi: 5 minutos para desnaturação inicial a 95°C, 30 segundos para desnaturação a 95°C, tempo e temperatura de anelamentos dos primers (61°C e 60°C) respectivamente para CAST e GDF-8, 1 minuto para extensão a 72°C, 2 minutos para extensão final a 72°C. Os passos 2 (denaturação), 3 (anelamento) e 4 (extensão), correspondem a um ciclo, o qual foi repetido 35 vezes. As reações ocorreram no termociclador (MasterCycler - Eppendorf, USA) sob condições pré-estabelecidas.

Os produtos amplificados foram, posteriormente, submetidos a eletroforese em gel de agarose. Os produtos PCR obtidos para os diferentes *primers* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em 1x TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0, e 1 mM EDTA) com 0.8 µg/mL de brometo de etídeo e os resultantes perfis eletroforéticos foram visualizados no gel e fotodocumentados em sistema (*Spectroline Ultraviolet Transilluminator*).

2.6 Eletroforese em gel de Poliacrilamida/Triagem de mutações

A triagem de mutações do gene CAST e do GDF-8 foi realizada pelo método comparativo de SSCP (Polimorfismo de conformação de cadeia simples), no qual adicionou 1 µL de cada produto de PCR foi diluído em 10 µL de tampão desnaturante (98% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de

bromofenol e 0,05% xilenocianol). Após a desnaturação a 95°C ,durante 5 min, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e, em seguida, aplicadas no gel de acrilamida:bisacrilamida (37.5: 1) 12,5%. As amostras foram eletroforisados em cuba vertical (HoeferTM Minive), sob 10°C em 0,5 × tampão TBE durante 48 h e 6h, respectivamente para CAST e GDF-8 a 300 V num ambiente de 10°C. Os géis foram corados de acordo com Byun et al. (2009).

2.7 Sequenciamento e análise dos dados

As amostras obtidas da análise de PCR-SSCP, de acordo com cada padrão apresentado nos gel foram enviadas para empresa especializada em sequenciamento Myleus Biotecnologia em Belo Horizonte-MG. O sequenciamento foi feito por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, pelo método capilar descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Os dados gerados foram estudados e analisados por programas computacionais, por meio do software livre Sequence Scanner Software (Applied Biosystems[®]). Foi utilizado para analisar os esferogramas o site JustBio (2015) o qual forneceu ferramentas computacionais para realizar o alinhamento das sequencias nucleotídicas com dedução dos aminoácidos correspondentes.

A busca por similaridade foi realizada utilizando a ferramenta computacional BLAST, com sequências armazenadas no GenBank[®].

Foi utilizada a ferramenta *Orf Finder* do NCBI (National Center for Biotechnology Information), para transformar as sequências de nucleotídeos em proteínas e, em seguida, a ferramenta Clustal ômega para alinhamento das sequências proteicas.

2.8 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados por meio da determinação dos valores de frequência absoluta e relativa, a partir dos polimorfismos identificados em cada gene de cada grupo genético. A frequência absoluta correspondeu à ocorrência do número absoluto de determinado padrão polimórfico, enquanto a frequência relativa correspondeu à porcentagem desses padrões em cada grupo genético.

A determinação da frequência alélicas foi calculada pela contagem direta, definida como a proporção dos diferentes alelos de um gene na população diplóide total, de acordo com a fórmula abaixo:

$$f(A_1) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de alelos } A_1}{\text{n}^\circ \text{ total de alelos}} \quad f(A_2) = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de alelos } A_2}{\text{n}^\circ \text{ total de alelos}}$$

Onde, $f(A_1)=p$ e $f(A_2)=q$, sendo $p+q=1$ (RAMALHO et al., 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prospecção e a caracterização de polimorfismos (SNPs) foi baseada em PCR convencional associada à técnica de SSCP, o que possibilitou a seleção de amostras para serem sequenciadas.

Tanto em caprinos quanto em bovinos, o polimorfismo em várias regiões do gene CAST tem sido investigado e já foram identificadas uma série de variantes alélicas nessas espécies. Em trabalhos utilizando também a técnica PCR-SSCP, Zhou, Hickford e Gong (2008) descreveram a existência de cinco padrões de bandas únicas identificado no gene da calpastatina (éxon 6) em caprinos, os quais foram clonados e sequenciados. Neste trabalho, os autores revelaram um grande número de polimorfismos, sendo que um deles, no éxon 06, resultaria em um polimorfismo Gln/Leu no domínio L, região provável de regulação da função de canal de Ca^{2+} que a calpastatina exerce efeito.

No presente estudo, a amplificação de um fragmento de aproximadamente 622 pb do gene CAST foi bem sucedido e todo o DNA extraído de amostras de sangue dos animais produziram um produto específico de PCR, com banda única, sem qualquer banda inespecífica (Figura 1). Utilizando-se deste mesmo *primer*, no trabalho de Palmer et al. (1998), estes também obtiveram sucesso na amplificação desse gene em ovinos. Assim, os produtos de PCR foram utilizados diretamente para a análise de SSCP, para a variação do grupo de alelos do gene CAST.

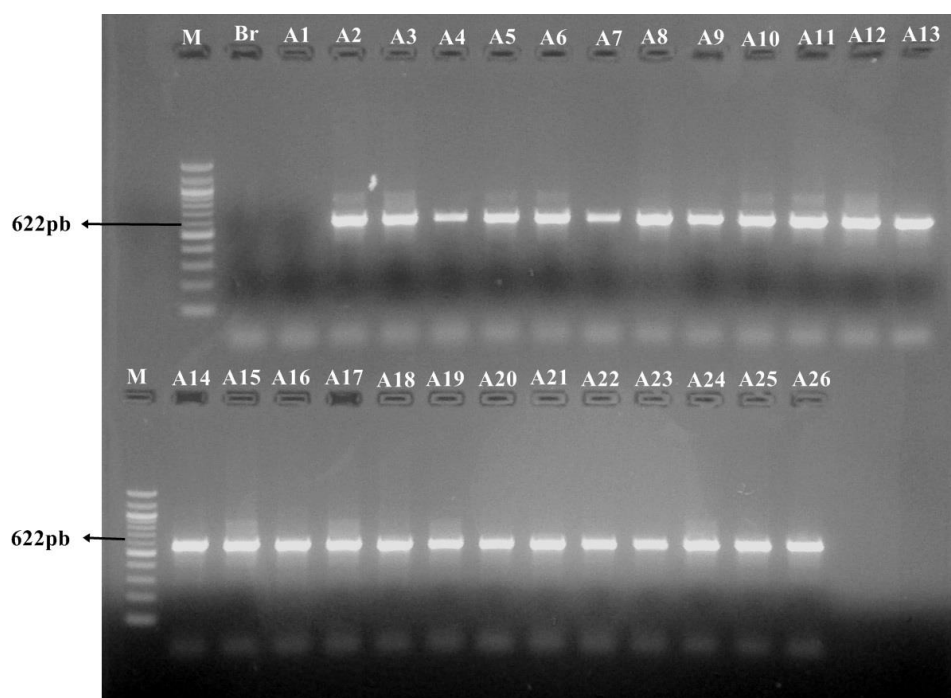


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene CAST, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 622pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

A eletroforese em gel não desnaturante permitiu a visualização das fitas simples de DNA (SSDNA) e análise dos perfis de bandas de SSCP. Entre os grupos genéticos avaliados foi possível observar diferentes padrões de bandas do gene CAST, caracterizando-os como genótipos variados.

No total, a análise de SSCP revelou quatro padrões de bandas originais (AA, AB, BB e BC), para o gene CAST, com três diferentes alelos (A, B e C) (Figura 2).

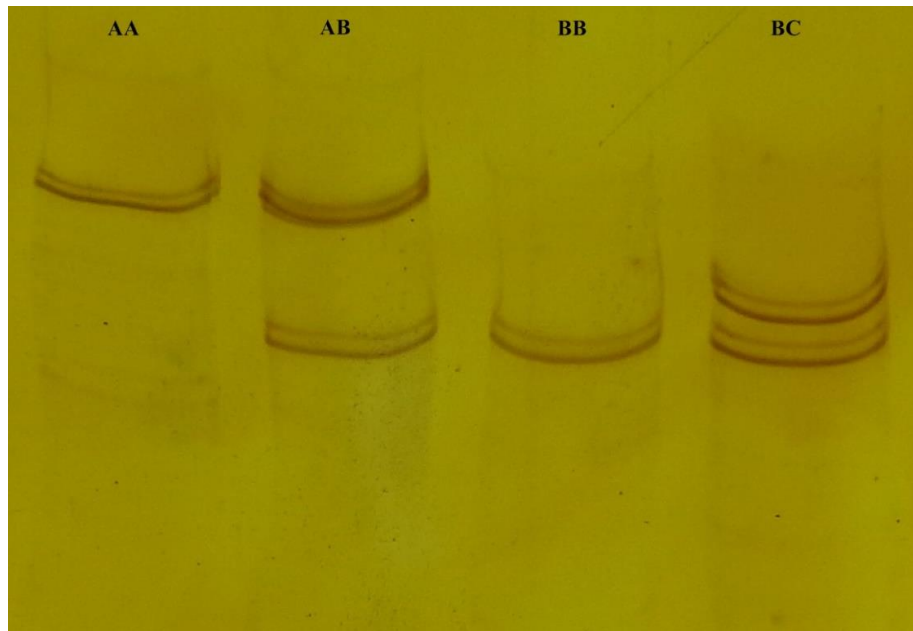


Figura 2 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando quatro genótipos diferentes (AA, AB, BB e BC) com três alelos diferentes (A,B,C) de SNPs no gene CAST

As frequências alélicas foram de 0,202, 0,792 e 0,006 para A, B e C, respectivamente.

Estudos em busca de polimorfismos em ovinos da raça Makoei no Irã, demonstraram a presença de quatro padrões de SSCP, representando quatro diferentes genótipos no éxon 1 para o gene da calpastatina. Três alelos (A, B e C) e quatro genótipos (AA, AB, BB e AC) foram observados para o gene CAST, na qual o alelo e o genótipo mais frequente na raça Makoei foram 63,13% e 31% para o alelo A e genótipo AB, respectivamente (RANJBARI et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, embora as porcentagens das frequências sejam diferentes em função dos grupos genéticos aqui estudados.

Estudo do polimorfismo na mesma região do gene em ovinos Kurdi por PCR-SSCP, revelou três genótipos, incluindo AA, AB e AC(SHAHROUDI et al., 2006). O polimorfismo no exón 1, revelando genótipos semelhantes aos de Kurdi em ovinos, também foi relatada por outros pesquisadores utilizando técnica de PCR-RFLP (GABOR; TRAKOVICKA; MILUCHOVA, 2009; MOHAMMADI et al., 2008; PALMER et al., 1998).

As frequências dos genótipos observadas foram 7,14%, 20,24%, 71,43% e 1,19% para AA, AB, BB e BC, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP), segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Calpastatina (CAST) em ovinos

Genótipos CAST	Grupos Genéticos*												Total	
	LxS		SI		ExS		BDxS		WDxS		TxS			
	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)
AA	3	21,43	2	14,29	0	0,00	0	0,00	1	8,33	0	0,00	6	7,14
AB	5	35,71	0	0,00	1	11,11	5	31,25	4	33,33	2	10,53	17	20,24
BB	6	42,86	12	85,71	7	77,78	11	68,75	7	58,33	17	89,47	60	71,43
BC	0	0,00	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	1,19
Total	14	100	14	100	9	100	16	100	12	100	19	100	84	100

*LxS - Lacaune x Santa Inês; SI - Santa Inês puro; ExS - East Friesian x Santa Inês; BDxS - Black Dorper (Dorper) x Santa Inês; WDxS - White Dorper x Santa Inês; TxS - Texel x Santa Inês; FA= Frequência absoluta; FR = Frequência relativa (%).

Comparando a frequência dos diferentes genótipos em função dos cruzamentos dos grupos genéticos estudados, foram observados que os genótipos AA e AB apresentaram maior frequência nos cruzamentos entre Lacaune x Santa Inês, com 21,43% e 35,71% respectivamente. O genótipo BB apresentou maior frequência no cruzamento Textel x Santa Inês, com porcentagem de 89,47%. Já, o genótipo BC somente foi detectado unicamente no cruzamento East Friesian x Santa Inês, com frequência de 11,11%. Dentro de cada grupo genético, o genótipo BB foi o que teve maior representatividade dentro do presente estudo.

Para a identificação de cada genótipo separadamente, foi realizado o sequenciamento dos produtos de PCR e a análise ocorreu perfeitamente para os quatro diferentes genótipos. Os dados obtidos após o sequenciamento de cada amostra para o gene CAST evidenciaram a presença de sete polimorfismos de mudança de base, nos quais seis foram de transição (G/A) e (T/C) e uma de transversão (G/T), como pode ser observado na Figura 3. A diferença entre esses dois tipos de mutação (transição e transversão), é que a primeira ocorre mudança entre bases púricas (A/G ou G/A) ou entre bases pirimídicas (C/T ou T/C), enquanto que a segunda ocorre mudanças entre as bases púricas e pirimídicas (A/C, G/T) (CAETANO, 2009).

```

Cast-15      TTCTCTAGTTGGGGCAAGCGAGGGCTATTCTCTAGTTGCGATGTGCAGCCTTCTGCAGGT
GenBank      TTCTCTAGTTGGGGCAAGCGAGGGCTATTCTCTAGTTGCGATGTGCAGCCTTCTGCAGGT
Cast-3      -----CGATGTGCAGCCTTCTGCAGGT
Cast-5      -----CGATGTGCAGCCTTCTGCAGGT
                *****

Cast-15      GGCTTCTCTTGTTCAGAGCCGGAGCTCTGGGTGCACAGGCTTCAGTTGTTGTGGCTTGA
GenBank      GGCTTCTCTTGTTCAGAGCCGGGGCTCTGGGTGCACAGGCTTCAGTTGTTGTGACTTGA
Cast-3      GGCTTCTCTTGTTCAGAGCCAGAGCTCTGGGTGCACAGGCTTCAGTTGTTGTGGCTTGA
Cast-5      GGCTTCTCTTGTTCAGAGCCAGGGCTCTGGGTGCACAGGCTTCAGTTGTTGTGGCTTGA
                ***** * *****

Cast-15      GAGCTCTAGAGCACAGGCTCAGTGGTCGTGGCGCACAGGCTTACTCCACGBCATGTGGGA
GenBank      GAGCTCTAGAGCACAGGCTCAGTGGTCGTGGCTCACAGGCTTACTCCACGBCATGTGGGA
Cast-3      GAGCTCTAGAGCACAGGCTCAGTGGTCATGGCGCACAGGCTTACTCCATGBCATGTGGGA
Cast-5      GAGCTCTAGAGCACAGGCTCAGTGGTCATGGCGCACAGGCTTACTCCATGBCATGTGGGA
                ***** * *****

Cast-15      TCTTCCCTGGCCAGGGAGCGAACCCTGTGCCCTGCGTTGCAAGGCGGCCTTTAAACCGC
GenBank      TCTTCCCTGGCCAGGGAGCGAACCCTGTGCCCTGCGTTGCAAGGCGGCCTTTAAACCGC
Cast-3      TCTTCCCTGGCCAGGGAGCGAACCCTGTGCCCTGCGTTGCAAGGCGGCCTTTAAACCGC
Cast-5      TCTTCCCTGGCCAGGGAGCGAACCCTGTGCCCTGCGTTGCAAGGCGGCCTTTAAACCGC
                ***** * *****

Cast-15      TGGCCACCAGGGAAGCCCCAAGATGCCAAGGCTTTTTACTTCTGGT-----
GenBank      TGGCCACCAGGGAAGCCCCAAGATGCCAAGGCTTTTTACTTCTGGTTCCTACCGTCTGGT
Cast-3      TGGCCACCAGGGAAGCCCCAAGATGCCAAGGCTTTTTACTTCTGGT-TTCTTACCGTCTGG
Cast-5      TGGCCACCAGGGAAGCCCCAAGATGCCAAGGCTTTTTACTTCTGGTTCCTACCGTCTGG
                *****

```

Figura 3 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de três amostras diferentes do gene CAST e da sequência do gene CAST depositada no GenBank, número de acesso AF016007

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

A presença de um polimorfismo não necessariamente representa modificação da conformação e consequente função de um aminoácido e de sua respectiva proteína (MORRIS et al., 2007). Contudo, o aparecimento de um SNP significa que pode haver ou não uma mudança no código genético, que é a relação entre a sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a sequência da proteína correspondente, sendo capaz de causar alterações no genótipo, afetando ou não o fenótipo, que determinará na função proteica. Entretanto, alguns autores afirmam que a presença de um SNP pode provocar uma alteração de aminoácidos e gerar alteração na função de uma proteína (YEON et al., 2013).

Dessa forma, em relação aos resultados encontrados neste estudo, essas alterações poderiam influenciar na atuação da calpastatina (capacidade de inibir a atuação da calpaína) sobre as calpaínas (responsáveis pelo processo de proteólise *post mortem* dos animais) e, conseqüentemente, ocasionar variações na maciez da carne (HOÇOYA; JARDINI, 2010).

A partir do resultado do sequenciamento, as amostras foram adicionadas ao site do NCBI, no qual foram utilizadas ferramentas *Orf Finder* para transformação das sequências de nucleotídeos em proteínas. Em seguida, as mesmas foram adicionadas à ferramenta *Clustal Omega*, e, por meio de sua ferramenta de alinhamento de proteínas, foi obtido o resultado da Figura 4.

```

1c1Cast5|Sequence      MCSLLQVASLVAEPGLWVHRLQLLWLESSRAQAQWSWRTGLLHGMWDLFPWPGESEPVSPAL
1c1Cast3|Sequence      MCSLLQVASLVAEPELWVHRLQLLWLESSRAQAQWSWRTGLLHGMWDLFPWPGESEPVSPAL
1c1Cast15|Sequence     MCSLLQVASLVAEPELWVHRLQLLWLESSRAQAQWSWRTGLLHGMWDLFPWPGESEPVSPAL
*****
1c1Cast5|Sequence      QGGLITAGHQGSPKMPRLFTSGFLPSG
1c1Cast3|Sequence      QGGLITAGHQGSPKMPRLFTSGSYRLV
1c1Cast15|Sequence     QGGLITAGHQGSPKMPRLFTSG-----
*****

```

Figura 4 Alinhamento parcial, utilizando ferramentas *Clustal Omega* (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE- EBI, 2015) de três amostras diferentes de proteínas do gene CAST

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

A partir dos sete SNPs detectados no sequenciamento, dois polimorfismos (c.227A>G; c.383A>G), resultaram na troca do ácido glutâmico por glicina e treonina por alanina respectivamente.

As mutações de transição e transversão podem causar mudança de proteína, alterando a sua rota bioquímica no organismo, como pode ser comprovada no estudo realizado por Dahan (2004), onde o alelo Z possuía uma mutação G/A no éxon 5, que resultou na troca do ácido glutâmico na posição

342 pela lisina, promovendo o rompimento de ponte sulfidrílica dentro da molécula, causando uma conformação anormal no retículo endoplasmático.

Aali et al. (2014) descreveram a existência de oito padrões de SSCP diferentes do gene da calpastatina em ovinos de raças iranianas. Esses autores identificaram quatro SNPs no íntron 5 e, três SNPs no éxon 6, sendo esses últimos polimorfismos responsáveis pelas mudanças nas propriedades físico-químicas, de hidrofobicidade, o que, posteriormente, influenciou a estrutura e os efeitos sobre a atividade de canais de Ca^{2+} . Essas atividades são controladas pelas calpaínas que degradam as proteínas como a nebulina, titina, troponina T e desmina do músculo, provocando, assim, o seu amaciamento. Contudo, a calpastatina atua como inibidor endógeno das calpaínas, reduzindo a taxa de proteólise do músculo e, conseqüentemente, da maciez da carne (OLIVEIRA, 2013).

Para o gene GDF-8, a qualidade dos produtos de PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 5). Os produtos de PCR foram representados por uma banda única, com aproximadamente 561pb, sem arrastes que foram consideradas apropriadas para a análise PCR-SSCP, o mesmo perfil relatado no trabalho com bovinos (CRISÀ et al., 2003).

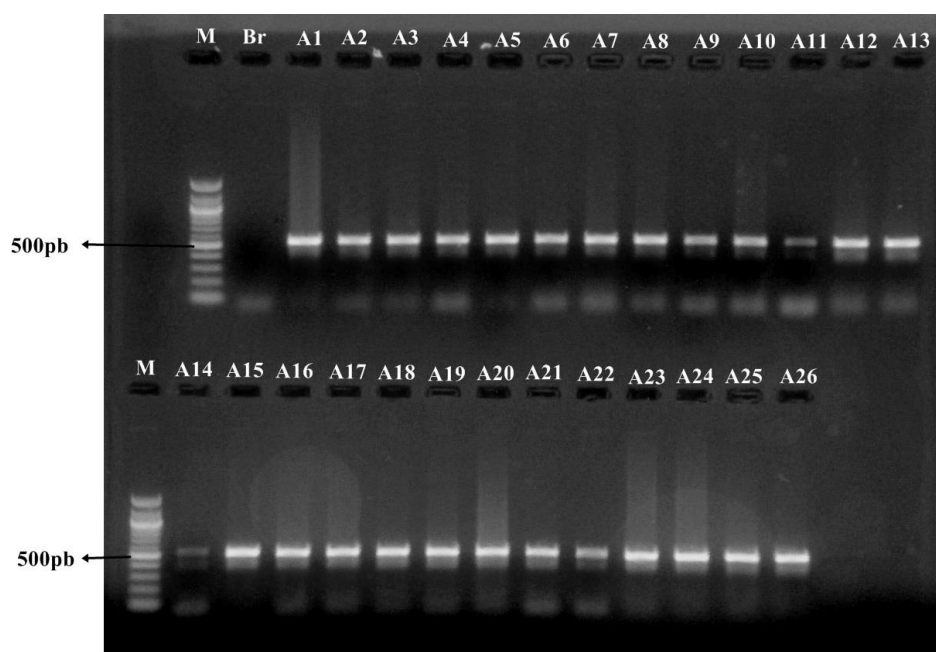


Figura 5 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene GDF-8, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 561pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

Para o gene da miostatina (GDF-8), a análise revelou três genótipos variados (DD, DE e DF), conforme apresentado na Figura 6.

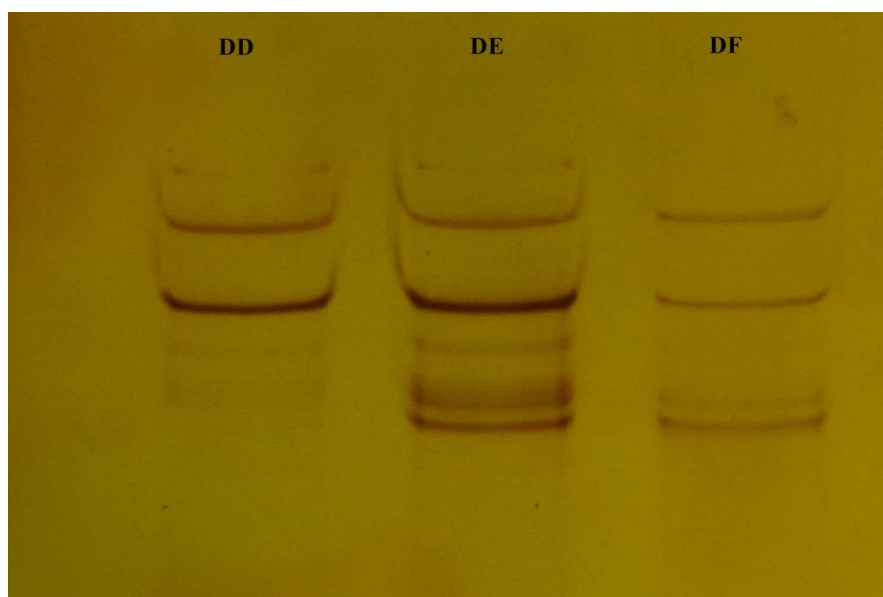


Figura 6 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando três genótipos de SNP's (DD, DE e DF) no gene GDF-8

Em um trabalho semelhante, utilizando a técnica de PCR-SSCP com 92 ovinos da raça Makoei, Farhadian et al. (2012) revelam também a existência de quatro genótipos (AD, AC, AE, e BC) e cinco alelos (A, B, C, D, e E) na região I do íntron do gene da miostatina. Confirmando que a análise de PCR-SSCP é uma técnica rápida, sensível e de confiança para a determinação de polimorfismos de DNA com um bom custo benefício.

Comparando a distribuição dos diferentes genótipos em função dos cruzamentos dos grupos genéticos, foi observado que as frequências genotípicas (Tabela 03) foram respectivamente de: 9,53%, 73,81% e 16,66% para DD, DE e FF. Dentre os genótipos, o DD apresentou maior frequência (16,67%) no cruzamento de White Dorper x Santa Inês; o DF em animais Santa Inês puro se sobressaiu com uma frequência de 85,71% e, o DF apresentou maior frequência (26,32%) no cruzamento de Texel x Santa Inês. Dentro de cada grupo genético,

o genótipo DE foi o que teve maior representatividade dentro do presente estudo.

Tabela 3 Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Miostatina (GDF-8) em ovinos

Genótipos	Grupos Genéticos*												Total	
	LxS		SI		ExS		BDxS		WDxS		TxS			
	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)
DD	2	14,29	0	0,00	1	11,11	1	6,25	2	16,67	2	10,53	8	9,53
DE	11	78,57	12	85,71	7	77,78	12	75,00	8	66,66	12	63,15	62	73,81
DF	1	7,14	2	14,29	1	11,11	3	18,75	2	16,67	5	26,32	14	16,66
Total	14	100	14	100	9	100	16	100	12	100	19	100	84	100

*LxS - Lacaune x Santa Inês; SI - Santa Inês puro; ExS - East Friesian x Santa Inês; BDxS – Black Dorper (Dorper) x Santa Inês; WDxS - White Dorper x Santa Inês; TxS - Texel x Santa Inês; FA= Frequência absoluta; FR = Frequência relativa (%).

Para a identificação dos genótipos, foi realizado o sequenciamento e os dados obtidos evidenciaram a presença de quatro polimorfismos, dos quais um representa deleção de base e três representam mudanças de base, contempladas por alterações dos nucleotídeos T/A e G/A como pode ser observado na Figura 7.

```

GDF8-10 -----CATATCAAC
GenBank TCAAATGCTTACTTAAATAGTATAAAATCATTATTTCTGAGGGAAAAACATATCAAC
GDF8-9 -----GGAAAAGCATATCAAC
*****

GDF8-10 TTTTAAAGTATGAAGTTAAGTTAAGATTTATTCACTTAAATTATAAATTTAAAGTTTCA
GenBank TTTTAAAGTATGAAGTTAAGTTAAGATTTATTCACTTAAATTATAAATTTAAAGTTTCA
GDF8-9 TTTTAAAGTATGAAGTTAAGTTAAGATTTATTCACTTAAATTATAAATTTAAAGTTTCA
*****

GDF8-10 CATATAAAGATGATAAAGTCTAAGTGCATATGTTATTGTTACTAAAGTTTTTAATTTTT
GenBank CATATAAAGATGATAAAGTCTAAGTGCATATGTTATTGTTACTAAAGTTTTTAATTTTT
GDF8-9 CATATAAAGATGATAAAGTCTAAGTGCATATGTTATTGTTACTAAAGTTTTTAATTTTT
*****

GDF8-10 CAAATGTCACAGACAGCCTTTATTATTCATAGATTTATTCCTTTTAAGAAGTAGTCAAAT
GenBank CAAATGTCACAGACAGCCTTTATTATTCATAGATTTATTCCTTTTAAGAAGTAGTCAAAT
GDF8-9 CAAATGTCACAGACAGCCTTTATTATTCATAGATTTATTCCTTTTAAGAAGTAGTCAAAT
*****

GDF8-10 GAATCAGCTCACCCCTTGACTGTAACAAAATACTGTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTT
GenBank GAATCAGCTCACCCCTTGACTGTAACAAAATACTGTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTT
GDF8-9 GAATCAGCTCACCCCTTGACTGTAACAAAATACTGTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTT
*****

GDF8-10 TTAACCTCTGACAGTGAGATTCATTGTGGAGCAAGAGCCAATCACAGATCCCGACGACAC
GenBank TTAACCTCTGACAGTGAGATTCATTGTGGAGCAAGAGCCAATCACAGATCCCGACGACAC
GDF8-9 TTAACCTCTGACAGTGAGATTCATTGTGGAGCAAGAGCCAATCACAGATCCCGACGACAC
*****

GDF8-10 TTGTCTCATCAAAGTTGGAATATAAAAAGCCA-----
GenBank TTGTCTCATCAAAGTTGGAATATAAAAAGCCACTTGAATACAGTATAAAAGATTCACTG
GDF8-9 TTGTCTCATCAAAGTTGGAATATAAAAAGCCA-----
*****

```

Figura 7 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site do JustBio (2015), de duas amostras do gene GDF-8 e da sequência do gene GDF-8 depositada no GenBank, número de acesso DQ530260.1

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

No presente estudo, diferentes substituições de nucleotídeos foram encontradas no gene GDF-8 para os grupos genéticos, corroborando com os resultados encontrados para ovinos por Han, Forrest e Hickford (2013). Esses pesquisadores encontraram 28 polimorfismos, dos quais um resultou na substituição (c. 101G/A) no exón 1, o que provocou uma mudança no aminoácido de ácido glutâmico (Glu) com a glicina (Gly) no códon 34. Esse resultado pode afetar a função inibidora da miostatina, durante o crescimento muscular, causando o aumento da musculatura esquelética e na força muscular (LIMA, 2007), conseqüentemente afetando as características de maciez da carne, uma vez que animais com hipertrofia muscular apresentam menor quantidade de gordura subcutânea e intramuscular (XAVIER, 2014). A partir do resultado do sequenciamento, as amostras foram adicionadas ao site do NCBI, no qual foi utilizada a ferramenta *Orf Finder* (Open Reading Frame Finder), desenvolvida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) para a transformação de nucleotídeos em proteínas. Em seguida, as mesmas foram adicionadas na ferramenta *Clustal Omega*, e por meio do alinhamento de proteínas, foi obtido o resultado da Figura 8.

```

1c1GDF-8-9|Sequence      FLYSNFDETSVVGICDWLLLNESHQRLKPKLSQVTKQYFVTVKGELIHLTTS*
1c1GDF-8-10|Sequence    FLYSNFDETSVVGICDWLLLNESHQRLKPKLSQVTKQYFVTVKGELIHLTTS*
*****

```

Figura 8 Alinhamento parcial utilizando a ferramenta *Clustal Omega* (EBI, 2015), de três amostras diferentes de proteínas do gene GDF-8

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*).

A partir dos sete SNPs detectados no sequenciamento, não houve nenhum polimorfismo que resultasse na troca de aminoácidos das proteínas formadas.

Com o intuito de encontrar um marcador molecular relacionado ao crescimento Zhang et al. (2013), avaliaram 288 caprinos das raças Boer e Anhui e os resultados revelaram dois polimorfismos de nucleotídeo único: DQ167575 g.197 G>A e 345 A>T e três potenciais genótipos (AA, AB, BB), pela substituição de 197 G>A na região 5' UTR, nas duas raças. Associações significativas entre os genótipos e peso corporal, comprimento corporal e altura do corpo foram observadas e inferiu-se que os polimorfismos verificados no gene da miostatina puderam ser responsáveis por afetar as características de crescimento de caprinos. No entanto, os estudos não mostraram nenhuma associação significativa entre as variações polimórficas do gene da miostatina e o peso de nascimento, peso ao desmame ou taxa de crescimento pré-desmame em ovelhas Romney Nova Zelândia (HICKFORD et al., 2010).

Hickford et al. (2010), analisando a PCR-SSCP de 747 ovelhas selecionadas aleatoriamente, encontraram cinco padrões de SSCP (AA, AB, AC, BB e BC) e cinco alelos (A, B, C, D e E) definindo a variação da sequência na região do íntron- 1 do DNA não-codificante, o que dificulta um pouco o entendimento de como essa variação genética poderia afetar a atividade da miostatina. Contudo, existem algumas hipóteses, tais como: essas variações poderiam afetar o *splicing* (processo que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA) do RNAm ou poderiam estar ligados a outro local de sequência de aminoácidos ou, ainda, poderiam se ligar a outro nucleotídeo em regiões de controle de outros genes (por exemplo: mir 1, mir 206 e microRNA (miRNA)) (CLOP et al., 2006). Estes miRNA (uma pequena molécula não-codificante de RNA, que tem a capacidade de silenciar a expressão gênica do RNA) são genes altamente expressos no músculo esquelético e uma mutação neles poderia causar inibição da miostatina e, portanto, contribuir para a hipertrofia muscular nas ovelhas (HICKFORD et al., 2010).

4 CONCLUSÕES

Em ambos os genes CAST e GDF-8 em ovinos, a ocorrência de SNPs é ampla, ou seja, ela percorre toda a sequência amplificada do gene, comprovando que, realmente, o polimorfismo único é amplamente distribuído pelo genoma.

As substituições e deleções relatadas neste estudo, em conjunto com as observadas em outros trabalhos sugerem que os genes CAST e GDF-8 de ovinos é altamente variável e exige mais caracterização, por meio de várias raças.

No gene CAST, dos sete SNPs detectados no sequenciamento, dois polimorfismos resultaram na troca do ácido glutâmico por glicina e treonina por alanina. No gene GDF-8, os SNPs detectados não alteram o aminoácido correspondente.

Contudo, estudos futuros para investigar o efeito específico das variações desses genes sobre a produção de carne de ovino e características de qualidade de carne ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

AALI, M. et al. Detecting novel SNPs and breed-specific haplotypes at calpastatin gene in Iranian fat- and thin-tailed sheep breeds and their effects on protein structure. **Gene**, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 132-139, Mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 jan. 2000. p. 14-16.

Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/Anexo%20Abate.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2013.

BYUN, S. O. et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 385, n. 1, p. 174-175, Feb. 2009.

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

CLOP, A. et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 7, p. 813-818, July 2006.

CRISÁ, A. et al. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. **Cytogenetics and Genome Research**, Basel, v. 102, n. 1/4, p. 48-52, 2003.

DAHAN, E. D. **Verificação da associação da variabilidade genética da alfa-1-antitripsina e do fator de necrose tumoral com a asma brônquica**. 2004. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **Clustal omega**: multiple sequence alignment. Disponível em:

<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

FARHADIAN, M. et al. Polymorphisms in the ovine myostatin gene are associated with birth weight but not with weight gain in Iranian Makoei sheep. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 3568-3575, Oct. 2012.

GABOR, M.; TRAKOVICKA, A.; MILUCHOVA, M. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. **Lucrari Stiintificw: Zootehnie si Biotehнологii**, Timisoare, v. 42, n. 2, p. 470-476, 2009.

HAN, J.; FORREST, R. H.; HICKFORD, J. G. Genetic variations in the myostatin gene (MSTN) in New Zealand sheep breeds. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 11, p. 6379-6384, Nov. 2013.

HICKFORD, J. G. et al. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Animal Genetics**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 64-72, Feb. 2010.

HOÇOYA, L. S.; JARDINI, M. A. N. Polimorfismo genético associado à doença periodontal na população brasileira: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 5, p. 305-310, set./out. 2010.

JUSTBIO. **Bioinformatics at the tip of your fingers**. Disponível em: <<http://www.justbio.com/hosted-tools.html>>. Acesso em: 22 jul. 2015.

LIMA, L. S. **Identificação de Polimorfismos em ESTs da interação cacau-Moniliophthora pernicioso**. 2007. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

MARSHAL, D. M. Genetics of meat quality. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. (Ed.). **The genetics of cattle**. New York: CABI, 1999. chap. 21, p. 605-636.

MOHAMMADI, M. et al. Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR- RFLP. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 7, n. 15, p. 2682-2684, Aug. 2008.

MORRIS, C. A. et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. **Mammalian Genome**, New York, v. 18, n. 1, p. 64-74, Jan. 2007.

OLIVEIRA, A. L. **Efeitos epigenéticos sobre a diferenciação in vitro de mioblastos e a expressão dos genes CAST e CAPN1 em bovinos**. 2013. 77 p.

Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

PALMER, B. R. et al. Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 1499-1500, May 1998.

RAMALHO, M. A. P. et al. Genética de populações. In: _____. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2012. cap. 13, p. 317-336.

RANJBARI, M. et al. Allelic polymorphism of Makoei sheep calpastatin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. **Journal of Agricultural Science & Technology**, New York, v. 14, n. 3, p. 533-538, 2012.

REGITANO, L. C. A. Extração de DNA para aplicação em reação de cadeia da polimerase. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 179-186.

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

SHAHROUDI, F. E. et al. Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. **Iranian Journal of Biotechnology**, Tehrân, v. 4, n. 3, p. 117-122, Apr. 2006.

TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. Frequência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 805-809, jun. 2007.

TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla: I determinação genética. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Montevideo, v. 14, n. 1, p. 17-23, 2006.

XAVIER, S. R. **Prospecção de polimorfismos no gene da miostatina em bovinos da raça senepol**. 2014. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

YEON, S. H. et al. Genetic variation of FASN is associated with fatty acid composition of Hanwoo. **Meat Science**, Barking, v. 94, n. 1, p. 133-138, May 2013.

ZAPATA, J. F. F. et al. Estudo da qualidade da carne ovina no nordeste brasileiro: propriedades físicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 274-277, ago. 2000.

ZHANG, Z. J. et al. Polymorphisms of the myostatin gene (MSTN) and its relationship with growth traits in goat breeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 965-971, Apr. 2013.

ZHOU, H.; HICKFORD, J.; GONG, H. Allelic polymorphism of the caprine calpastatin (CAST) gene identified by PCR-SSCP. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 2, p. 403-405, June 2008.

CAPÍTULO 3 Prospecção e caracterização de polimorfismo de genes relacionados ao perfil lipídico da carne de ovinos

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, avaliar o polimorfismo por análise de mutações pontuais (SNPs) de alguns genes relacionados ao perfil lipídico da carne de ovinos (Esterol CoA Dessaturase – SCD, Domínio da Tioesterase – TE, Ácido Graxo Sintase – FASN e Diacilglicerol Aciltransferase -DGAT 1 e 2). Para o experimento, foram utilizados um total de 84 ovinos machos, constituídos de seis grupos genéticos, sendo estes derivados do cruzamento entre as raças: Santa Inês x Santa Inês, Santa Inês x Black Dorper, Santa Inês x White Dorper, Santa Inês x Texel, Santa Inês x Lacaune e Santa Inês x East Friesian em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 6 (seis) tratamentos correspondendo aos cruzamentos e 14 (quatorze) repetições, onde cada animal foi considerado uma repetição. Os polimorfismos foram identificados utilizando a técnica de PCR-SSCP e para cada padrão diferente identificado, os produtos foram encaminhados para sequenciamento e analisados usando software livre Sequence Scanner Software (Applied Biosystems). Os dados foram analisados, determinando os valores de frequência absoluta e relativa, a partir dos polimorfismos identificados em cada grupo genético. A técnica de SSCP detectou um padrão único de banda nos genes DGAT-1 e SCD; dois padrões de bandas no gene FASN, três padrões no gene TE e quatro padrões no gene DGAT-2. No gene DGAT-1, foi possível observar um genótipo GY. No gene DGAT-2, foram identificados quatro genótipos (MO, MP, NP e MQ). As frequências dos genótipos observadas foram 55,95%, 14,29%, 28,57% e 1,19% respectivamente para MO, MP, NP e MQ e o sequenciamento do DGAT-2 apresentou 4 polimorfismos, dos quais dois polimorfismos (c. 229T>C; c.255T>C), resultaram na troca da fenilalanina por leucina. No gene FASN, foram identificados dois genótipos (RS e RR) e as frequências dos genótipos observadas foram 15,48% e 84,52%, respectivamente, para os genótipos RS e RR. Para o gene SCD, nos grupos genéticos avaliados foi possível observar um único genótipo HI. No gene TE, foram identificados três genótipos (TV, TT e UV) e a frequência dos genótipos observadas foram de 84,53%, 7,14% e 8,33%, respectivamente para TV, TT e UV. Os dados obtidos após o sequenciamento do gene TE de cada amostra resultaram na presença de 4 polimorfismos. Os genes DGAT-1 e SCD não relevaram, neste estudo, a presença de polimorfismo, enquanto os demais, apresentaram padrões diferenciados o que poderá estar relacionado a mudanças no perfil lipídico da carne de ovinos.

Palavras-chave: Tioesterase. Esterol-CoA Dessaturase. Ácido Graxo Sintase. Diacilglicerol Aciltransferase 1 e Diacilglicerol Aciltransferase 2.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the polymorphism by analysis of point mutations (SNPs) of some genes related to lipid profile of sheep meat (Esterol CoA desaturase - SCD, Domain thioesterase -TE, Fatty Acid Synthase - FASN and Diacylglycerol Acyltransferase - DGAT 1 and 2). For the experiment, we used a total of 84 male sheep, made up of six genetic groups, which are derived from a cross between the races: Santa Ines x Santa Ines, Santa Inês x Dorper Black, White Dorper x Santa Inês, Santa Inês x Texel , Santa Inês x Lacaune and Santa Inês x East Friesian in a completely randomized design (CRD), with six (6) treatments corresponding to intersections and fourteen (14) repetitions, where each animal was considered a repeat. To identify polymorphisms, we used the PCR-SSCP technique. For each different pattern identified, the products were sent to sequencing and analyzed using free software Sequence Scanner Software (Applied Biosystems). Data were analyzed by determining the absolute frequency values, at each genetic polymorphisms identified group. The SSCP technique detected a single standard band in DGAT-1 and SCD genes; two patterns of bands in the FASN gene, three patterns in TE gene and the four patterns DGAT-2 gene. In DGAT-1 gene among the evaluated genotypes it was possible to observe a GY genotype. In DGAT-2 gene was identified four genotypes (MO, MP, NP and MQ). The observed frequencies of genotypes were 55.95%, 14.29%, 28.57% and 1.19% respectively for MO, MP, NP and MQ. The data obtained after the sequencing of the samples resulted in the presence of 4 polymorphisms, of which two polymorphisms (c 229T> C; C.255T> C) resulted in the change of phenylalanine to leucine. FASN gene was identified in two genotypes (RS and RR) and the observed frequencies of genotypes were 15.48% and 84.52% respectively for the RS and RR genotypes .. For the SCD gene, the evaluated genetic groups was possible to observe a HI single genotype. In the TE gene was identified three clones (TV, TT and UV) and frequency of genotypes observed were 84.53%, 7.14% and 8.33% respectively for the TV genotypes TT and UV. The data obtained after the sequencing of the samples resulted in the presence of 4 polymorphisms. The DGAT-1 and SCD genes not relevaram this study the presence of polymorphism, while the others showed different patterns which may be related to changes in the lipid profile of sheep meat.

Keywords: Domínio Thioesterase. Stearoyl-CoA Desaturase. Fatty acid Synthase. Diacylglycerol Acyltransferase 1 and Diacylglycerol Acyltransferase 2.

1 INTRODUÇÃO

A carne constitui uma fonte de proteínas, ácidos graxos essenciais e contribui no fornecimento de energia, embora o consumo seja variável nas distintas regiões do mundo. Atualmente observa-se um interesse pela composição dos ácidos graxos nas carnes em geral, em razão da sua importância nutricional. Uma vez que as propriedades físicas e químicas dos lipídios afetam as qualidades sensoriais, nutricionais e de conservação, influenciando a palatabilidade, taxa de oxidação e a vida-de-prateleira da carne in natura ou cozida em função do seu perfil, sendo que, na carne de ovinos, os principais ácidos graxos encontrados são o oléico, seguido do palmítico, esteárico e linoleico (FEARON, 2010; MADRUGA et al., 2006).

Existem vários genes que podem estar relacionados à síntese de lipídeos, por meio da sua relação com expressão de enzimas no tecido adiposo. Nesse contexto, diversos estudos têm sido realizados com ferramentas de genética molecular no sentido de identificar polimorfismos em *loci* associados com a produção de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e estudar as possíveis associações destes com o perfil lipídico em ruminantes (CONTE, 2010; KGWATALALA et al., 2009; TANIGUCHI et al., 2004; ZHANG et al., 2008).

Alguns polimorfismos com efeito nas características das gorduras de ruminantes foram descritos nos genes da Estearol CoA Dessaturase – SCD, que catalisa a dessaturação de vários ácidos graxos na posição cis- Δ^9 nas glândulas mamárias de animais ruminantes (KGWATALALA et al., 2009; TANIGUCHI et al., 2004); Domínio da Tioesterase –TE (ZHANG et al., 2008); Ácido Graxo Sintase - FASN (MORRIS et al., 2007) e Diacilglicerol Aciltransferase –DGAT 1 e 2 que participa da síntese de triacilglicerol na glândula mamária (CONTE, 2010; SCHENNINK et al., 2007). Assim, por meio de variações nos genes por

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) poderão ser verificadas modificações da codificação dessas enzimas ou complexos enzimáticos envolvidos.

Os estudos com ovinos em relação a esses genes ainda são reduzidos. No entanto, os estudos e o uso das técnicas de detecção de mutações pontuais por análise de SNPs, poderá proporcionar a identificação de padrões genéticos que irão auxiliar os programas de seleção genética, buscando a obtenção de animais para a produção de carnes com os aspectos de composição específicos de perfil lipídico. Consequentemente, esta será uma ferramenta na ovinocultura de corte para adaptar-se às novas demandas do mercado consumidor, buscando oferecer produtos de melhor qualidade e menores custos.

Dessa forma, objetivou-se, no presente trabalho, avaliar o polimorfismo por análise de mutações pontuais (SNPs) dos genes DGAT-1 e 2, SCD, FASN e domínio da Tioesterase em ovinos de diferentes grupos genéticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais-CEUA/UFLA registrado sob nº 102/12 (ANEXO A).

2.2 Local do experimento

O trabalho foi executado na Universidade Federal de Lavras, no setor de Ovinocultura.

As análises dos genes em estudo foram realizadas no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, situada em Lavras - Minas Gerais.

2.3 Animais

Foram utilizados 84 cordeiros, sendo 14 animais (Santa Inês puros -SI) e 70 mestiços: 16 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Black Dorper - BD); 12 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ White Dorper - WD); 19 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Texel - TX); 14 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ Lacaune - LCI); 9 animais ($\frac{1}{2}$ Santa Inês x $\frac{1}{2}$ East Friesian - EF) oriundos de matriz Santa Inês e seis diferentes reprodutores foram usados neste estudo. Os cordeiros nasceram entre o final de julho a setembro (2012), e o período experimental iniciou quando os cordeiros pesavam, em média $24,19 \pm 2,46$ kg, com 3 meses de idade. Os cordeiros foram alimentados com dietas contendo 80% de concentrado e 20% de volumoso, com dieta à base de feno de aveia, casca de café, farelo de soja, milho, calcário, suplemento mineral e Rumensin® e gordura bypass (Megalac) a 5,3% da ração.

Para a realização dos estudos relacionados à avaliação dos genes, foi realizada a coleta de sangue individual antes do abate. Os ovinos foram abatidos com peso vivo de $43,99 \pm 1,21$ kg, em condições adequadas de abate, conforme a IN 03 de 07/01/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2000), que normatiza o abate humanitário das espécies de açougue e segundo as boas práticas de fabricação para a obtenção de carnes com padrões sanitários para o consumo. Os animais antes do abate foram submetidos a um período de 24h de descanso, jejum e dieta hídrica.

Imediatamente após a coleta, os tubos contendo as amostras de sangue foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 3000xg por 15 minutos a 5°C, para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para microtubos plásticos, identificados e armazenados a -80°C, até o procedimento das análises laboratoriais.

2.4 Extração de DNA genômico

Foram coletados antes do abate 5 mL de sangue dos ovinos em tubos contendo EDTA potássio [50 µL de EDTA (K₃) a 15%]. As amostras biológicas foram armazenadas a uma temperatura de - 80°C. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Regitano (2001).

A concentração e a pureza do DNA extraído foram quantificadas, recorrendo-se à determinação das absorvâncias a 260nm (A260) e a 280nm (A280) num espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer UV/Vis. As amostras foram diluídas com água estéril para se obter a concentração final pretendida de 10 ng de DNA/µL. Em seguida, foi feito o gel de integridade, sendo confirmada a excelente qualidade do DNA genômico.

2.5 Amplificação do DNA

Para a realização do estudo, foi realizada uma pesquisa na literatura, na qual foram obtidos os primers para os genes avaliados: DGAT-1 e 2 (éxon 8), FASN, TE, SCD (éxon 6), que se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes DGAT-1, DGAT-2, FASN, SCD e TE

Gene	Extensão do fragmento (pb)	Primer <i>Forward</i> (5'-3')		Autores	Espécie
		Primer <i>Reverse</i> (5'-3')			
DGAT 1	381	CCATCCTCTTCCTCAAGCTG	GGGAAGTTGAGCTCGTAGCA	Conte et al. (2010)	<i>Bovinae</i>
DGAT 2	268	CGAGCCCATTACCATCCC	AAATAACCCACAGACACCC	Fang et al. (2012)	<i>Caprinae</i>
FASN	228	GACCTTGACACGGCTCAACT	GGGCACAGCATGAGGTTTAG	Ciecierska et al. (2013)	<i>Bovinae</i>
SCD	377	TGAGGGCTTCCACAATA	GCATCATAAAGGCAGAGT	Zang et al. (2010)	<i>Caprinae</i>
TE	505	AGAGCCTGGCCACCTACTACA	TC TGCCACACGCGCCTCCAGA	Oztabak et al. (2014).	<i>Bovinae</i>

A PCR foi realizada a partir de 50 ng de DNA genômico em um volume final de 25 µl, contendo 1 × tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1,25U de Taq DNA polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, e 0,5 µM de cada primer e H₂O. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler - Eppendorf), como pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 2 Condições estabelecidas de temperatura de anelamento dos primers da PCR para a amplificação dos fragmentos dos genes DGAT-1, DGAT-2, FASN, SCD e TE

GENES	ANELAMENTO
DGAT-1	59°C por 30''
DGAT-2	61°C por 30''
FASN	60°C por 30''
SCD	57°C por 30''
TE	56°C por 30''

Cada PCR foi realizado em volume final de 25 μ L e a mistura para amplificação constituiu-se de: 50ng de DNA genômico, 0,20 μ M de cada primer, 10mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e 1,25 UI de Taq DNA polimerase.

O protocolo padrão para as amplificações foi: 5 minutos para desnaturação inicial a 95°C, 30 segundos para denaturação a 95°C, tempo e temperatura de anelamentos dos primers variáveis (condições adequadas para cada gene descritas na Tabela 02), 1 minuto para extensão a 72°C, 2 minutos para extensão final a 72°C. Os passos 2 (denaturação), 3 (anelamento) e 4 (extensão), correspondem a um ciclo, o qual foi repetido 35 vezes. As reações ocorreram no termociclador (MasterCycler - Eppendorf, USA) sob condições pré-estabelecidas.

Os produtos amplificados foram, posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de agarose. Os produtos PCR obtidos para os diferentes *primers* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em 1x TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,0, e 1 mM EDTA) com 0,8 μ g/mL de brometo de etídeo e os resultantes perfis eletroforéticos foram visualizados no gel e fotodocumentados em sistema (*Spectrolini Ultraviolet Transilluminator*).

2.6 Eletroforese em gel de Poliacrilamida/Triagem de mutações

A triagem de mutações dos genes DGAT-1, DGAT-2, FASN, SCD e TE foram realizadas pelo método comparativo de SSCP (Polimorfismo de conformação de cadeia simples), no qual adicionou 1 uL de cada produto de PCR foi diluído em 10 ul de tampão desnaturante (98% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% xilenocianol). Após a desnaturação a 95°C durante 5 min, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e, em seguida, aplicadas no gel de acrilamida:bisacrilamida (37.5: 1) 12,5%. As amostras foram eletroforisados em cuba vertical (HoeflerTM Minive), sob 10°C em 0,5 × tampão TBE, durante uma média de 6 horas em um ambiente de 10 ° C. Os géis foram corados de acordo com Byun et al. (2009).

2.7 Sequenciamento e análise dos dados

As amostras obtidas da análise de PCR-SSCP de acordo com cada padrão apresentado nos gel foram enviadas para empresa especializada em sequenciamento Myleus Biotecnologia, em Belo Horizonte-MG. O sequenciamento foi feito por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, pelo método capilar descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

Os dados gerados foram estudados e analisados por programas computacionais, o software livre Sequence Scanner Software (Applied Biosystems[®]). Foi utilizado para analisar os esferogramas o site JustBio (2015) o qual forneceu ferramentas computacionais para realizar o alinhamento das sequencias nucleotídicas com dedução dos aminoácidos correspondentes.

A busca por similaridade foi realizada, utilizando a ferramenta computacional BLAST, com sequências armazenadas no GenBank[®].

Foi utilizada a ferramenta Orf Finder do NCBI (National Center for Biotechnology Information), para transformar as sequências de nucleotídeos em proteínas e, em seguida, a ferramenta *Clustal Ômega* para alinhamento das sequências proteicas.

2.8 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados por meio da determinação dos valores de frequência absoluta e relativa, a partir dos polimorfismos identificados em cada gene de cada grupo genético. A frequência absoluta correspondeu à ocorrência do número absoluto de determinado padrão polimórfico, enquanto a frequência relativa correspondeu à porcentagem desses padrões em cada grupo genético.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese no gel de agarose do gene DGAT-1 confirmou o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 381 pb (Figura 1). Utilizando-se desse mesmo *primer*, Conte et al. (2010) também obtiveram sucesso na amplificação desse gene em bovinos.

No entanto, no presente estudo, a partir dos diferentes grupos genéticos de ovinos estudados, não foi verificado SNPs, utilizando a técnica de SSCP. Entretanto, o gene amplificado correspondeu ao gene DGAT-1 em ovinos com similaridade de 98%, de acordo com análise realizada no BLAST, acesso EU178818.1, confirmando que houve a amplificação correta do gene de interesse. Uma provável explicação para a falta de verificação SNPs, no presente estudo, pode estar relacionada ao tamanho da amostra que não foi suficiente para detectar as diferenças do DNA das amostras (FANG et al., 2012).

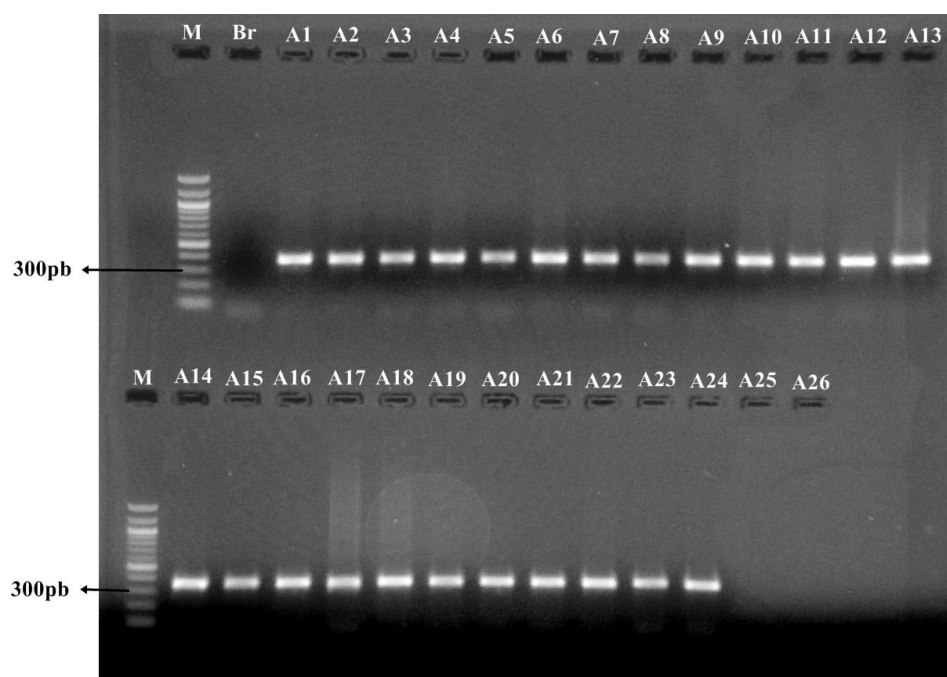


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene DGAT-1, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 381pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

Entre os grupos genéticos avaliados, foi possível observar um genótipo HI no gene DGAT-1, caracterizando-o como genótipo único, como observado na Figura 2.

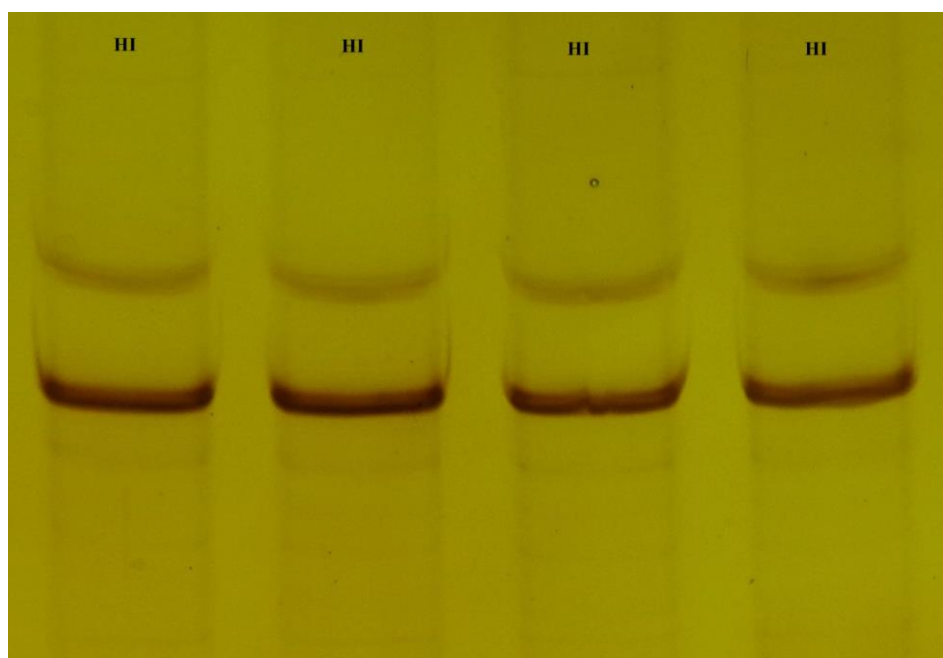


Figura 2 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando um único genótipo (HI) de SNP no gene DGAT-1

A partir das amostras estudadas, foi selecionada uma para sequenciamento e os dados obtidos comprovaram o resultado da técnica de PCR-SSCP, pela qual evidenciou-se apenas um genótipo, não revelando a presença de mutação no gene, conforme pode ser observado na Figura 3.


```

DGAT1-21      -----TCCATCCTCTTCCTCAAGCTGTTTTCTACCGGGACG
GenBank      CCGTGCTGGCCCTGATGGTCTACACCATCCTCTTCCTCAAGCTGTTTTCTACCGGGACG
                *****

DGAT1-21      TCAACCTCTGGTGCCGAGAGCGCAGGGCTGGGGCCAAGGCCAAGGCTGGTGAGGGCTCCC
GenBank      TCAACCTCTGGTGCCGAGAGCGCAGGGCTGGGGCCAAGGCCAAGGCTGGTGAGGGCTCCC
                *****

DGAT1-21      TCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACCTGCCGCGGGACCGGCAGGGGCTCGGCTCACCCC
GenBank      TCGGGCTGGGGCCACTGGGCTGCCACCTGCCGCGGGACCGGCAGGGGCTCGGCTCACCCC
                *****

DGAT1-21      GCSCCGCCCCCTGCCGCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTAAGAAGGCCAACGGGGGAGCT
GenBank      GCSCCGCCCCCTGCCGCTTGCTCGTAGCTTTGGCAGGTAAGAAGGCCAACGGGGGAGCT
                *****

DGAT1-21      GCCCAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACACCTGACCTACCGCGGTGAGGATCCTGCCTGG
GenBank      GCCCAGCGCACCGTGAGCTACCCCGACACCTGACCTACCGCGGTGAGGATCCTGCCTGG
                *****

DGAT1-21      GGCTGGGGGGGCTGCCCGGGCGCCTGGCCTGCTAGCCCCGCCCTCCCTTCCAGATCTCTA
GenBank      GGCTGGGGGGGCTGCCCGGGCGCCTGGCCTGCTAGCCCCGCCCTCCCTTCCAGATCTCTA
                *****

DGAT1-21      CTACTTCCTCTTCGCCCCAACCCTGTGCTACGAG-----
GenBank      CTACTTCCTCTTCGCCCCAACCCTGTGCTACGAGCTCAACTTCCCCCGCTCCCCCGCAT
                *****

```

Figura 3 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), utilizando uma amostra do gene DGAT-1 e da sequência do gene DGAT-1 depositada no GenBank, número de acesso gb|EU178818.1|. As semelhanças são indicadas por asterisco (*)

Em um estudo realizado por Scata et al. (2009) em três raças de ovinos italianas (Altamura (37 animais), Gentile di Puglia (37 animais) e Sarda (34 animais)), os autores realizaram o sequenciamento direto da DGAT-1, incluindo as regiões de íntrons e éxons e relataram a ausência de SNPs no éxon 8, o que vem a corroborar com os resultados encontrados neste estudo.

Diferentemente, Yang et al. (2011), pesquisando quatro raças de ovinos chineses (Tan (58 animais), Ganjia (36 animais), Oula (39 animais) e (34 animais)) e utilizando a técnica RFLP, encontraram três genótipos (CC, TC e TT) e dois alelos C e T; no qual o genótipo CC e o alelo C foi o mais predominante entre os genótipos e as quatro raças de ovinos chineses. Houve

também a detecção de um SNP (GCC (Ala)-GCT (Ala)) no exon 17, que está diretamente relacionada com a função da enzima DGAT-1. O efeito desse SNP de DGAT-1 nas características de qualidade de carne e leite dessas raças de ovinos chineses, ainda precisa de estudos mais aprofundados. Mas, acredita-se que o SNP afete as características de interesse económico, já que o QTL que influencia a composição de ácidos graxos do leite foi detectado no cromossomo 14 de bovino e está localizado próximo do gene DGAT-1 (COPPIETERS et al., 1998; YANG et al., 2011). Corroborando com os estudos de Yang et al. (2011), Conte et al. (2010) realizaram um experimento em vacas italianas da raça Brown, no qual observaram a presença de três genótipos, sendo AA (96%), AK (3%) e KK (1%). A expressão dos alelos AK e KK teve uma representatividade menor, em razão do número de animais restritos, contudo, ainda esses autores puderam inferir que um polimorfismo na enzima DGAT-1 pode provocar alteração na composição dos ácidos graxos, uma vez que essa proteína tem um papel fundamental no metabolismo lipídico da glândula mamária (MELES et al., 2007; SCHENNINK et al., 2008). Para o gene DGAT-2, a eletroforese no gel de agarose confirmou o tamanho do fragmento amplificado de, aproximadamente, 268 pb (Figura 4). Fang et al. (2012) obtiveram o mesmo resultado de amplificação quando utilizaram essa mesma sequência de *primers* em três raças de cabras chinesas, utilizando a técnica SSCP.

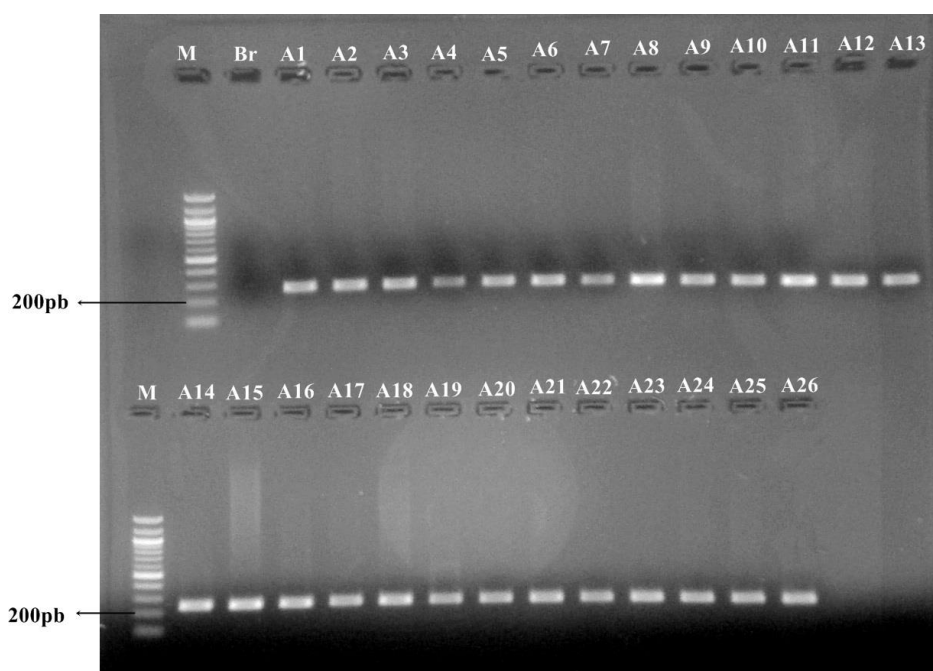


Figura 4 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene DGAT-2, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 268pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

Entre os grupos genéticos avaliados no presente estudo, foi possível observar, na análise pela técnica de PCR-SSCP, a presença de quatro genótipos no gene DGAT-2 (MO, MP, NP e MQ), conforme foi observado na Figura 5.

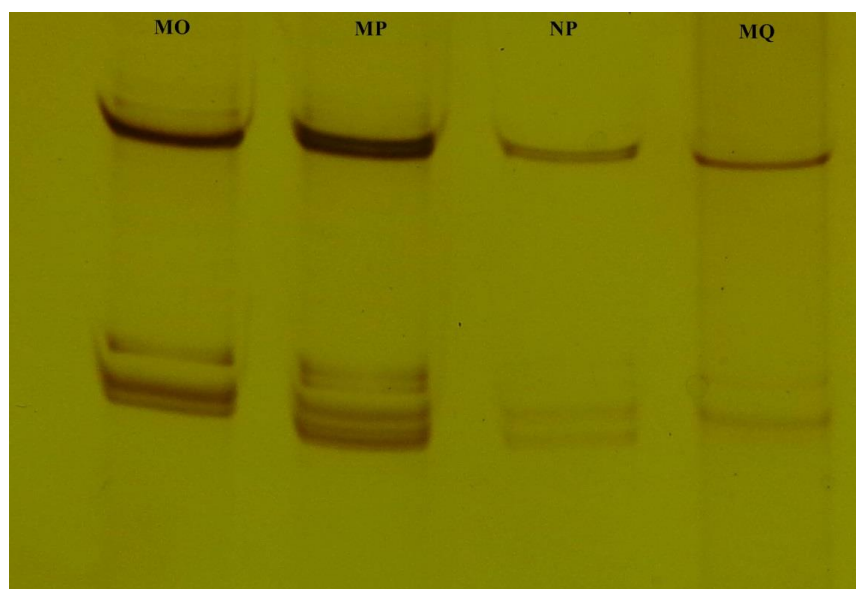


Figura 5 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando quatro genótipos MO, MP, NP, MQ de SN Ps no gene DGAT-2

As frequências dos genótipos observadas para o gene DGAT-2 foram de 55,95%, 14,29%, 28,57% e 1,19% respectivamente para MO, MP, NP e MQ (Tabela 3). O genótipo MO foi o de maior ocorrência no cruzamento Lacaune x Santa Inês (78,57%), já o MP apresentou maior frequência no cruzamento East Friesian x Santa Inês (33,33%). O genótipo NP foi o de maior ocorrência no cruzamento Santa Inês puro com 64,29%, e o MQ teve maior ocorrência. Dentro de cada grupo genético, o genótipo NP foi o que teve maior representatividade no cruzamento de Santa Inês puro, enquanto o genótipo MO foi o mais representativo nos demais grupos genéticos estudados.

Tabela 3 Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Diacilglicerol Aciltransferase (DGAT-2) em ovinos

Genótipos DGAT-2	Grupos Genéticos*												Total	
	LxS		SI		ExS		BDxS		WDxS		TxS		FA	FR(%)
	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)		
MO	11	78,57	5	35,71	4	44,44	10	62,5	8	66,67	9	47,37	47	55,95
MP	0	0,00	0	0,00	3	33,33	5	31,25	2	16,67	2	10,53	12	14,29
NP	3	21,43	9	64,29	2	22,22	1	6,25	1	8,33	8	42,10	24	28,57
MQ	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	1,19
Total	14	100	14	100	9	100	16	100	12	100	19	100	84	100

*LxS - Lacaune x Santa Inês; SI - Santa Inês puro; ExS - East Friesian x Santa Inês; BDxS- Black Dorper (Dorper) x Santa Inês; WDxS- White Dorper x Santa Inês; TxS - Texel x Santa Inês; FA= Frequência absoluta; FR = Frequência relativa (%).

Para a identificação das diferenças entre cada genótipo separadamente, foi realizado o sequenciamento. Os dados obtidos no sequenciamento de cada amostra selecionada conforme padrão identificado na análise de SSCP, revelaram a presença de três polimorfismos, os quais representam mudança de base (A/G), como mostrado na Figura 6.

```

45      -----CGAGCCATTACCATCCCCAAGCTGGAGCACCCGACCCAACAGGACATCGATCTG
GENBANK GIGGGTGAGCCATTACCATCCCCAAGCTGGAGCACCCGACCCAACAGGACATCGATCTG
40      -----CGAGCCATTACCATCCCCAAGCTGGAGCACCCGACCCAGCAGGACATCGATCTG
          *****

45      TACCATGCCATGTACATGGAAGCCCTGGTGAAGCTCTTCGACCAGCATAAGACCAAGTTC
GENBANK TACCATGCCATGTACATGGAAGCCCTGGTGAAGCTCTTCGACCAGCATAAGACCAAGTTC
40      TACCATGCCATGTACATGGAAGCCCTGGTGAAGCTCTTCGACCAGCATAAGACCAAGTTC
          *****

45      GGCCITCCCGGAGACCGAGGTCCTGGAGGTGAACTGAGCCTGTCTGCAGGGGCCAGCTTCT
GENBANK GGCCITCCCGGAGACCGAGGTCCTGGAGGTGAACTGAGCCTGTCTGCAGGGGCCAGCTTCT
40      GGCCITCCCGGAGACCGAGGTCCTGGAGGTGAACTGAGCCTGTCTGCAGGGGCCAGCTTCT
          *****

45      GGGAGGAACAGCTGCAAAATCGTTTTCTGCCAAGTTCTCAAGTGCTTTTTGTCTGTAAA
GENBANK GGGAGGAACAGCTGCAAAATCGTTTTCTGCCAAGTTCTCAAGTGCTTTTTGTCTGTAAA
40      GGGAGGAGCCAGCTGCAAAATCGTTTTCTGCCAAGTTCTCAAGTGCTTTTTGTCTGTAAA
          *****

45      TTTGGAACGTCATGGGTGCTGTGGGTTAATT-----
GENBANK TTTGGAAGCCTCATGGGTGCTGTGGGTTATTTAAAAGAAATTATAATAATTTGTAAA
40      TTTGGAAGCCTCATGGGTGCTG-----
          *****

```

Figura 6 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras do gene DGAT-2 e da sequência do gene DGAT-2 depositada no GenBank, número de acesso XM_012154874.1

Legendas: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

Resultados semelhantes ao do presente estudo para pesquisas realizadas no gene DGAT-2, em raças de caprinos, utilizando a técnica de PCR-SSCP, verificaram a presença de 7 polimorfismos, no entanto não foram encontrados nenhum SNPs no éxon 8 (FANG et al., 2012).

A partir do resultado do sequenciamento, as amostras foram adicionadas ao site do NCBI, no qual foram utilizadas ferramentas Orf Finder para a transformação das sequências de nucleotídeos em proteínas. Em seguida, as mesmas foram adicionadas ao site Clustal ômega e, através de sua ferramenta de alinhamento de proteínas, foi obtido o resultado da Figura 7.

```

dgat-2-40  MIFLPNLQNKHLRTWQKTICSWLLPEAGPCRQAQFTSRTSVSGRPNLVLCWKSFSFRASM
dgat-2-45  MIFLPNLQNKHLRTWQKTICSWFLPEAGPCRQAQFTSRTSVSGRPNLVLCWKSFSFRASM
**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

dgat-2-40  YMAWYRSMSCWVGCSSLGMVMGS
dgat-2-45  YMAWYRSMSCWVGCSSLGMVMGS
*****

```

Figura 7 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site Clustalomega (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE - EBI, 2015), de três amostras diferentes de proteínas do gene DGAT-2

Legendas: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

A partir dos três SNPs detectados no sequenciamento, dois polimorfismos (c. 229T>C; c.255T>C), resultaram na troca da fenilalanina por leucina. O que difere dos resultados encontrados por Fang et al. (2012), que, trabalhando com caprinos chineses, utilizando a técnica SSCP, identificaram dois genótipos (AA e AB), nos quais a frequência do genótipo AA e do alelo A foram predominantes em todas as raças caprinas, também foi encontrado uma mutação (A/G) no éxon 3, resultando na troca de lisina por arginina. Foi observado que o SNP foi de apenas 5 pb no local do *splicing* entre o éxon 3 e o íntron 3, o que pode acarretar no impedimento do *splicing* natural do RNAm, o que poderia afetar a síntese de proteínas. Do ponto de vista estrutural, esses polimorfismos só são significativos se forem associados com substituições de aminoácidos que podem, potencialmente afetar a estrutura ou a função da

proteína. Se ocorrer uma mutação no gene da DGAT-2 e essa causar uma transformação na sua respectiva enzima, poderá ser afetada a quantidade de tecido adiposo e a proteína produzida (FANG et al., 2012). A eletroforese no gel de agarose do gene FASN confirmou o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 228 pb (Figura 8), o que está de acordo com Ciecierska et al. (2013), que utilizaram os mesmos *primers* e obtiveram sucesso na amplificação do gene em bovinos, utilizando a técnica RFLP para análise de polimorfismos.

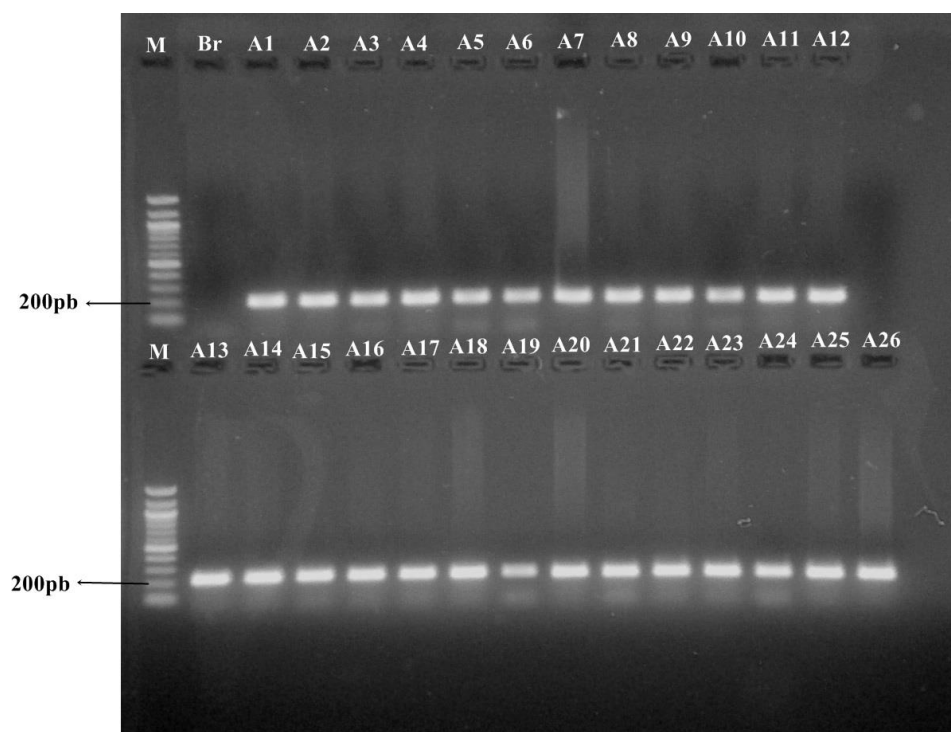


Figura 8 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene FASN, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 228pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

No presente estudo, entre os grupos genéticos avaliados, foi possível observar dois padrões diferentes de bandas (RS e RR) do gene FASN, caracterizando-os como genótipos variados (Figura 9).

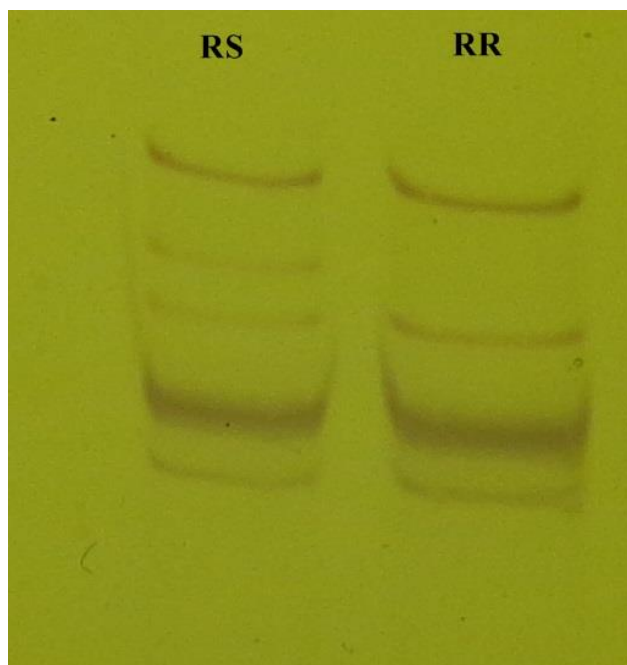


Figura 9 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando dois genótipos (RS e RR) de SNPs no gene FASN

As frequências dos genótipos observadas no gene FASN foram de 15,48% e 84,52%, respectivamente, para os genótipos RS e RR (Tabela 4). Entre os cruzamentos, verifica-se que os animais East Friesian x Santa Inês apresentaram maior frequência (44,44%) para o genótipo RS, enquanto para o genótipo RR, a sua maior expressão (89,47%) ocorreu no grupo genético Texel x Santa Inês. Dentro de cada grupo genético, o genótipo RR foi o que teve maior representatividade dentro do presente estudo.

Tabela 4 Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Ácido Graxo Sintase (FASN) em ovinos

Genótipo	Grupos Genéticos*												Total	
	LxS		SI		ExS		BDxS		WDxS		TxS			
FASN	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)
RS	3	21,43	2	14,29	4	44,44	2	12,5	0	0,00	2	10,53	13	15,48
RR	11	78,57	12	85,71	5	55,55	14	87,5	12	100	17	89,47	71	84,52
Total	14	100	14	100	9	100	16	100	12	100	19	100	84	100

*LxS - Lacaune x Santa Inês; SI - Santa Inês puro; ExS - East Friesian x Santa Inês; BDxS - Black Dorper (Dorper) x Santa Inês; WDxS- White Dorper x Santa Inês; TxS - Texel x Santa Inês; FA= Frequência absoluta; FR = Frequência relativa (%).

Ciecierska et al. (2013), utilizando a técnica RFLP em bovinos, detectaram a ocorrência de três genótipos AA, AG e GG, enquanto que, no presente estudo, somente foi observada a presença de dois genótipos (RS e RR) nos grupos genéticos dos ovinos estudados.

O genótipo heterozigoto foi o mais frequente (0,52), enquanto as frequências de AA e GG foram 0,11 e 0,37, respectivamente. As vacas AA produziram mais leite (873 kg) do que os indivíduos AG ($p \leq 0,05$). Os indivíduos AA foram caracterizados por maior produção de leite e rendimentos de proteínas. Produziram 36 kg de leite com mais gordura e 27 kg de proteína a mais na primeira lactação do que os indivíduos AG ($p \leq 0,05$). Nas lactações subsequentes, as diferenças de gordura e rendimento de proteína não foram estatisticamente significativas (CIECIERSKA et al., 2013).

Bhuiyan et al. (2009) identificaram a presença de polimorfismos no estudo realizado em bovinos da raça coreana Hanwoo. Nesse estudo, o polimorfismo no genótipo GG g.17924 (A>G) apresentou proporções do ácido graxo oléico (C18:1 ω 9) de 3,18% e 2,79% superiores aos genótipos AA e AG, respectivamente; e para o ácido graxo palmítico (C16:0) foram 3,81% e 4,01% inferiores a AA e GG, respectivamente.

A eletroforese no gel de agarose do gene SCD confirmou o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 377 pb (Figura 10). Zhang et al. (2010) utilizaram a mesma sequência de *primers* e também obtiveram sucesso na amplificação do gene em caprinos.

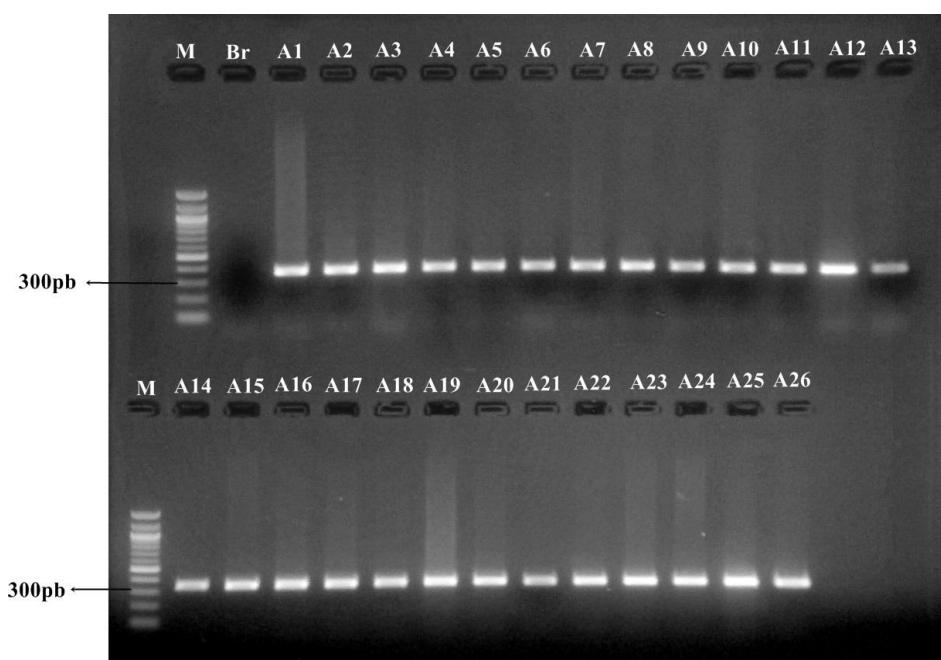


Figura 10 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene SCD, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 377pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

Entre os grupos genéticos avaliados, não foi verificada diferença em relação ao padrão de bandas, conforme uso da técnica de SSCP, sendo possível observar um único genótipo GY, conforme Figura 11.

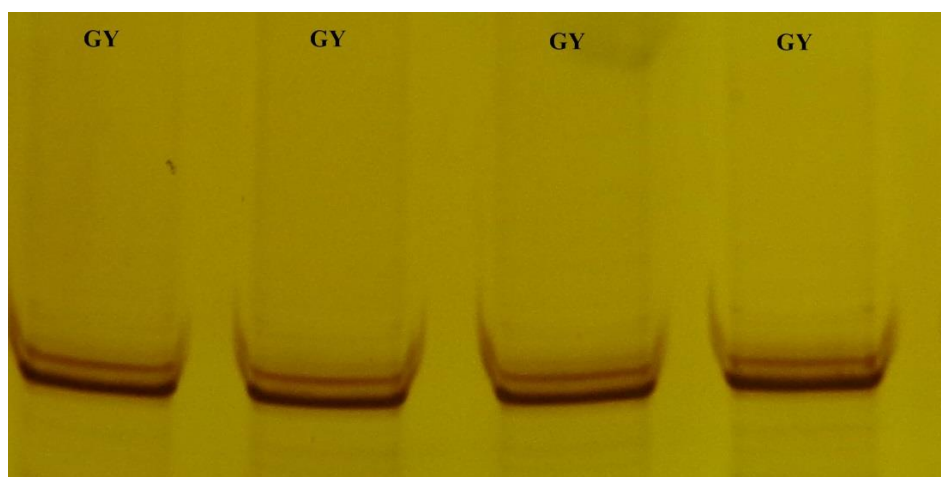


Figura 11 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando um único genótipo GY no gene SCD

Das amostras estudadas, uma foi selecionada e os dados obtidos após o sequenciamento comprovaram por homologia que o gene amplificado corresponde ao gene SCD. Esses resultados confirmaram a presença de apenas um genótipo sem mutação entre as amostras estudadas (Figura 12).

```

SCD-19      -----CCTTATGA
GenBank     TTTCTCTGCTTTTGTTCAGGTGAGGGCTTCCACAACCTACCACCACACCTTTCCTTATGA
              *****

SCD-19      CTA CTCTGCCAGCGAGTACCGCTGGCACATCAACTTTACCACATTCTTCATTGATTGCAT
GenBank     CTA CTCTGCCAGCGAGTACCGCTGGCACATCAACTTTACCACATTCTTCATTGATTGCAT
              *****

SCD-19      GGCTGCCATCGGTCTGGCTTATGACCGGAAGAAAGTATCCAAGGCTGCCGTCTTGGCCAG
GenBank     GGCTGCCATCGGTCTGGCTTATGACCGGAAGAAAGTATCCAAGGCTGCCGTCTTGGCCAG
              *****

SCD-19      GATGAAAAGAACTGGAGAGGAAAGCTACAAGAGTGGCTGAGTTTCTGGTCCCTTGGATTCT
GenBank     GATGAAAAGAACTGGAGAGGAAAGCTACAAGAGTGGCTGAGTTTCTGGTCCCTTGGATTCT
              *****

SCD-19      CTTTCCAAAAGCCAGCTGGGCAGAGGTTTAATGTTCTGTTTATAAACTACTGAATAATG
GenBank     CTTTCCAAAAGCCAGCTGGGCAGAGGTTTAATGTTCTGTTTATAAACTACTGAATAATG
              *****

SCD-19      CTACCAGGATGCTAAAGATGACGTTAACCCATTACAGTACAGTATTCTTTAAAAATTTCT
GenBank     CTACCAGGATGCTAAAGATGACGTTAACCCATTACAGTACAGTATTCTTTAAAAATTTCT
              *****

SCD-19      TTTTAAATTGAAACCAACAACCTCTGCCTTTATGATGC-----
GenBank     TTTTAAATTGAAACCAACAACCTCTGCCTTTATGATGCTAAGCTCATGTTCTTATTTCTTC
              *****

```

Figura 12 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras 1 e 2 do gene SCD e da sequência do gene SCD depositada no GenBank, número de acesso [gb|GQ904712.2|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/GQ904712.2)

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

Em bovinos Japanese Black, utilizando a técnica de RFLP, Taniguchi et al. (2004) identificaram três genótipos (VV, VA e AA) e dois alelos, os quais contribuíram para aumentar a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e menor ponto de fusão da gordura intramuscular. Portanto, o SCD pode ser considerado uma das causas de variação genética na composição de ácidos graxos nos respectivos animais.

Em um estudo realizado com 11 raças italianas de bovino, Milanesi, Nicoloso e Crepaldi (2008) reavaliaram a presença de três polimorfismos no éxon 5, confirmando a alta variabilidade alélica. No trabalho desses autores, foram descobertos três novos haplótipos: GTC (8,3%), ACT (1%) e ACC

(0,4%). O haplótipo GTC estava presente apenas raças com aptidão para a produção de carne, com altas frequências que variam de 11% a 25%, sendo um indicativo favorável à percentagem MUFA na gordura intramuscular como relatado por Taniguchi et al. (2004). Já, o haplótipo ACT estava presente apenas em duas raças leiteiras: Rendena (8%) e Italiano Brown (2%), sendo que o haplótipo ACC apresentou raramente no grupo de animais avaliado.

Zhang et al. (2010) trabalhando com caprinos verificaram a presença de três SNPs na região parcial do éxon 6 do gene SCD, enquanto, no presente estudo, não foi identificado nenhum polimorfismo. Da mesma forma, Fernandez et al. (2009), realizando um estudo com raças de ovinos leiteiros (duas raças leiteiras e duas raças egípcias antigas) também não relataram a ocorrência de polimorfismo ou mutações dentro da região codificadora do SCD. Contudo, esses autores encontraram quatro polimorfismos na região não codificadora do gene SCD, nos quais um desses polimorfismos foi localizado na região promotora do gene, enquanto que os três outros SNPs foram encontrados nos íntrons 2 e 3 do gene. Desses SNPs encontrados, o de maior importância é o que está na região promotora, pois ele pode influenciar elementos que regulam a expressão do gene, tal SNP apresentou frequências intermediárias nas raças leiteiras, ausentes nas raças de carne. Além disso, Oravcová et al. (2007), observaram que a frequência do gene SCD estava diretamente relacionada com o grau de especialização de produção e o teor de gordura de leite das raças leiteiras (Lacaune> Assaff> Churra). Diante disso, pode-se inferir que um polimorfismo no gene SCD pode afetar raças de forma diferente, em razão das especificidades na síntese de lipídios na glândula mamária, o que poderia explicar as diferenças no teor de gordura do leite, considerando o papel da enzima SCD sobre a sua composição de ácidos graxos (FERNANDES et al., 2009).

A eletroforese no gel de agarose do gene TE confirmou o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 505 pb (Figura 13). Utilizando

desses mesmos *primers* Oztabak et al. (2014) obtiveram o mesmo resultado de amplificação.

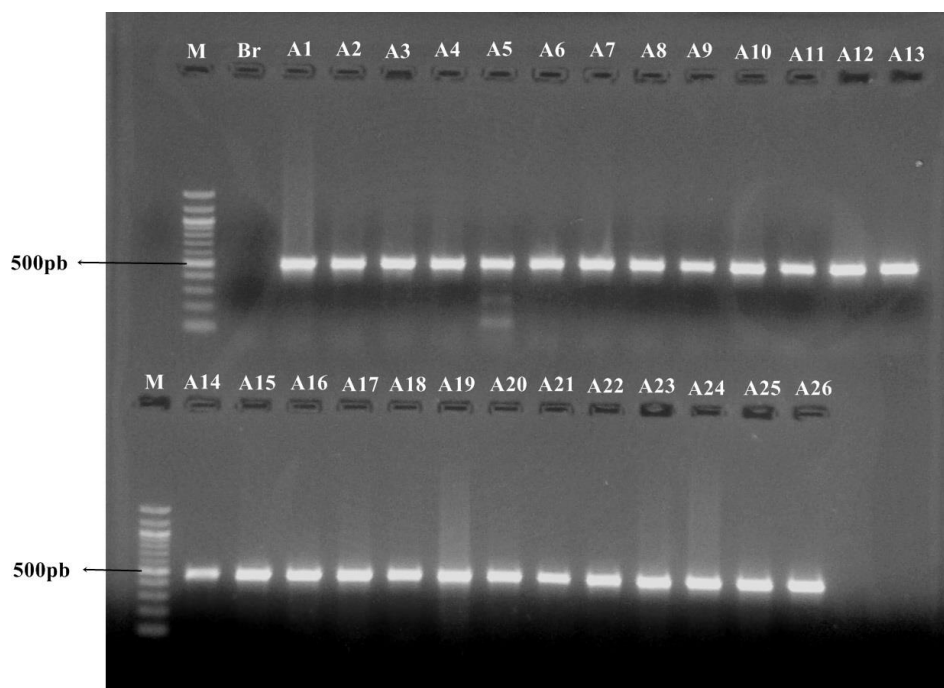


Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 1%, do gene TE, identificando o tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 505pb, em algumas amostras de DNA ovino

Legenda: Sendo M (marcador), Br (branco da amostra), A1, A2 até A26 (algumas amostras que foram identificadas na figura).

Entre os grupos genéticos avaliados foi possível observar diferentes padrões de bandas do gene TE, caracterizando-os como genótipos variados. A análise SSCP revelou três padrões de bandas originais no gene TE (TV, TT e UV) (Figura 14).

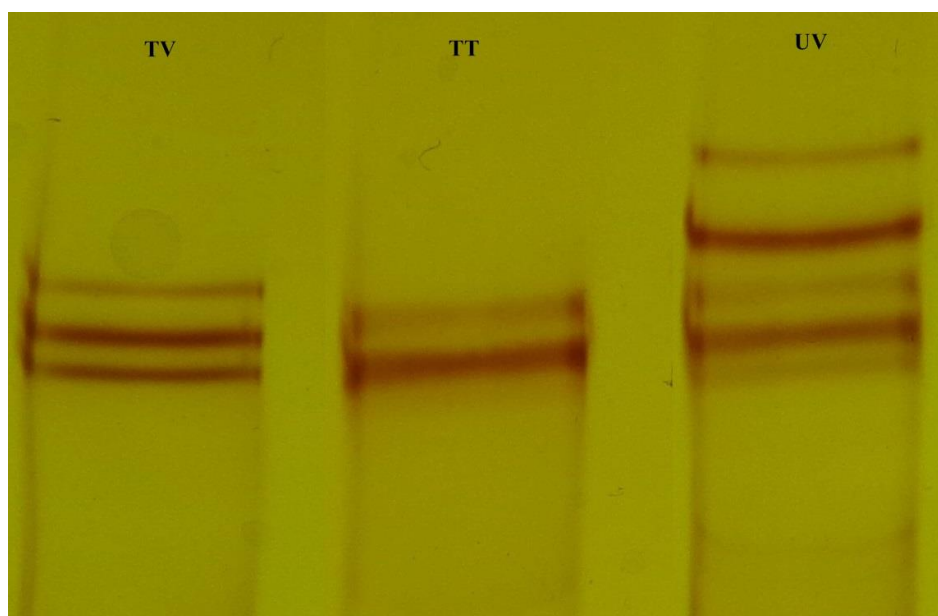


Figura 14 Gel de poliacrilamida 12,5% usando a técnica de SSCP identificando três genótipos TV, TT e UV de SNPs no TE

As frequências dos genótipos observadas para o gene TE foram de 84,53%, 7,14% e 8,33% respectivamente para os genótipos TT, TV e UV (Tabela 5). Entre os animais dos grupos genéticos estudados, o cruzamento entre Black Dorper x Santa Inês apresentou maior frequência (100%) para o genótipo TV, enquanto o cruzamento entre White Dorper x Santa Inês apresentaram as maiores frequências 16,67% para o genótipo TT e o grupo genético Texel x Santa Inês apresentou maior frequência (15,79%) para o genótipo UV. Dentro de cada grupo genético, o genótipo TV foi o que teve maior representatividade dentro do presente estudo.

Tabela 5 Frequência dos genótipos de Polimorfismo (SNP) segundo a técnica de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples (SSCP) do gene Domínio da Tioesterase (TE) em ovinos

Genótipos	Grupos Genéticos*												Total	
	LxS		SI		ExS		BDxS		WDxS		TxS			
	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)	FA	FR(%)
TV	10	71,43	13	92,86	8	88,89	16	100,00	10	83,33	14	73,68	71	84,53
TT	2	14,29	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	16,67	2	10,53	6	7,14
UV	2	14,29	1	7,14	1	11,11	0	0,00	0	0,00	3	15,79	7	8,33
Total	14	100	14	100	9	100	16	100	12	100	19	100	84	100

*LxS - Lacaune x Santa Inês; SI - Santa Inês puro; ExS - East Friesian x Santa Inês; BDxS – Black Dorper (Dorper) x Santa Inês; WDxS - White Dorper x Santa Inês; TxS - Texel x Santa Inês; FA= Frequência absoluta; FR. = Frequência relativa (%).

A partir das amostras estudadas, estas foram selecionadas conforme o padrão apresentado pela técnica de SSCP para serem sequenciadas e foram obtidos dados apenas de dois padrões, que comprovaram o resultado da técnica na qual evidenciaram-se três genótipos diferentes e a análise sequencial revelou 17 polimorfismos, dos quais dois geraram mudança de base e 15 deleções de base (Figura 15).

```

TE-2      -----CATCAGGCA-GG-GCATGCAGA-GGG-CCTACCGCATCGCCGGCTACTCT--T
GenBank   CGAGTGCATCAGGCA-GGTGCAGCCAGA-GGGGCCTACCGCATCGCCGGCTACTCT--T
TE-58     CGAGTGCATCAGGGAAGGTGCATGCAGAAGGGGCCTACCGCATCGCCGGCTACTCTCTT
          ***** * ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

TE-2      ACGGGGCTGCG-TGGCTTTCGAGATG-TGCTCACAGCTGCAGG-CCAGCAGAGCGCCG
GenBank   ACGGGGCTGCG-TGGCTTTCGAGATG-TGCTCACAGCTGCAGG-CCAGCAGAGCGCCG
TE-58     ACGGGGCTGCGGTGGCTTTCGAGATGGTGTCTCACAGCTGCAGGGCCAGCAGAGCGCCG
          ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

TE-2      GCCCCACGAACA-A-CAGCCTCTTCCTGTTTGACGGCTCCCA-CAATTCGIGATGGCCTA
GenBank   GCCCCACGAACA-A-CAGCCTCTTCCTGTTTGACGGCTCCCA-CAATTCGIGATGGCCTA
TE-58     GCCCCACGAACAACAAGCCTCTTCCTGTTTGACGGCTCCCAACAATTCGIGATGGCCTA
          ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

TE-2      CACTCAGGTGAGGGCGGCAGCAGACGGG-ATCCCCGGGTCCGCAGGCCAGGCCCTTGT
GenBank   CACTCAGGTGAGGGCGGCAGCAGACGGG-ATCCCCGGGTCCGCAGGCCAGGCCCTTGT
TE-58     CACTCAGGTGAGGGCGGCAGCAGACGGGAATCCCCGGGTCCGCAGGCCAGGCCCTTGT
          ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

TE-2      A-CCTGCCACTGC-----
GenBank   A-CCTGCCACTGCAGCACCTCCTCCTCCTTTCAGAGCTACCGGGCCAAGATGAACCC
TE-58     AACCTGCCA-----
          * ** * ** *

```

Figura 15 Alinhamento parcial utilizando ferramentas do site JustBio (2015), de duas amostras do gene TE e da sequência do gene SCD depositada no GenBank, número de acesso JN570752.2

Legenda: As semelhanças são indicadas por asterisco (*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

Zhang et al. (2008), estudando polimorfismos no domínio da Tioesterase (TE) do gene FASN em bovinos Angus com uso da técnica de RFLP, identificaram um polimorfismo no domínio da TE (g.17924A>G) que foi associado, significativamente, com a composição de ácidos graxos no músculo

Longissimus dorsi. Tal mutação pode resultar na mudança da função da enzima tioesterase (produção de ácidos graxos C14:0 e C16:0), de modo que a liberação da cadeia de ácidos graxos passe a ser quando os mesmos atinjam 18 carbonos, reduzindo, assim, as proporções de C14:0 e C16:0 no tecido adiposo, o que poderia explicar a diferença de ácidos graxos entre os indivíduos.

Estudos realizados em bovinos Wagyu x Limousin, identificaram duas mutações no gene FASN (g.16024A>G e g.16039T>C) encontradas no éxon 34, que determinam as substituições de aminoácidos treonina, para alanina e triptofano para arginina (ABE et al., 2009). Essas substituições dos aminoácidos podem causar alterações no domínio da β -cetoacil redutase, induzindo a mudança de conformação e especificidade do substrato do domínio da TE (ABE et al., 2009).

4 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o SSCP é uma técnica eficiente em detectar polimorfismos nos genes estudados (DGAT-1, DGAT-2, FASN e TE), nos quais foram possíveis observar diferentes genótipos na população de ovinos estudada.

Não houve a identificação de SNP em ovinos para os genes DGAT-1 e SCD, sugerindo que esses genes apresentam baixa taxa de polimorfismo na presente grupo de ovinos.

A ocorrência de SNPs é alta para ovinos em relação aos genes DGAT-2 e TE estudados, o que poderia influenciar a síntese de determinados ácidos graxos e alterar o perfil lipídico da carne.

REFERÊNCIAS

ABE, T. et al. Novel mutations of the *fasn* gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. **Biochemical Genetics**, New York, v. 47, n. 5/6, p. 397-411, June 2009.

BHUIYAN, M. S. A. et al. DNA Polymorphisms in *SREBF1* and *FASN* genes affect fatty acid composition in Korean Cattle (Hanwoo). **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Korea, v. 22, n. 6, p. 765-773, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 jan. 2000. p. 14-16.

Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/Anexo%20Abate.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2013.

BYUN, S. O. et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 385, n. 1, p. 174-175, Feb. 2009.

CIECIERSKA, D. et al. The influence of fatty acid synthase polymorphism on milk production traits in polish holstein-friesian cattle. **Journal of Animal and Plant Sciences**, Nairobi, v. 23, n. 2, p. 376-379, Dec. 2013.

CONTE, G. et al. Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 753-763, Feb. 2010.

COPPIETERS, W. et al. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. **Mammalian Genome**, New York, v. 9, n. 7, p. 540-544, July 1998.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **Clustal omega**: multiple sequence alignment. Disponível em:

<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

FANG, X. et al. Polymorphisms of diacylglycerol acyltransferase 2 gene and their relationship with growth traits in goats. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 1801-1807, Feb. 2012.

FEARON, A. M. Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 1, p. 1-13, Jan. 2010.

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

JUSTBIO. **Bioinformatics at the tip of your fingers**. Disponível em: <<http://www.justbio.com/hosted-tools.html> >. Acesso em: 22 jul. 2015.

KGWATALALA, P. M. et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 3'UTR SNPs and their influence on milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 126, n. 5, p. 394-403, Oct. 2009.

MADRUGA, M. S. et al. Efeito do genótipo e do sexo sobre a composição química e o perfil de ácidos graxos da carne de cordeiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 1838-1844, abr. 2006.

MELES, M. G. et al. Stearoyl-CoA desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. 90, n. 9, p. 4458-4465, Sept. 2007.

MILANESI, E.; NICOLOSO, L.; CREPALDI, P. Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. **Journal of Animal Breeding Genetics**, Hamburg, v. 125, n. 1, p. 63-67, Feb. 2008.

MORRIS, C. A. et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. **Mammalian Genome**, New York, v. 18, n. 1, p. 64-74, Jan. 2007.

ORAVCOVÁ, M. et al. Factors affecting ewe's milk fat and protein content and relationships between milk yield and milk components. **Czech Journal Animal of Science**, Prague, v. 52, n. 7, p. 189-198, 2007.

OZTABAK, K. et al. FASN gene polymorphism in indigenous cattle breeds of Turkey. **Folia Biologica**, Krakow, v. 62, n. 1, p. 29-35, 2014.

REGITANO, L. C. A. Extração de DNA para aplicação em reação de cadeia da polimerase. In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 179-186.

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

SCATA, M. C. et al. Ovine acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 737-742, Oct. 2009.

SCHENNINK, A. et al. *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. **Animal Genetics**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 467-473, Oct. 2007.

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

TANIGUCHI, M. et al. Genotype of SCD is associated with fatty acid composition in Japanese black cattle. **Mammalian Genome**, New York, v. 14, n. 2, p. 142-148, Feb. 2004.

YANG, J. P. et al. Polymorphism of mutation of DGAT-1 GENE in four Chinese indigenous sheep breeds. **Asian Journal of Animal and Veterinary**, Tokyo, v. 6, n. 5, p. 460-468, 2011.

ZHANG, C. L. et al. Stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene polymorphism in goat breeds. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, n. 9/10, p. 822-828, Oct. 2010.

ZHANG, S. et al. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 62-70, Feb. 2008.

ANEXO

ANEXO A - Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

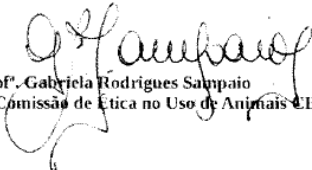
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 102/12, relativo ao projeto intitulado "Identificação do polimorfismo de genes relacionados à qualidade da carne ovina", que tem como responsável Peter Bitencourt Faria está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 28/02/2013.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 102/12, related to the project entitled "Identification of gene polymorphism related to sheep quality meat", under the supervision of Peter Bitencourt Faria, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), and was approved in February 28, 2013.

Lavras, 28 de fevereiro de 2013


 Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
 Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
 Campus Universitário -
 Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
 Tel.: +55 (35) 3829 5182
 cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br