

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS  
COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARÇA EM OVINOS  
SANTA INÊS**

**ALESSANDRO LIMA MACHADO**

**SALVADOR - BA**

**MAIO - 2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA

**POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS  
COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARÇAÇA EM OVINOS  
SANTA INÊS**

**Alessandro Lima Machado**  
Zootecnista

SALVADOR - BA  
MAIO - 2018

ALESSANDRO LIMA MACHADO

**POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS  
COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARÇA EM OVINOS  
SANTA INÊS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Dr. Luís Fernando Batista Pinto.

Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt.

**SALVADOR - BA  
MAIO - 2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C957 Lima Machado, Alessandro  
Polimorfismos nos genes LEP, GH, IGF1, CAPN1 e CAST associados  
com características de crescimento e carcaça em ovinos santa inês  
/ Alessandro Lima Machado. -- Salvador, 2018.  
71 f.

Orientador: Luís Fernando Batista Pinto. Coorientadora:  
Thereza Cristina Borio dos Santos  
Calmon de Bittencourt.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) --  
Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia,  
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2018.

1. Cordeiros. 2. Genes Candidatos. 3. Mutação. 4. Seleção. 5.  
SNP. I. Batista Pinto, Luís Fernando. II. Borio dos Santos Calmon  
de Bittencourt, Thereza Cristina. III. Título.

CDU: 636.084.4

**ALESSANDRO LIMA MACHADO**

**POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS  
COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARÇA EM OVINOS  
SANTA INÊS**

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 11 de maio de 2018.

Comissão examinadora:

---

Dr. Luís Fernando Batista Pinto  
UFBA  
Orientador/Presidente

---

Dr. Diego de Cordova Cucco  
UDESC

---

Dr. Gregório Miguel Ferreira de Camargo  
UFBA

---

Dr. Leandro Teixeira Barbosa  
UFS

---

Dr. Victor Breno Pedrosa  
UEPG

SALVADOR – BA  
Maio - 2018

À  
Minha família, **Sarah Maria Trindade  
Machado e Ana Lúcia Trindade  
Machado** (Filhas) pela imensa  
motivação e **Suamy Emanuele  
Trindade dos Santos** (Esposa) pelo  
amor e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço a **Deus**, por permitir essa realização e transformar em realidade o que até então era um sonho, por sempre me proporcionar mediante minha fé, saúde e sabedoria, essenciais para a realização de mais um sonho.

Meus **Orixás** por serem meus tutores e guias.

Minha mãe, **Maria do Nascimento Machado Souza**, por nunca ter desistido de mim e pelos exemplos de vida; ao meu padrasto **Júlio do Espírito Santo Souza**, por ser meu exemplo e uma pessoa a ser seguida.

Aos meus **familiares** por estarem, na medida do possível, sempre do meu lado e me motivando.

A família **Trindade**, em especial **Tia Ana, Tia Rita e Tio Eliezer** que sempre acreditaram, não medindo esforços para me apoiar no que se fosse preciso.

A meus orientadores, **Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon e Prof. Dr. Luís Fernando Batista Pinto**, pela oportunidade, por seu exemplo de dedicação e respeito ao próximo, pelos ensinamentos, confiança, amizade e, sobretudo pela **compreensão e paciência**.

À **Universidade Federal da Bahia (UFBA)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Zootecnia** pela oportunidade e apoio para a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)**, pela concessão da bolsa.

As instituições parceiras, em especial a **Embrapa Tabuleiros Costeiros e ao Laboratório** de biotecnologia animal da **ESALQ**, pelo auxílio à execução desse trabalho.

Aos professores **Gregório Miguel Ferreira de Camargo, Raphael Bermal Costa, Robson José Freitas Oliveira, Victor Breno Pedrosa** e todos os professores Doutores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA. Sou eternamente grato a todos vocês.

Aos irmãos de caminhada **Ariana Nascimento Meira e Luis Paulo Batista Sousa Junior** que estiveram sempre à disposição e contribuíram de forma decisiva, sem os quais tudo seria mais difícil.

Aos meus queridos **amigos**, espalhados por todos os cantos, que sempre me deram força e torceram para que eu pudesse conquistar mais essa vitória. Muito obrigada a todos que participaram direta ou indiretamente da construção e êxito deste trabalho!

**Muito Obrigado!**

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Tamanho da amostra (N), média e desvio padrão (DP) das variáveis de crescimento e da carcaça em ovinos Santa Inês.....	36
<b>Tabela 2</b>	Efeito aditivo (a) e erros-padrão (EP) de polimorfismos nos genes <i>CAST</i> e <i>CAPNI</i> associados com crescimento ou carcaça em ovinos Santa Inês.....	40
<b>Tabela 3</b>	Coefficientes de regressão ( $\beta$ ) e erros-padrão (EP) na análise de associação por haplótipos nos genes <i>CAST</i> e <i>CAPNI</i> em ovinos Santa Inês.....	42

### Capítulo 2

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Tamanho da amostra (N), média e desvio padrão (DP) das variáveis de crescimento e da carcaça em ovinos Santa Inês.....	54
<b>Tabela 2</b>	Efeito aditivo (a) e erro-padrão (EP) de polimorfismos nos genes <i>GH</i> , <i>IGF1</i> , e <i>LEP</i> associados com atributos de crescimento, carcaça e morfometria em ovinos Santa Inês .....	58
<b>Tabela 3</b>	Coefficientes de regressão ( $\beta$ ) e erros-padrão (EP) encontrados nos testes de associação com haplótipos nos genes <i>IGF1</i> e <i>LEP</i> em ovinos Santa Inês.....	59



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Haplótipos nos genes <i>CAST</i> e <i>CAPNI</i> com frequências $\geq 1\%$ .....	38

### Capítulo 2

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Haplótipos nos genes <i>IGF1</i> e <i>LEP</i> com frequências $\geq 1\%$ .....	56

## LISTA DE SUPLEMENTOS

- Suplemento 1.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *CAST* de ovinos Santa Inês..... 67
- Suplemento 2.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *CAPNI* de ovinos Santa Inês..... 68
- Suplemento 3.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *GH* de ovinos Santa Inês..... 69
- Suplemento 4.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *IGF1* de ovinos Santa Inês..... 70
- Suplemento 5.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *LEP* de ovinos Santa Inês. .... 71

## LISTA DE SIGLAS

AC	Altura de cernelha
AG	Altura de garupa
AOL	Área de olho de lombo
CAST	Calpastatina
CC	Comprimento de corpo
CAPNI	Calpaína
ETC	Escore de terminação de carcaça
EGS	Espessura de gordura subcutânea
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GH	Hormônio do Crescimento
GMD	Ganho médio diário
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina Tipo 1
LEP	Leptina
LG	Largura de garupa
LT	Largura do tórax
P240	Peso aos 240 dias
pb	Pares de bases
PC	Profundidade do corpo
P100	Peso aos 100 dias
PP	Perímetro da perna
PT	Perímetro do tórax
QTL	Loci de característica quantitativas
SAM	Seleção assistida por marcadores
SNP	Polimorfismo de base única

## SUMÁRIO

### POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST*, ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARCAÇA EM OVINOS SANTA INÊS

	<b>Página</b>
Resumo Geral.....	13
Abstract.....	14
Introdução Geral.....	15
Revisão de literatura.....	17
Referências.....	24

### Capítulo 1

#### POLIMORFISMOS NOS GENES *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS COM VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO E CARCAÇA EM OVINOS SANTA INÊS

Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	39
Discussão.....	42
Conclusões.....	45
Referências.....	45

### Capítulo 2

#### POLIMORFISMOS NOS GENES *GH*, *IGF1* E *LEP* ASSOCIADOS COM VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO E CARCAÇA EM OVINOS SANTA INÊS

Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	57
Discussão.....	60
Conclusões.....	63
Referências.....	63

# **POLIMORISMOS NOS GENES *LEP*, *GH*, *IGF1*, *CAPNI* E *CAST*, ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E CARÇA EM OVINOS SANTA INÊS**

## **RESUMO GERAL**

O objetivo deste estudo foi identificar associação entre polimorfismos nos genes *CAPNI*, *CAST*, *GH*, *IGF1* e *LEP* e características de interesse econômico em 192 ovinos Santa Inês. Peso vivo aos 100 (P100) e 240 dias (P240) dias de idade, as alturas na cernelha (AC) e na garupa (AG), o comprimento do corpo (CC), os perímetros do tórax (PT) e da perna (PP), as larguras do tórax (LP) e da garupa (LG), a profundidade de corpo (PC), a área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS) e o escore de terminação de carça (ETC) foram os fenótipos avaliados. Um total de 112 polimorfismos foram testados, sendo 25 no *CAPNI*, 42 no *CAST*, 16 no *GH*, 11 no *IGF1* e 18 no *LEP*. Cada marcador foi testado individualmente e por fim uma abordagem de haplótipos também foi conduzida. Vinte e três associações foram detectadas entre SNPs no gene *CAST* e as variáveis P100, P240, ETC, EGS, PT e LT. Além disso, efeitos de haplótipos no gene *CAST* sobre AOL, GMD, PT, CC e PP foram encontrados. Para os SNPs no *CAPNI*, sete efeitos aditivos sobre P100, AG, AC, PC, EGS e AOL foram encontrados, enquanto a análise de associação por haplótipos detectou efeito sobre EGS. O SNP g.47486819C>A localizado no *GH* foi associado com P100, enquanto o SNP g.171110428C>T no *IGF1* foi associado com AC, AG, LT, PP e GMD. Os SNPs localizados no gene *LEP* (g.92501407C>T, g.92502245A>G, g.92502283T>C, g.92503024G>A, g.92503025C>T, g.92503086G>A) foram associados com ETC, AG e EGS. Além disso, os SNPs g.92502623G>C e g.92502947A>C no *LEP* foram associados com ETC e AG. A análise da associação por haplótipos também revelou sete e três associações significativas após correção Bonferroni no *IGF1* e *LEP*, respectivamente. Portanto, o presente estudo identificou polimorfismos nos genes *CAPNI*, *CAST*, *GH*, *IGF1* e *LEP* associados a variáveis de crescimento e de carça em ovinos Santa Inês, os quais podem ser fontes de informação para a seleção assistida por marcadores.

**Palavras-chave:** cordeiros, genes candidatos, mutação, seleção, SNP

## ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN *CAPNI*, *CAST*, *GH*, *IGF1* AND *LEP* GENES WITH GROWTH AND CARCASS TRAITS IN SANTA INES SHEEP

### ABSTRACT

This study aimed to identify association between polymorphisms in *CAPNI*, *CAST*, *GH*, *IGF1*, and *LEP* genes and phenotypic traits in 192 Santa Ines lambs. Body weight at 100 (BW100) and 240 days (BW240), average daily gain (ADG) between 100 and 240 days, withers (WH) and croup (CH) heights, body length (BL), thoracic (TG) and leg (LG) girths, thoracic (TW) and croup (CW) widths, body depth (BD), rib eye area (REA), fat thickness (FT), and carcass finish score (CFS) were evaluated. A total of 112 polymorphisms were tested, 25 in *CAPNI*, 42 in *CAST*, 16 in *GH*, 11 in *IGF1*, and 18 in *LEP*. Each marker was tested individually and finally a haplotype association approach was also conducted. Twenty-three associations were detected between SNPs in the *CAST* gene and BW100, BW240, CFS, FT, TG and TW. In addition, effects of haplotypes on the *CAST* gene on REA, ADG, TG, BD and LG were found. For the SNPs in *CAPNI*, seven additive effects on BW100, WH, CH, BD, FT and REA were found, while haplotype association analysis detected an effect on FT. The SNP *g.47486819C>A* in *GH* was associated with BW100, whereas the SNP *g.171110428C>T* on *IGF1* was associated with WH, CH, TW, LG and ADG. The SNPs located in *LEP* gene (*g.92501407C>T*, *g.92502245A>G*, *g.92502283T>C*, *g.92503024G>A*, *g.92503025C>T*, *g.92503086G>A*) were associated with CFS, CH and FT. In addition, the SNPs *g.92502623G>C* and *g.92502947A>C* in *LEP* were associated with CFS and CH. Haplotype association analysis also revealed seven and three significant associations after Bonferroni correction in *IGF1* and *LEP*, respectively. Therefore, the present study identified polymorphisms in *CAPNI*, *CAST*, *GH*, *IGF1* and *LEP* genes associated with growth and carcass traits in Santa Ines sheep, which may be sources of information for marker-assisted selection.

**Keywords:** candidate genes, lambs, mutation, selection, SNP

## Introdução Geral

A ovinocultura é uma atividade pecuária promissora e difundida em todo o mundo devido à grande capacidade de adaptação apresentada pelos ovinos. Estima-se que exista no mundo cerca de 1,1 bilhões de cabeças, sendo a China o país com maior rebanho, com aproximadamente 134 milhões de cabeças (FAO, 2015). Entre os países sul-americanos, o Brasil possui o maior rebanho, com aproximadamente 17,7 milhões de animais, dos quais 57,0%, 28,0%, 7,0%, 4,5% e 3,5% encontram-se respectivamente nas regiões Nordeste, Sul, Centro-oeste, Sudeste e Norte (ANUALPEC, 2016).

A raça Santa Inês é uma das principais raças de ovinos formadas no Brasil. Sua origem ainda gera debates entre pesquisadores, alguns defendem o cruzamento entre as raças Somalis Brasileira, Bergamácia e Morada Nova (GUIMARÃES-FILHO e ATAÍDE-JR, 2009) e outros sugerem cruzamentos que envolve animais crioulos deslanados oriundos do continente africano e as raças Bergamácia, Somalis e Suffolk (SOUSA *et al.*, 2003). Esta raça tem aptidão para corte, devido aos bons atributos de crescimento (JUCÁ *et al.*, 2014) e de carcaça (JUCÁ *et al.*, 2016), mas, como toda raça, também necessita de um contínuo trabalho de seleção para aprimorar seu desempenho.

O peso vivo mensurado em diferentes idades e as medidas morfométricas obtidas *in-vivo*, são fáceis de mensurar em grande escala, apresentam herdabilidade moderada a alta (SAFARI *et al.*, 2005) e podem ser avaliados em ambos os sexos. Logo, respondem bem ao processo de seleção clássico, onde apenas o fenótipo e o pedigree são necessários. Contudo, genes de grande efeito podem adicionar informação ao processo de seleção dessas variáveis, como por exemplo o gene da Miostatina também conhecido como *GDF8*, que vem sendo utilizado com o objetivo de ampliar a produção de massa muscular (TRUKHACHEV, *et al.*, 2018; WALKER, *et al.*, 2018; AHAD, 2017.), mas também aumenta o peso vivo dos animais. Essa informação adicional pode contribuir para realizar uma seleção mais precoce, evitando gastos desnecessários no sistema de produção.

Genes candidatos apresentam ação biológica conhecida e estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma característica de interesse econômico (BRYNE e McMULLEN, 1996). Rothschild e Soller (1997) citam que a metodologia de estudo de genes candidatos tem alto custo, no entanto, apresenta vantagens como o alto

poder estatístico, a ampla aplicabilidade, a simplicidade operacional e à fácil aplicação na seleção assistida por marcadores. Contudo, a herança poligênica da maioria das variáveis de interesse econômico acaba se tornando um limitador da aplicação dos resultados dos testes de associação na prática do melhoramento animal. Ressalta-se que este fator não desqualifica os estudos de associação por gene candidato, visto que o conhecimento destes pequenos efeitos contribui para elucidar o complexo controle genético destas variáveis.

A seleção assistida por marcadores (SAM) pode contribuir para a melhoria de variáveis de crescimento e de carcaça. A vantagem dessa seleção está em aumentar o ganho genético de características com baixa herdabilidade, expresso em um dos sexos, ou de difícil mensuração em larga escala (MARTINEZ *et al.*, 2002). Enquadram-se neste contexto as variáveis de carcaça mensuradas por ultrassom, como a área de olho de lombo e a espessura de gordura subcutânea. Nos ovinos essas variáveis apresentam herdabilidade variando de moderada a alta magnitude (SAFARI *et al.*, 2005) e podem ser avaliadas tanto nos machos quanto nas fêmeas. Contudo, para mensuração das variáveis de carcaça são necessários profissionais bem treinados no manuseio do ultrassom e o custo deste equipamento ainda é elevado. Assim, trata-se de uma tecnologia ainda pouco aplicada no melhoramento de ovinos, especialmente no Brasil devido a baixa capacidade de investimento dos criadores.

Entre os muitos genes candidatos que podem ser alvo de estudos de associação com variáveis de crescimento e carcaça tem-se os genes *LEP*, *GH*, *IGF1* e aqueles que afetam o turnover proteico (*CAPNI* e *CAST*). Alguns desses genes foram estudados em espécies como bovinos (LEAL-GUTIÉRREZ, *et al.*, 2018; ROJAS, *et al.*, 2017; ZHOU, *et al.*, 2005), caprinos (ZHOU *et al.*, 2008) suínos (ROPKA-MOLIK *et al.*, 2017; URBAŃSKI *et al.*, 2015 e ROPKA-MOLIK *et al.*, 2014) e aves (ZHOU *et al.*, 2017) mas foram pouco estudados em ovinos, especialmente na raça Santa Inês. Assim, esta tese foi elaborada em dois capítulos, onde o primeiro é dedicado aos estudos de associação envolvendo os genes *CAPNI* e *CAST* e no segundo capítulo tem-se os estudos de associação envolvendo polimorfismos nos genes *LEP*, *GH* e *IGF1*. Em ambos os capítulos são avaliadas características obtidas *in vivo*, como peso vivo, alturas, larguras, comprimentos e perímetros de diferentes regiões do corpo, área do músculo



*Longissimus* e espessura de gordura subcutânea sobre este músculo, ambas mensuradas por ultrassonografia.

## **Revisão de literatura**

### **Gene *LEP***

Os primeiros relatos sobre o hormônio da Leptina foram feitos por Hervey (1959) e Coleman (1973) ao verificar a existência de uma substância ainda desconhecida que levava camundongos obesos a emagrecer. Contudo, Friedman e Halaas (1998) constataram que ratos obesos não apresentavam sinal de saciedade e identificaram que uma mutação interrompia a transcrição dos éxons do gene *LEP*, resultando em um stop prematuro da molécula de *mRNA*. Como resultado tinha-se o aumento de gordura corporal nos ratos. Posteriormente, o hormônio da leptina foi testado e identificou-se redução no consumo de alimentos e da gordura corporal (HOSSNER, 2005).

A leptina é secretada por adipócitos (JI, *et al.*, 1998) e os níveis circulante deste hormônio podem variar de acordo com a concentração e distribuição da gordura, variando entre as raças (DELAVAUD *et al.*, 2000). Este hormônio está envolvido no controle do metabolismo energético, em fatores que regulam o consumo de alimentos, comportamento reprodutivo, bem como na fisiologia do sistema imune (CHILLIARD *et al.*, 2001). Por apresentar essas propriedades, o gene *LEP* é considerado candidato em estudos de associação com características quantitativas, como por exemplo as taxas de crescimento e de deposição de gordura.

De modo geral, a compreensão do mecanismo de ação da leptina inclui a identificação dos seus receptores celulares, membros da família dos receptores de citocinas, cujo gene é transcrito e clivado em cinco diferentes isoformas: o receptor longo (Ob-Rb), os receptores curtos (Ob-Ra, c e d) e o receptor solúvel (Ob-Re). Além disso, a leptina pode circular na forma livre, ou ligada a transportadores solúveis, que têm por finalidade aumentar a meia-vida da leptina na circulação sanguínea, porém a forma livre da leptina é biologicamente a mais ativa (RIBEIRO *et al.*, 2007). No cérebro estão localizados principalmente no hipotálamo e estão associados ao controle do apetite, da reprodução e do crescimento (O'CALLAGHAN e BOLAND, 1999; ROBINSON *et al.*, 2006). Receptores de Leptina tem sido encontrado no arco do

hipotálamo e núcleo ventromedial em todas as espécies estudadas (WILLIAMS *et al.*, 2002).

O hipotálamo atua na sinalização da saciedade e no aumento do metabolismo para a queima de gordura e é desta forma que a leptina regula a ingestão de alimentos (AUWERX e STAELS, 1998; BARSH *et al.*, 2000).

A leptina é lançada na corrente sanguínea com intuito de atingir os tecidos de interesse. No cérebro ela atua no controle de neurotransmissores, como o neuropeptídeo Y (NPY), que inibi a ingestão de alimentos e estimula a termogênese (HOUSEKNECHT *et al.*, 1998). O aumento dos níveis de leptina, devido à grande quantidade de gordura depositada, diminui a expressão do NPY. Dessa forma, o sistema nervoso simpático é ativado e a produção de calor no tecido adiposo marrom é estimulada, resultando em aumento no gasto de energia corporal e perda de peso (XIE *et al.*, 1999).

As vias metabólicas do gene *LEP* estão sendo elucidadas nas mais variadas espécies, dentre elas os ruminantes, observando-se que o metabolismo de lipídios e a sua correlação com o balanço energético está diretamente relacionado com as 21 expressões do gene *LEP* e de seus receptores, desempenhando papel importante em diversas etapas metabólicas (PASSOS, 2006).

A associação entre polimorfismos do gene *LEP* com características de produção pode auxiliar os programas de melhoramento genético. Por isso, estudos de associação em animais domésticos tem crescido nos últimos anos, especialmente no tocante a características produtivas e reprodutivas. Nos bovinos de corte foram reportadas associações com peso vivo, deposição de gordura na carcaça e qualidades dos cortes cárneos (POMP *et al.* 1997), gordura na garupa avaliada por ultrassom, rendimento de carcaça, força de cisalhamento e peso do contrafilé (SUGISAWA *et al.*, 2005), ganho de peso diário (CAMACHO e GUTIÉRREZ, 2012) e acúmulo de gordura na carcaça (BUCHANAN *et al.*, 2002). Geary *et al.* (2003) encontraram evidências de leptina como preditor da composição da carcaça em bovinos de corte, enquanto um estudo de associação genômica ampla realizado por Doran *et al.* (2014) indicaram o *LEP* como um candidato para QTLs associados ao peso, gordura e conformação de carcaça em bovinos Holstein-Friesian. Em gado leiteiro, polimorfismos foram associados a

inúmeras características de interesse econômico, como balanço energético, produção de leite, peso vivo e variáveis de fertilidade (LIEFERS *et al.*, 2002).

Nos pequenos ruminantes um número menor de estudos de associação foi desenvolvido com o *LEP*, mas alguns polimorfismos foram identificados. Silva *et al.* (2012) reportaram polimorfismos no *LEP* em caprinos das raças Anglo-Nubiana e Boer. Enquanto Zhou *et al.* (2009) reportaram polimorfismos no *LEP* de ovinos das raças Romney, Merino, Corriedale, Poll Dorset e Suffolk. Em estudo de associação com ovinos da raça Kermani, Shojaei *et al.* (2010) reportaram associação com ganho de peso entre 3 e 12 meses. Barzehkar *et al.* (2009) relataram associações de SNP no intron 2 com porcentagem de gordura na cauda, peso total de gordura corporal, peso de carcaça fria e peso de carne magra. Boucher *et al.* (2006) relataram efeito do SNP *g.92501346A>G* sobre a área do olho do lombo e fibras na área da seção transversal deste músculo.

### **Gene *GH***

O hormônio do crescimento (*GH*) é produzido pelos somatotrofos da hipófise anterior e em sua forma predominante corresponde a aproximadamente 75% do *GH* circulante. Ele é constituído por uma cadeia única de 198 aminoácidos com duas pontes dissulfídricas internas, o que lhe confere peso molecular de 22 kDa, porquanto 5 a 10% correspondem a uma molécula menor de 20 kDa, resultado de *splicing* alternativo, e o restante é representado por formas deaminadas N-acetiladas ou oligômeros de *GH* (ROSENFELD, *et al.* 2002).

O *GH* é um dos principais reguladores do crescimento pós-natal e do metabolismo em mamíferos, em função de ações biológicas na gliconeogênese, na ativação da lipólise e na incorporação de aminoácidos nas proteínas dos músculos (GLUCKMAN *et al.*, 1987). No entanto, a principal ação do *GH* sobre o crescimento se dá de forma indireta, uma vez que ele estimula a síntese hepática do fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF-1*), que também tem ação anabólica (VERGANI, 1997). Assim, seja qual for a forma do *GH* atuar, ele apresenta relevante importância na pecuária devido sua relação com taxa de crescimento (GE *et al.*, 2003; ANDREA *et al.*, 2011).

Em ruminantes o *GH* atua diretamente nas ações catabólicas, estimulando o aumento da lipólise, diminuindo a glicogênese e restringindo o transporte da glicose (EIGENMANN, *et al.*, 1984). Os receptores do GH (GHR) estão localizados em maior concentração no fígado (LUCY *et al.*, 1999), onde sua expressão relaciona-se com o estado nutricional (PELL *et al.*, 1993) e fisiológico (KOBAYASHI *et al.*, 1999).

Estudos de associação foram desenvolvidos em bovinos e detectadas associações entre polimorfismos no gene *GH* e variáveis como peso vivo (PEREIRA *et al.*, 2005) e produção de leite (ZHOU *et al.*, 2005). Enquanto em suínos, Cheng *et al.*, (2000) reportaram efeitos sobre ganho de peso médio diário nas raças Duroc, Landrace e Tao-yuan e eficiência alimentar na raça Tao-Yuan. Em caprinos, Ilham *et al.*, (2016) estudaram polimorfismos genéticos do gene do hormônio de crescimento (GH) em populações de caprinos da raça Kacang. Também em caprinos, Hua *et al.*, (2009) verificaram os efeitos de polimorfismo do *GH* em características de crescimento em bodes da raça Boer. Gorlov *et al.*, (2017) descrevem associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com características de crescimento em ovinos da raça Salsk, enquanto Anwar *et al.*, (2017) identificaram associações de polimorfismo no *GH* com características quantitativas de ovinos da província de Jambi.

### **Gene *IGF1***

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (*IGF1*) compõe o eixo somatotrópico, um sistema hormonal com papel fundamental na regulação do crescimento dos animais (RENAVILLE *et al.*, 2002). O *IGF-1* é o principal mediador dos efeitos do *GH* e é capaz de causar uma grande variabilidade de efeitos sobre vários tecidos, acarretando no crescimento corporal do animal (BREIER e GLUCKMAN, 1991).

O IGF-1 é sintetizado no fígado e em outros tecidos como o tecido muscular, por isso esse hormônio exibe ambos os efeitos endócrinos e parácrinos (MURDOCH, *et al.*, 2005). O IGF-1 de origem periférica está envolvido em mediar a modulação nutricional do eixo neuroendócrino reprodutivo e sabe-se que os níveis circulantes deste fator de crescimento estão elevados na puberdade de ruminantes (BURTON *et al.*, 1994). O nível circulante de IGF1 pode ser usado para determinar os níveis de atividade do eixo somatotrófico como componente principal na rede de comunicação química, sendo

valioso para a compreensão da natureza biológica dos animais (STANIAR *et al.*, 2007). No entanto, vários fatores (raça, idade, sexo e estado nutricional) influenciam as concentrações séricas de IGF1 (DAVIS e SIMMEN, 2000). Devido às relações significativas entre o crescimento animal e as concentrações séricas de IGF1, estudos demonstraram que o IGF1 é reflexo de características de crescimento (DAVIS e SIMMEN, 2000; GE *et al.*, 2001).

Polimorfismos no gene *IGF1* vem sendo testados em estudos de associação com características de interesse econômico. Há prévios relatos de associação com deposição de gordura na carcaça, pesos vivo e de carcaça, ganho médio diário, bem como tamanho corporal, eficiência alimentar e produção de leite (DAVIS *et al.*, 1995; DAVIS e SIMMEN, 2000; JOHNSTON *et al.*, 2001). Silva *et al.*, (2006) reportaram associação de polimorfismos no gene *IGF1* com peso ao nascer, mas não com os pesos à desmama e ao sobreano de bovinos, enquanto Andrade *et al.*, (2008) identificaram associação com os pesos ao nascer e aos 240 dias em bovinos. Islam *et al.*, (2009) avaliaram as raças Angus, Charolês e seus cruzados, identificando associação com espessura de gordura mensuradas por ultrassom e rendimento de carne na carcaça.

Outros trabalhos demonstraram efeitos do gene *IGF1* sobre a reprodução em bovinos leiteiros. Há relatos de associação com atividade ovariana, incluindo o sinergismo e a amplificação dos efeitos das gonadotrofinas no crescimento e na esteroidogênese das células ovarianas (MONGET *et al.*, 2002), bem como no estabelecimento da dominância folicular (RIVERA *et al.*, 2001). Também foram identificadas associação entre a biodisponibilidade de IGF-I intrafolicular e a viabilidade folicular (RIVERA *et al.*, 2001).

Com pequenos ruminantes poucos estudos com o *IGF1* foram desenvolvidos. Contudo, He *et al.*, (2012) observaram associação entre polimorfismos no *IGF1* com taxa de parição. Duffield (2008) relacionaram polimorfismo no IGF1 a crescimento fetal e características reprodutivas. Negahdary *et al.*, (2013) e Gholibeikifard *et al.*, (2013) observaram efeitos significativos de polimorfismos no IGF-I sobre várias características de crescimento em ovinos Makoei e Baluchi. Hajhosseinlo *et al.*, (2013) investigou a associação de SNPs no IGF1 com várias características de tamanho corporal em ovinos. Grochowska *et al.*, (2018) reportaram associações de polimorfismos no IGF1 com

variáveis de carcaça como o peso de cortes e o conteúdo de gordura, além de variáveis de qualidade de carne como perdas de água por gotejamento e coloração.

### **Genes *CAPNI* e *CAST***

Todas as células de mamíferos contêm um sistema proteolítico dependente de cálcio, composto pela protease endógena calpaína e seu inibidor, a calpastatina. Existem duas isoformas mais comuns de calpaínas denominadas de  $\mu$ -calpaína e *m*-calpaína, sendo essa definição dada pela quantidade de cálcio necessária para sua ativação (GOLL *et al.* 1991). As calpaínas receberam mais atenção que as catepsinas devido habilidade de modificação da densidade da linha-Z, mesmo quando essa mudança não se correlaciona com a maciez (KOOHMARAIE, 1995). O sistema calpaínas não tem ação sobre os filamentos de actina e miosina em si (GOLL *et al.*, 1992). No entanto, Hughes *et al.*, (2001) citam que a ação das calpaínas ocorre em várias proteínas como tropomiosina, desmina, titina, nebulina, filamina e troponina T, onde encontram seu sítio de ligação específico.

O complexo enzimático calpaína/calpastatina é considerado o principal mecanismo que leva ao amaciamento da carne (ALVES *et al.*, 2005). As calpastatinas são enzimas inibidoras da ação das calpaínas e agem diminuindo a degradação das proteínas miofibrilares durante o processo de maturação. A calpastatina tem maior influência na carne 24 horas *post-mortem*, cessando seus efeitos assim que se esgotam as calpaínas ou quando o sistema enzimático é destruído pelo cozimento (RUBENSAM *et al.*, 1998). Ressalta-se ainda que este sistema tem importante papel nos principais processos intracelulares, com destaque para a reestruturação do citoesqueleto, a regulação do ciclo celular, a apoptose e a formação de tecido muscular (GOLL *et al.*, 2003; DEDIEU *et al.*, 2004; LEBART e BENYAMIN, 2006).

A atividade das calpaínas no músculo durante o *rigor-mortis* e durante a maturação da carne é influenciada por diversos fatores, os principais são: fatores genéticos (tipo de fibra muscular; maior ou menor quantidade de calpaína e calpastatina), declínio do pH, concentração de íons de cálcio, nível de concentração da calpaína e calpastatina no músculo e inativação e desnaturação das calpaínas (autólise)

(DELBARRE-LADRAT *et al.*, 2004). Melloni *et al.*, (2006) relataram que a ausência de cálcio ou baixos níveis deste elemento pode resultar na ligação do domínio L da calpastatina com o sitio inativo da  $\mu$ -calpaína ou da *m*-calpaína, formando um complexo que pode impedir a ativação destas enzimas.

O gene *CAPNI* é responsável pela transcrição da  $\mu$ -calpaína e nos ovinos ele está localizado no cromossomo 21, possui aproximadamente 25.000 pb e está dividido em 21 exons e 22 introns. Enquanto o gene *CAST* é responsável pela expressão da calpastatina, está localizado no cromossomo 5 e tem aproximadamente 90 Kb distribuídos em 27 exons e 26 introns. Associações entre polimorfismo nos genes *CAPNI* e *CAST* e características de carcaça e crescimento tem sido reportados em bovinos (CASAS *et al.*, 2006; SCHENKEL *et al.*, 2006; ARDICLI *et al.*, 2017<sup>a</sup>; ARDICLI *et al.*, 2017<sup>b</sup>), suínos (CIOBANU *et al.*, 2004; GANDOLFI, *et al.*, 2011), caprinos (ZHOU *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2012) e ovinos (Aali *et al.*, 2017). Contudo, a maior parte destes estudos focaram na avaliação de atributos da qualidade carne, como a maciez, dada a relação do sistema calpaina/calpastatina com a proteólise do músculo no *post-mortem* (KOOHMARAIE, 1995). Entretanto, além da reconhecida atuação no processo de maturação da carne, essas enzimas apresentam importantes funções como reestruturação do citoesqueleto, a regulação do ciclo celular, a apoptose e a formação de tecido muscular (GOLL *et al.*, 2003; DEDIEU *et al.*, 2004; LEBART e BENYAMIN, 2006). No desenvolvimento muscular do animal, os genes atuam na fase embrionária e adulta, através da degradação limitada de proteínas que constituem o citoesqueleto e a membrana da célula, pois favorece a função dos mioblastos e a formação dos miotubos que irão constituir a fibra muscular (DEDIEU *et al.*, 2002; BRESSAN *et al.*, 2011; AZARI *et al.*, 2012). Assim, este sistema também pode ter impacto sobre o peso vivo e outras variáveis de crescimento.

## Referências

- AALI, M., MORADI-SHAHRBABA, H., MORADI-SHAHRBABA, M., SADEGHI, M., YOUSEFI, A.R. 2017. Association of the calpastatin genotypes, haplotypes, and SNPs with meat quality and fatty acid composition in two Iranian fat-and thin-tailed sheep breeds. *Small Ruminant Research* 149, 40-51.
- AHAD, W.A., BEIGH, S.A., UDDIN RESHI, M., BHAT, R.A., YOUSUF, A., WANI, J. M., SHAH, R.A. 2017. Polymorphism in Exon-1 of MSTN Gene in Boer and Bakerwal Goats and its Association with Growth Traits. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 2629-2639.
- ALVES, D.D., DE TONISSI, R.H., DE GOES, B., MANCIO, A.B. 2005. Maciez da carne bovina. *Ciência Animal Brasileira* 6, 135-149.
- ANDRADE, P.C., GROSSI, D.A., PAZ, C.C.P., ALENCAR, M.M., REGITANO, L.C. A., MUNARI, D.P. 2008. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. *Animal Genetics* 39, 480-485.
- ANDREA, M. V., GOMES, M. V. M., MARCONDES, C. R., OLIVEIRA, K. N., RAMOS, E. S., FONTELES, S. B. 2011. Relação entre polimorfismo do gene do hormônio do crescimento e características de precocidade em novilhas da raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 63, 153-157.
- ANUALPEC. 2016. Anuário da Pecuária Brasileira, 20 ed. Instituto FNP, São Paulo, SP, Brasil.
- ANWAR, S. 2017. Association of growth hormone gene polymorphism with quantitative characteristics of thin-tailed sheep using PCR-RFLP in Jambi province. *African Journal of Biotechnology* 16, 1159-1167.
- ARDICLI, S., DINCEL, D., SAMLI, H., BALCI, F. 2017<sup>a</sup> Effects of polymorphisms at LEP, CAST, CAPN1, GHR, FABP4 and DGAT1 genes on fattening performance and carcass traits in Simmental bulls. *Archives Animal Breeding* 60, 61-70.
- ARDICLI, S., SAMLI, H., DINCEL, D., SOYUDAL, B., BALCI, F. 2017<sup>b</sup>. Individual and combined effects of CAPN1, CAST, LEP and GHR gene polymorphisms on carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls. *Archives Animal Breeding* 60, 303-313.
- AUWERX, J., STAELS, B. 1998. Leptin. *The Lancet* 351, 737-742.
- BARSH, G.S., FAROOQI, I.S., O'RAHILLY, S. 2000. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404, 644-651.
- BARZEHKAR, R., SALEHI, A., MAHJOUBI, F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Biotechnology* 7, 241-246.
- BOUCHER, D., PALIN, M. F., CASTONGUAY, F., GARIÉPY, C., POTHIER, F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian journal of animal science* 86, 31-35.
- BREIER, B.H., GLUCKMAN, P.D. 1991. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. *Livestock Production Science* 27, 77-94.
- BUCHANAN, F. C., FITZSIMMONS, C. J., VAN KESSEL, A. G., THUE, T. D., WINKELMAN-SIM, D. C., SCHMUTZ, S. M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution* 34, 105-116.



- BURTON, J. L., MCBRIDE, B. W., BLOCK, E., GLIMM, D. R., KENNELLY, J. J. 1994. A review of bovine growth hormone. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 167-201.
- CAMACHO, R.E., GUTIÉRREZ, A. 2012. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y de haplotipos para el gen de la Leptina con la ganancia de peso en la raza bovina blanco orejinegro usando técnicas bayesianas. *Comunicaciones en Estadística* 5, 33-53.
- CASAS, E., WHITE, S. N., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., RILEY, D. G., SMITH, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84, 520-525.
- CHENG, W. T., LEE, C. H., HUNG, C. M., CHANG, T. J., CHEN, C. M. 2000. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. *Theriogenology* 54, 1225-1237.
- CHILLIARD, Y., BONNET, M., DELAVAUD, C., FAULCONNIER, Y., LEROUX, C., DJIANE, J., BOCQUIER, F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domestic animal endocrinology* 21, 271-295.
- CIOBANU, D. C., BASTIAANSEN, J. W., LONERGAN, S. M., THOMSEN, H., DEKKERS, J. C., PLASTOW, G. S., ROTHSCHILD, M. F. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science* 82, 2829-2839.
- COLEMAN, D.L. 1973. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9, 294-298.
- DAVIS, M. E., BISHOP, M. D., PARK, N. H., SIMMEN, R. C. M. 1995. Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects. *Journal of animal science* 73, 1927-1932.
- DAVIS, M.E., SIMMEN, R.C. 2000. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor-I concentration and carcass traits in Angus beef cattle. *Journal of animal science* 78, 2305-2313.
- DEDIEU, S., POUSSARD, S., MAZÈRES, G., GRISE, F., DARGELOS, E., COTTIN, P., BRUSTIS, J. J. 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Experimental cell research* 292, 187-200.
- DELAVAUD, C., BOCQUIER, F., CHILLIARD, Y., KEISLER, D. H., GERTLER, A., KANN, G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology* 165, 519-526.
- DELBARRE-LADRAT, C., BOCQUIER, F., CHILLIARD, Y., KEISLER, D. H., GERTLER, A., KANN, G. 2004. Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food chemistry* 84, 441-446.
- DORAN, A.G., BERRY, D.P., CREEVEY, C.J. 2014. Whole genome association study identifies regions of the bovine genome and biological pathways involved in carcass trait performance in Holstein-Friesian cattle. *BMC genomics* 15, 837.
- DUFFIELD, J.A., VUOCOLO, T., TELLAM, R., YUEN, B. S., MUHLHAUSLER, B. S., MCMILLEN, I. C. 2008. Placental restriction of fetal growth decreases IGF1 and leptin mRNA expression in the perirenal adipose tissue of late gestation fetal sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1413-R1419.

- EIGENMANN, J.E., PATTERSON, D.F., FROESCH, E.R. 1984. Body size parallels insulin-like growth factor I levels but not growth hormone secretory capacity. *Acta Endocrinologica* 106, 448-453.
- FAO 2015. *Statistical Yearbook*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome: FAO.
- FRIEDMAN, J.M., HALAAS, J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- GANDOLFI, G., POMPONIO, L., ERTBJERG, P., KARLSSON, A. H., COSTA, L. N., LAMETSCH, R., RUSSO, V., DAVOLI, R. 2011. Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. *Meat Science* 88, 694-700.
- GE, W., DAVIS, M. E., HINES, H. C., IRVIN, K. M., SIMMEN, R. C. M. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 81, 641-648.
- GE, W., DAVIS, M. E., HINES, H. C., IRVIN, K. M., SIMMEN, R. C. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science* 79, 1757-1762.
- GEARY, T.W., McFadin, E. L., MacNeil, M. D., Grings, E. E., Short, R. E., Funston, R. N., Keisler, D. H. . 2003. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle 1. *Journal of Animal Science* 81, 1-8.
- GHOLIBEIKIFARD, A., AMINAFSHAR, M., HOSSEINPOUR-MASHHADI, M. 2013. Polymorphism of IGF-I and ADRB3 genes and their association with growth traits in the Iranian Baluchi sheep. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15, 1153-1162.
- GLUCKMAN, P.D., BREIER, B.H., DAVIS, S.R. 1987. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of Dairy Science* 70, 442-466.
- GOLL, D. E. 1991. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. *Reciprocal Meat Conference* 44, 25-33.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W. E. I., CONG, J. 2003. The calpain system. *Physiological reviews* 83, 731-801.
- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., TAYLOR, R. G., CHRISTIANSEN, J. A. 1992. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* 74, 225-237.
- GORLOV, I.F., KOLOSOV, Y. A., SHIROKOVA, N. V., GETMANTSEVA, L. V., SLOZHENKINA, M. I., MOSOLOVA, N. I., LEONOVA, M. A., KOLOSOV, A. Y., ZLOBINA, E. Y. . 2017. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed. *Small Ruminant Research* 150, 11-14.
- GROCHOWSKA, E., BORYS, B., JANISZEWSKI, P., KNAPIK, J., MROCZKOWSKI, S. 2017. Effect of the IGF-I gene polymorphism on growth, body size, carcass and meat quality traits in Coloured Polish Merino sheep. *Archives Animal Breeding* 60, 161-173.
- HAJIHOSEINLO, A., HASHEMI, A., RAZAVI-SHESHDEH, S. A., PIRANY, N. 2013. Association of the polymorphism in the 5' flanking region of the ovine IGF-I gene with growth and development traits in Makui sheep of Iran. *European Journal of Zoological Research* 2, 19-24.
- HE, J. N., ZHANG, B. Y., CHU, M. X., WANG, P. Q., FENG, T., CAO, G. L., LI, N. 2012. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. *Molecular Biology Reports* 39, 9801-9807.
- HERVEY, G.R. 1959. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *The Journal of physiology* 145, 336-352.

- HOSSNER, K.L. 2005. Hormonal regulation of farm animal growth. Cambridge: CABI Publishing. 231p.
- HOUSEKNECHT, K.L., BAILE, C. A., MATTERI, R. L., SPURLOCK, M. E. 1998. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science* 76, 1405-1420.
- HUA, G.H., CHEN, S. L., YU, J. N., CAI, K. L., WU, C. J., LI, Q. L., ZHANG, C. Y., LIANG, HAN, L., GENG, L.Y., SHEN, Z., XU, D. Q., YANG, L.G. 2009. Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. *Meat science* 81, 391-395.
- HUGHES, M. C., GEARY, S., DRANSFIELD, E., MCSWEENEY, P. L. H., O'NEILL, E. E. 2001. Characterization of peptides released from rabbit skeletal muscle troponin-T by  $\mu$ -calpain under conditions of low temperature and high ionic strength. *Meat science* 59, 61-69.
- ILHAM, F., RACHMAN, S.D.A.B., DAGONG, M.I.A. 2016. Genetic polymorphisms of growth hormone (GH) gene in Kacang goat population based on polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) identification. *Livestock Research for Rural Development* 28, 9.
- ISLAM, K. K., VINSKY, M., CREWS, R. E., OKINE, E., MOORE, S. S., CREWS, D. H., LI, C. 2009. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. *Animal genetics* 40, 766-769.
- JI, S., WILLIS, G. M., SCOTT, R. R., SPURLOCK, M. E. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Animal Biotechnology* 9, 1-14.
- JOHNSTON, D.J., HERD, R., REVERTER, A., ODDY, V. H. 2001. Heritability of IGF-I in beef cattle and its association with growth and carcass traits. In: *Proc. Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 14, 163-166.
- JUCÁ, A.F., A., FAVERI, J. C., MELO FILHO, G. M., DE LISBOA RIBEIRO FILHO, A., AZEVEDO, H. C., MUNIZ, E. N., PINTO, L. F. B. 2014. Performance of the Santa Ines breed raised on pasture in semiarid tropical regions and factors that explain trait variation. *Tropical animal health and production* 46, 1249-1256.
- JUCÁ, A.F., FAVERI, J. C., MELO FILHO, G. M., LISBOA, R. F., A., AZEVEDO, H. C., MUNIZ, E. N., PEDROSA, V. B., PINTO, L. F. B. 2016. Effects of birth type and family on the variation of carcass and meat traits in Santa Ines sheep. *Tropical Animal Health and Production* 48, 435-443.
- KOBAYASHI, Y., BOYD, C. K., BRACKEN, C. J., LAMBERSON, W. R., KEISLER, D. H., LUCY, M. C. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 140, 3947-3954.
- KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D., WHEELER, T. L., LONERGAN, S. M., DOUMIT, M. E. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *Journal of Animal Science* 73, 3596-3607.
- LEAL-GUTIÉRREZ, J. D., ELZO, M. A., JOHNSON, D. D., SCHEFFLER, T. L., SCHEFFLER, J. M., MATEESCU, R. G. 2018. Association of  $\mu$ -Calpain and Calpastatin Polymorphisms with Meat Tenderness in a Brahman–Angus Population. *Frontiers in Genetics* 9, 56.
- LEBART, M.C., BENYAMIN, Y. 2006. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *The FEBS journal*, 273, 3415-3426.
- LIEFERS, S. C., TE PAS, M. F. W., VEERKAMP, R. F., VAN DER LENDE, T. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy

- balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 85, 1633-1638.
- LUCY, M. C., BILBY, C. R., KIRBY, C. J., YUAN, W., BOYD, C. K. 1999. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal of reproduction and fertility* 54, 49-59.
- MARTINEZ, M.L, MACHADO, M.A. 2002. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, Campo Grande. Anais... 48-57.
- MELLONI, E., AVERNA, M., STIFANESE, R., DE TULLIO, R., DEFRANCHI, E., SALAMINO, F., PONTREMOLI, S. 2006. Association of calpastatin with inactive calpain A novel mechanism to control the activation of the protease? *Journal of Biological Chemistry* 281, 24945-24954.
- MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSEN, J. M., MAZERBOURG, S., PISSELET, C., MONNIAUX, D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 139-154.
- MURDOCH, G. K.; OKINE, E. K.; DIXON; W. T. 2005. GROWTH. IN: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Eds) 2nd edition. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Wallingford: Cab International Publishing, p. 489-524.
- NEGAHDARY, M., HAJIHOSSEINLO, A., AJDARY, M. 2013. PCR-SSCP variation of IGF1 and PIT1 genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Makoei Sheep. *Genetics Research International*.
- O'CALLAGHAN P.L.D., BOLAND, M.P. 1999. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323-1340.
- PASSOS, D. T. Efeito de Polimorfismos no Gene Lep na Expressão da Leptina em Adipócitos de Bovinos de Corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- PELL, J.M., SAUNDERS, J.C., GILMOUR, R.S. 1993. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132, 1797-1807.
- PEREIRA, A. P., ALENCAR, M. M. D., OLIVEIRA, H. N. D., REGITANO, L. C. D. A. 2005. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genetics and Molecular Biology* 28, 230-236.
- POMP, D., ZOU, T., CLUTTER, A. C., BARENDSE, W. 1997. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science* 75, 1427-1427.
- RENAVILLE, R., HAMMADI, M., PORTETELLE, D. 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 351-360.
- RIBEIRO, S. M. L., DOS SANTOS, Z. A., DA SILVA, R. J., LOUZADA, E., JUNIOR, J. D., TIRAPEGUI, J. 2007. Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 51, 11-24.
- RIVERA, G. M., CHANDRASEKHER, Y. A., EVANS, A. C. O., GIUDICE, L. C., FORTUNE, J. E. 2001. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biology of Reproduction* 65, 102-111.

- ROBINSON, J. J., ASHWORTH, C. J., ROOKE, J. A., MITCHELL, L. M., MCEVOY, T. G. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology* 126, 259-276.
- ROJAS, L. E. L., CADAVID, L. P., HERRERA, A. L., ZULUAGA, J. J. E. 2017. Variabilidad genética en seis SNPs de los genes CAPN1, CAST y LEP de toros brahman en ganaderías del trópico bajo colombiano. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 12, 88-102.
- ROPKA-MOLIK, K., BERETA, A., TYRA, M., RÓŻYCKI, M., PIÓRKOWSKA, K., SZYNDLER-NĘDZA, M., SZMATOŁA, T. 2014. Association of calpastatin gene polymorphisms and meat quality traits in pig. *Meat Science*, 97, 143-150.
- ROPKA-MOLIK, K., ROBERT, E., TYRA, M., PIÓRKOWSKA, K., OCZKOWICZ, M., SZYNDLER-NĘDZA, M., BERETA, A. 2017. CAPN1 gene as a potential marker for growth performance and carcass characteristics in pigs. *Animal Production Science* 57, 1014-1021.
- ROSENFELD RG, COHEN P. Disorders of growth hormone/insulin-like growth factor secretion and action. In: Sperling MA, editores. *Pediatric endocrinology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p. 211-88.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. 1997. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* 8, 13-20.
- RUBENSAM, J.M.; FELÍCIO, P.E., TERMIGNONI, C. 1998. Effects of the bos indicus genotype on calpastatin activity and texture of beef from steers slaughtered in the south of Brazil. *Food Science and Technology* 18, 405-409.
- SCHENKEL, F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z., MANDELL, I. B., YE, X., LI, H., WILTON, J. W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle 1. *Journal of Animal Science* 84, 291-299.
- SHOJAEI, M., MOHAMMAD ABADI, M., ASADI FOZI, M., DAYANI, O., KHEZRI, A., AKHONDI, M. 2011. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2, 67-73.
- SILVA, M. V. G. B. D., MARTINEZ, M. L., MACHADO, M. A., NASCIMENTO, C. S. D., CAMPOS, A. L., GUIMARÃES, M. F. M., AZEVEDO, A., L., S., MOITA, A. K. F. LUI, J. F. 2006. Genes do eixo somatotrófico e características de crescimento numa população F2 de bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 6, p. 981-986.
- SILVA, R.C.G. FERRAZ, J. B. S., MEIRELLES, F. V., ELER, J. P., BALIEIRO, J. C. C., CUCCO, D. C MATTOS, E. C., REZENDE, F. M., SILVA, S. L. 2012. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research* 11, 3721-3728.
- SINGH, L. V., TRIPATHI, V., SHARMA, R., PANDEY, A. K., MAITRA, A., MISHRA, B. P. 2012. Genetic polymorphism of CAPN1 gene in Sirohi goat. *International Journal of Meat Science* 2, 13-19.
- SOUSA, W.H., LÔBO, R.N.B., MORAIS, O.R. 2003. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas. In: EMBRAPA Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 1., 2003, João Pessoa. Anais... João Pessoa: EMEPA-PB, 2003. 501-522.
- STANIAR, W. B., KRONFELD, D. S., AKERS, R. M., HARRIS, P. A. 2007. Insulin-like growth factor I in growing thoroughbreds. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 91, 390-399.

- SUGUISAWA, Liliane. Identificação de genótipos superiores para crescimento e qualidade de carcaça em bovinos de corte submetidos ao modelo biológico superprecoce. Botucatu: UNESP, (2005). Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu. 2005
- TRUKHACHEV, V., YATSYK, O., TELEGINA, E., KRIVORUCHKO, A., ZHOU, H., HICKFORD, J. G. H. 2018. Comparison of the Myostatin (MSTN) gene in Russian Stavropol Merino sheep and New Zealand Merino sheep. *Small Ruminant Research* 160, 103-106.
- URBAŃSKI, P., PIERZCHAŁA, M., TERMAN, A., KAMYCZEK, M., RÓŻYCKI, M., ROSZCZYK, A., CZARNIK, U. 2015. The relationship between the polymorphism of the porcine CAST gene and productive traits in pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 95, 361-367.
- VERGANI, G., LAHR, G., WANG, Z. M., BARTKE, A., MAYERHOFER, A. 1997. Visualizing the expression of a human growth hormone (hGH) transgene in the liver: intrahepatic regional and intracellular differences of expression are associated with morphological alterations and hepatocellular proliferation. *Tissue and Cell* 29, 611-616.
- WALKER, R. G., MCCOY, J. C., CZEPNIK, M., MILLS, M. J., HAGG, A., WALTON, K. L., Cotton, T. R., Hyvönen, M., Lee, R. T., Craig, G. P., Thompson, T. B., HARRISON, C. A. 2018. Molecular characterization of latent GDF8 reveals mechanisms of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E866-E875.
- WILLIAMS, G. L., AMSTALDEN, M., GARCIA, M. R., STANKO, R. L., NIZIELSKI, S. E., MORRISON, C. D., Keisler, D. H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 339-349.
- XIE, C., ALBRECHT, E., WEGNER, J., BROCKMANN, G. A., KAZALA, C., WESELAKE, R. J., ENDER, K. 1999. Leptin, a palatability molecule? A Review. *Archives Animal Breeding* 42, 191-200.
- ZHOU, G. L., JIN, H. G., LIU, C., GUO, S. L., ZHU, Q., WU, Y. H. 2005. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences* 30, 595-598.
- ZHOU, H., HICKFORD, J.G.H. 2008. Allelic polymorphism of the caprine calpastatin (CAST) gene identified by PCR–SSCP. *Meat science* 79, 403-405.
- ZHOU, H., HICKFORD, J.G.H., GONG, H. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular biotechnology* 41, 22-25.
- ZHOU, Y.G., XIONG, Y., YANG, C. W., JIANG, X. S., RAN, J. S., JIN, J., WANG, Y., LAN, D., REN, P., HU, Y. D. LIU, Y. P. 2017. Experimental Verification of CAPN1 and CAST Gene Polymorphisms in Different Generations of Da-Heng Broilers. *BioMed Research International* 2017, ID 7968450.

## **CAPITULO 1**

### **POLIMORFISMOS NOS GENES *CAPNI* E *CAST* ASSOCIADOS COM VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO E CARÇA EM OVINOS SANTA INÊS**

## **Polimorfismos nos genes *CAPNI* e *CAST* associados com variáveis de crescimento e carcaça em ovinos Santa Inês**

**Resumo:**  $\mu$ -calpaína (*CAPNI*) e calpastatina (*CAST*) são genes que desempenham importantes funções no turnover proteico e são candidatos a associação com características de crescimento e carcaça em ovinos. Assim, este estudo teve por objetivo identificar associação entre polimorfismos nos genes *CAPNI* e *CAST* com peso corporal, morfometrias e características de carcaça em até 192 cordeiros Santa Inês. O peso vivo aos 100 (P100) e 240 (P240) dias de idade, o ganho médio diário de 100 a 240 dias (GMD), as alturas na cernelha (AC) e na garupa (AG), comprimento do corpo (CC), perímetros torácico (PT) e da perna (PP), larguras torácica (LT) e da garupa (LG), a profundidade do corpo (PC), a área do olho de lombo (AOL), a espessura de gordura subcutânea (EGS) e o escore de terminação de carcaça (ETC) foram avaliados *in vivo* neste estudo. Os animais foram genotipados para 25 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *CAPNI* e 39 no *CAST*. Análise de associação para cada SNP e também de haplótipos foram realizadas com todas as características avaliadas. Vinte e três associações foram detectadas entre SNPs no gene *CAST* e as variáveis P100, P240, ETC, EGS, PT e LT. Além disso, efeitos de haplótipos no gene *CAST* sobre AOL, GMD, PT, CC e PP foram encontrados. A substituição do haplótipo *GGGGA* pelo *AAAGG* foi associada com menores valores de PT ( $-2,72 \pm 1,27$ ), enquanto a substituição do haplótipo *CTAAT* pelo *TCAAT* foi associada com redução em AOL ( $-0,689 \pm 0,290$ ). A substituição de *CGCCC* por *TGCCC* foi associada com menor GMD ( $-23,6 \pm 10,4$ ), enquanto a substituição de *CGCCC* por *TAGTC* foi associada com menores CC ( $-3,38 \pm 1,49$ ) e PP ( $-2,84 \pm 1,37$ ). Para os SNPs no *CAPNI*, sete efeitos aditivos sobre P100, AG, AC, PC, EGS e AOL foram encontrados, enquanto a análise de associação por haplótipos detectou efeito sobre EGS. A substituição do haplótipo *GG* por *AG* foi associado com menor valor de EGS ( $-0,0143 \pm 0,0053$ ). Portanto, o presente estudo identificou SNPs e haplótipos nos genes *CAPNI* e *CAST* associados com características de crescimento e carcaça obtidas *in vivo* em cordeiros Santa Inês, os quais podem ser fontes de informação para a seleção assistida por marcadores.

**Palavras-chave:**  $\mu$ -calpaína, calpastatina, ovinos, polimorfismos, seleção assistida



## **Polymorphisms in *CAPNI* and *CAST* genes associated with growth and carcass traits in Santa Ines sheep**

**Abstract:**  $\mu$ -calpain (*CAPNI*) and calpastatin (*CAST*) genes play key roles in protein turnover and are candidate genes for genetic association studies growth and carcass traits in sheep. Thus, this study aimed to identify polymorphisms in *CAPNI* and *CAST* genes in association with body weight, morphometric, and carcass traits in 192 Santa Ines lambs. Body weight at 100 (BW100) and 240 (BW240) days of age, average daily gain from 100 to 240 days (ADG), withers (WH) and croup (CH) heights, body length (BL), thoracic (TG) and leg (LG) girths, thoracic (TW) and croup (CW) widths, body depth (BD), rib eye area (REA), fat thickness (FT), and carcass finish score (CFS) were measured. The animals were genotyped for 25 polymorphisms in *CAPNI* and 39 in *CAST*. Single locus and haplotype association analysis were carried out for all traits. Twenty-three single locus associations between polymorphisms in the *CAST* gene and BW100, BW240, CFS, FT, TG, and TW, were detected. Further haplotype replacements in *CAST* gene were associated with REA, ADG, TG, BL, and LG. The replacement of haplotype *GGGGA* by *AAAGG* was associated with lower values of TG ( $-2.72 \pm 1.27$ ), while the replacement of haplotype *CTAAT* by *TCAAT* leads to the reduction of REA ( $-0.689 \pm 0.290$ ). Similarly, the replacement of *CGCCC* by *TGCCC* was associated with lower ADG ( $-23.6 \pm 10.4$ ), while the replacement of *CGCCC* by *TAGTC* was in association with lower values of BL ( $-3.38 \pm 1.49$ ) and LG ( $-2.84 \pm 1.37$ ). For the SNPs in *CAPNI*, seven additive effects on BW100, CH, WH, BD, FT, and REA were found, while haplotype association analysis detected effect on FT. The haplotype replacement of *GG* by *AG* was associated with lower values of FT ( $-0.0143 \pm 0.0053$ ). Therefore, the present study identified SNPs and haplotypes in *CAPNI* and *CAST* genes associated with growth and *in vivo* carcass traits in Santa Ines sheep, which may be a source of information for marker-assisted selection.

**Keywords:**  $\mu$ -calpain, calpastatin, ovine, polymorphisms, marker-assisted selection

## Introdução

A  $\mu$ -calpain é uma enzima com atividade proteolítica sobre fibras musculares, enquanto a calpastatina inibe a  $\mu$ -calpaína (Calvo *et al.*, 2014). Essas enzimas têm várias funções importantes como a regulação do ciclo celular, apoptose e desenvolvimento do tecido muscular (Goll *et al.*, 2003; Lebart e Benyamin, 2006). Essas enzimas afetam o turnover proteico e, conseqüentemente, o crescimento muscular embrionário e no indivíduo adulto (Dedieu *et al.*, 2002; Bressan *et al.*, 2011; Azari *et al.*, 2012). Os genes *CAPNI* e *CAST* são responsáveis pela transcrição da  $\mu$ -calpaína e calpastatina, respectivamente, e foram avaliados como genes candidatos em estudos de associação com características de crescimento e carcaça em animais de interesse pecuário (Casas *et al.* 2006, Zhou *et al.*, 2008).

Embora estudos prévios em outras espécies, como bovinos (Miquel *et al.*, 2009), aves (Felício *et al.*, 2013) e suínos (Ropka-Molik *et al.*, 2017) tenham relatado associação entre polimorfismos no gene *CAPNI* e variáveis de interesse econômico, polimorfismos neste gene não foram previamente avaliados em ovino. Outro gene da família das calpaínas, conhecido como *calpain small subunit 1 (CAPNS1)* ou *CAPN4*, que está associado com a estabilização da *CAPNI*, foi objeto de estudo nos ovinos e efeitos significativos foram encontrados. Marques *et al.* (2016) relataram associação entre um SNP no intron 5 do gene *CAPN4* com peso vivo e GMD em três raças egípcias de ovinos. Enquanto um PCR-SSCP neste gene foi associado com peso vivo em ovinos da raça Zel (Dehnavi *et al.* 2012) e gordura intramuscular em ovinos Merino polonês (Grochowska *et al.*, 2017).

Polimorfismos no gene *CAST* foram objeto de vários estudos em ovinos. O polimorfismo *CAST/MspI* localizado entre os exons 1C/1D foi associado com peso corporal ou GMD em diferentes raças de ovinos (Nassiry *et al.*, 2005; Khan *et al.* 2012; Yilmaz *et al.*, 2014; Gorlov *et al.* 2016; Jawasreh *et al.*, 2017). Além disso, polimorfismos em outras regiões do gene *CAST* também foram associados com GMD e peso corporal (Byun *et al.* 2008; Chung e Davis, 2012; Dagong *et al.* 2016). No entanto polimorfismos no gene *CAST* não foram avaliados previamente em estudos de associação com características de crescimento ou de carcaça mensuradas *in vivo* nos ovinos Santa Inês. Portanto, este estudo teve como objetivo identificar associação entre

polimorfismos nos genes *CAPNI* e *CAST* com peso corporal, morfometrias e características de carcaça mensuradas *in vivo* em ovinos Santa Inês.

## **Material e Métodos**

### *População e fenótipos*

Este estudo foi realizado com a aprovação do comitê de ética no uso de animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (protocolo número 02/2010). Um total de 192 cordeiros Santa Inês, com aproximadamente 240 dias de idade, foram estudados. Destes, 106 nasceram entre 2010 e 2012 no campo experimental em Pedro Arle, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Frei Paulo, Sergipe, enquanto os outros 86 nasceram em 2014 e foram criados na fazenda experimental da UFBA, em São Gonçalo dos Campos, Bahia.

As medidas morfométricas foram mensuradas nos cordeiros à desmama e aos 240 dias de idade com o auxílio de fita métrica e hipômetro. Com o animal em estação foram mensuradas a altura na cernelha (AC - distância do ponto mais alto da vértebra torácica ao solo) e na garupa (AG - distância da tuberosidade coxal ao solo); o comprimento do corpo (CC - distância da tuberosidade supraglenóide a tuberosidade isquiática); as larguras do tórax (LT - distância entre as tuberosidades supraglenóides) e da garupa (LG - distância entre as tuberosidades coxais); a profundidade do corpo (PC - distância das vértebras torácicas ao esterno); os perímetros do tórax (PT leitura do contorno da cavidade torácica, logo após as escápulas) e da perna (PP - leitura do contorno da coxa no seu ponto médio).

O escore de terminação de carcaça (ETC) foi acessado *in vivo* com valores de 1 a 5, por um único avaliador, sendo: escore 1 (carcaça muito magra), 2 (magra), 3 (média), 4 (gorda) e 5 (muito gorda). Além disso, avaliações *in vivo* da carcaça, por ultrassonografia, foi executada para obter a área do olho de lombo (AOL) e a espessura gorda subcutânea (EGS) aos 240 dias de idade. As imagens de AOL e EGS foram registradas entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, sempre do lado esquerdo dos cordeiros. O comprimento (A) e a profundidade máxima (B) do músculo foram medidos para obter a estimativa de AOL com a equação:  $AOL = \frac{A}{2} * \frac{B}{2} * \pi$ . O peso corporal foi mensurado aos 100 (P100) e 240 (P240) dias de idade, com os quais foi calculado o ganho médio

diário. Um resumo estatístico descritivo das variáveis analisadas pode ser observado na Tabela 1.

#### *Extração de DNA e protocolo de PCR*

Para extração de DNA foi coletado em cada animal 5 ml de sangue em tubos vacutainer contendo EDTA. A extração de DNA foi efectuada utilizando um método de precipitação em soluções de sal e proteinase K, seguindo o protocolo Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007). O desenho dos *primers* para amplificação dos fragmentos de DNA foi elaborado usando a sequência do gene no genoma de ovinos versão 4.0 (NC\_019468.2), com os seguintes códigos de acesso: *CAST* (ID: 443364) e *CAPNI* (ID: 443130).

**Tabela 1.** Tamanho da amostra (N), média e desvio padrão (DP) das variáveis de crescimento e da carcaça em ovinos Santa Inês.

Variáveis	N	Média	DP
Altura na cernelha (cm)	184	66,26	5,69
Altura na garupa (cm)	184	66,93	5,64
Comprimento do corpo (cm)	184	56,27	8,94
Largura torácica (cm)	184	17,77	2,11
Largura da garupa (cm)	180	15,77	3,36
Perímetro da perna (cm)	184	40,47	8,23
Perímetro torácico (cm)	184	73,21	4,76
Profundidade do corpo (cm)	180	25,23	2,13
Peso vivo aos 100 dias (kg)	172	20,56	4,15
Peso vivo aos 240 dias (kg)	184	34,03	6,27
Ganho médio diário (g)	171	136,99	62,11
Área do olho de lombo (cm <sup>2</sup> )	97	7,17	1,64
Espessura de gordura subcutânea (cm)	99	0,20	0,40
Escore de terminação de carcaça	181	2,32	0,37

Para o gene *CAST* foram utilizados os primers 5'-AAAAGCCAAAGAAGAGGATCG-3' (*forward*) e 3'-GGGAAACCACTTCAGAGACG-5' (*reverse*), com os quais foram amplificados 4108 pb, localizados entre os exons 20 a 23 (posições de 93395596 – 93399703 da sequência referência). Para amplificar este fragmento um PCR touchdown foi usado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 98 °C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos

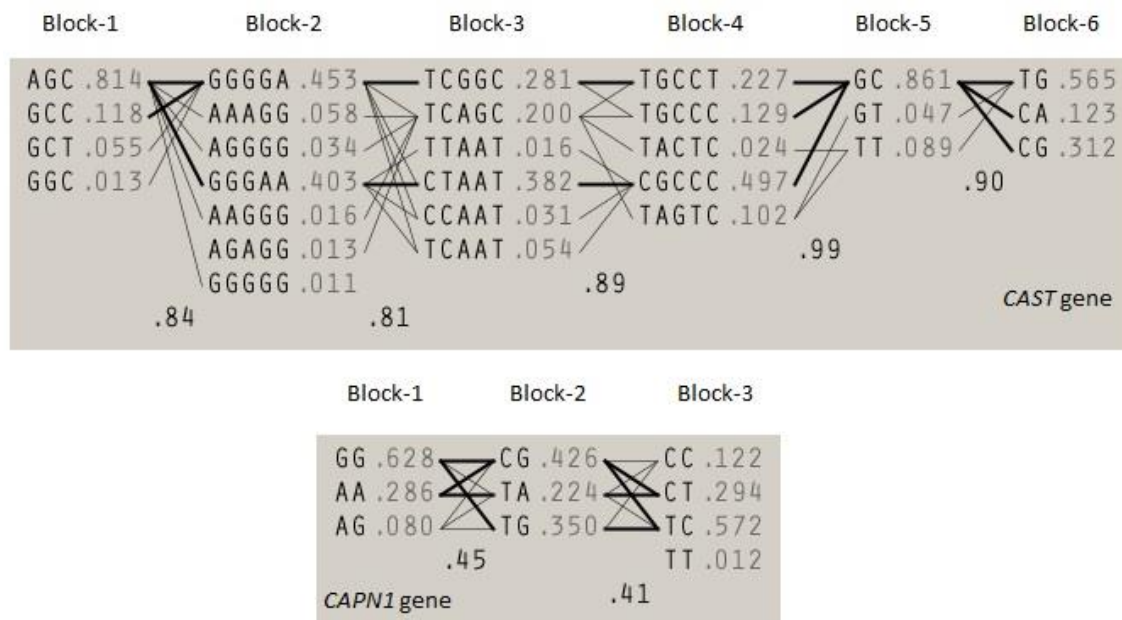
com desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 63 °C diminuindo a 58 °C variando -0,5 °C em cada ciclo de 30 segundos e extensão a 72 °C por quatro minutos. Imediatamente após os primeiros ciclos, mais 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão em 72 °C por 4 minutos, terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Cinquenta e oito polimorfismos foram identificados neste fragmento do gene *CAST* (ANEXO Suplemento 1).

Para o *CAPNI* os primers 5'-TGTGCTGCGTTTCTTCTCAG-3' (forward) e 3'-AAGGTCACCACTCCATCCAG-5' (reverse) foram utilizados, com os quais amplificou-se um fragmento de 3927 pb, localizado entre os exons 12 e 21 (posições entre 42625107 e 42629033 da sequência referência). As condições do PCR foram: desnaturação inicial a 98 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão em 72 °C por 4 minutos, terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Quarenta e cinco polimorfismos foram encontrados neste fragmento de *CAPNI* (ANEXO Suplemento 2).

#### *Haplótipos e equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE)*

O HWE foi testado comparando as heterozigosidades preditas e observadas. A heterozigosidade predita (HP) foi obtida com a equação:  $HP = 2 * (1 - MAF) * MAF$ , onde a MAF é a menor frequência alélica. O programa Haploview (Barrett *et al.*, 2005) foi usado para testar o HWE e identificar os blocos de haplótipos. No gene *CAST* foram encontrados seis blocos de desequilíbrio de ligação (LD). O Bloco-1 tem 201 pb (SNPs *g.93395316A>G*, *g.93395469G>C* e *g.93395517C>T*), o bloco-2 tem 200 pb (SNPs *g.93395643G>A*, *g.93395788G>A*, *g.93395808G>A*, *g.93395835G>A* e *g.93395843A>G*), o bloco 3 tem 556 pb (SNPs *g.93396180T>C*, *g.93396211C>T*, *g.93396422A>G*, *g.93396619A>G* e *g.93396736T>C*), o bloco-4 tem 290 pb (SNPs *g.93397428C>T*, *g.93397448G>A*, *g.93397600C>G*, *g.93397705C>T* e *g.93397718C>T*), o bloco-5 tem 63 pb (SNPs *g.93397857G>T* e *g.93397920C>T*), enquanto o bloco 6 tem 710 pb (SNPs *g.93398765C>T* e *g.93399475G>A*). Três blocos foram encontrados no *CAPNI*, sendo o bloco-1 com 175 pb (SNPs *g.42626364G>A* e *g.42626539G>A*), o bloco-2 com 64 pb (SNPs *g.42628173T>C* e *g.42628237G>A*) e o

bloco 3 com 240 pb (SNPs *g.42628438T>C* e *g.42628678C>T*). Os haplótipos com frequência  $\geq 1\%$  estão na Figura 1.



**Figura 1.** Haplótipos nos genes *CAST* e *CAPN1* com frequências  $\geq 1\%$

### *Análise de dados fenotípicos*

As variáveis fenotípicas analisadas aqui passaram por uma avaliação prévia através do modelo  $y_{ijkl} = \mu + F_i + Y_j + M_k + \alpha_{ijkl}(A) + \varepsilon_{ijkl}$ , onde  $y_{ijkl}$  é o valor da característica sob estudo,  $\mu$  é a média geral,  $F_i$  é o efeito de fazenda (dois níveis),  $Y_j$  é o efeito do ano de nascimento (quatro níveis),  $M_k$  é efeito de mês de nascimento (12 níveis),  $\alpha_{ijkl}(A)$  é o efeito da covariável idade do animal no momento da avaliação e  $\varepsilon_{ij}$  é o resíduo. O PROC MIXED do *statistical analyses system* (SAS, 2011) foi usado nesta análise, e o objetivo da mesma foi identificar possíveis erros de registro, bem como verificar os pressupostos da análise de variância.

### *Análise de associação por marcas simples*

Uma análise de associação por marcas individuais foi conduzida com a Qxpack 5 (Pérez-Enciso e Mizstal, 2011), com a qual se executa um teste de razão de verossimilhanças. O modelo geral pode ser descrito como,  $y = \beta X + \sum_{k=1}^n Z\delta_k + \varepsilon$ ,

onde  $y$  é o vetor que contém os registros das variáveis,  $\beta$  é o vetor de soluções para os efeitos fixos,  $\delta_k$  é o vetor de soluções para os efeitos genéticos para qualquer um dos  $n$  QTLs que afetam a variáveis,  $X$  e  $Z$  são as matrizes de incidência que associam observações em  $y$  aos vetores de soluções em  $\beta$  e  $\delta_k$  respectivamente, e  $\varepsilon$  é o vetor dos resíduos. Os efeitos fixos incluídos no modelo foram os mesmos descritos anteriormente. Os efeitos aditivo e de dominância dos QTLs foram testados. Um efeito aditivo positivo indica que o alelo mutante está associado a valores médios mais elevados. Um efeito dominante positivo indica que o genótipo heterozigoto tem o valor médio mais próximo do homozigoto mutante.

#### *Análise de associação por haplótipos*

A análise da associação por haplótipos foi realizada com a sub-rotina `haplo.glm` do pacote `haplo.stat` versão 1.7.7 (<https://Cran.r-Project.org/web/Packages/haplo.stats/index.html>), conforme descrito em Lake *et al.* (2003). Apenas haplótipos com frequência  $\geq 4\%$  foram utilizados nesta análise.

#### *Limiar de significância*

Um total de 67 SNPs (42 no *CAST* e 25 no *CAPNI*) apresentaram HWE ( $p$ -valor  $> 0,05$ ) e MAF superior a 1%, os quais foram usados na análise de associação. Assim, a correção de Bonferroni para 5% levou a um limiar de significância igual a 0,0003. A análise de haplótipos revelou seis blocos de haplótipos no gene *CAST* e três no *CAPNI*, portanto a correção de Bonferroni a 5% levou a um limiar de 0.0025. Efeitos significativos a 5%, não corrigidos para Bonferroni, são também apresentados, mas considerados como sugestivos.

## **Resultados**

#### *Análise de marcas simples no gene CAST*

Efeitos de dominância não foram encontrados ( $P > 0,05$ ) para os polimorfismos no gene *CAST*, mas 23 efeitos aditivos sugestivos ( $P < 0,05$ ) sobre P100, P240, ETC, EGS, PT e LT foram encontrados (Tabela 2). Para P100 foram encontrados efeitos dos SNPs  $g.93397007T>C$ ,  $g.93397419G>A$  e  $g.93397600C>G$ , onde o alelo não mutante dos SNPs  $g.93397007T>C$  e  $g.93397419G>A$  e o alelo mutante do SNP

g.93397600C>G foram associados com maior peso vivo nesta idade. As diferenças entre homozigotos foram 3,53 kg (g.93397007T>C), 2,46 kg (g.93397419G>A), e 4,37 kg (g.93397600C>G). Além disso, o alelo mutante do SNP g.93398765C>T foi associado com maior P240 e a diferença entre CC e TT foi de 2,41 kg.

Também foram encontradas associações entre SNPs no gene *CAST* e variáveis morfométricas PT e LT (Tabela 2). O alelo não mutante do SNP g.93396422A>G foi associado com maior valor de PT e as diferenças entre AA e GG foi 2,01 cm. Para LT foram encontrados efeitos de onze SNPs e a diferença entre os homozigotos variou de 0,83 cm (g.93397428C>T) a 1,29 cm (g.93396010G>A).

**Tabela 2.** Efeito aditivo (a) e erros-padrão (EP) de polimorfismos nos genes *CAST* e *CAPNI* associados com crescimento ou carcaça em ovinos Santa Inês

Variável	SNP	LRT	P-valor	a	EP	Intron	NCBI Número
<b><i>CAST</i></b>							
P100	g.93397007T>C	9,12	0,0025	-1,766	0,5748	22	rs428213368
P100	g.93397419G>A	4,20	0,0405	-1,232	0,5969	22	rs400315475
P100	g.93397600C>G	6,12	0,0133	2,183	0,8720	22	rs418161864
P240	g.93398765C>T	3,92	0,0476	1,203	0,6029	24	rs418818682
ETC	g.93396809G>A	4,98	0,0256	-0,089	0,0396	22	rs423099226
ETC	g.93397007T>C	5,11	0,0238	-0,092	0,0403	22	rs428213368
ETC	g.93397419G>A	4,08	0,0434	-0,084	0,0412	22	rs400315475
ETC	g.93397718C>T	4,24	0,0395	-0,085	0,0408	22	rs415186098
ETC	g.93397780T>C	5,66	0,0173	-0,121	0,0505	22	rs430517308
ETC	g.93398765C>T	12,17	0,0005	0,123	0,0344	24	rs418818682
EGS	g.93395808G>A	4,81	0,0283	0,019	0,009	22	rs403339381
PT	g.93396422A>G	4,42	0,0355	-1,004	0,4748	22	rs419473804
LT	g.93395469G>C	4,98	0,0257	-0,628	0,2796	21	rs400979323
LT	g.93395835G>A	8,51	0,0035	0,562	0,1903	22	rs414639908
LT	g.93396010G>A	4,10	0,0428	0,643	0,3154	22	rs415836747
LT	g.93396140A>G	4,84	0,0278	0,426	0,1926	22	rs605481564
LT	g.93396154T>C	5,23	0,0222	0,454	0,1972	22	rs417020700
LT	g.93396180T>C	6,17	0,0130	0,480	0,1917	22	rs406915912
LT	g.93396211C>T	8,53	0,0035	0,550	0,1860	22	rs422402447
LT	g.93396619A>G	6,54	0,0106	-0,508	0,1969	22	rs399204438
LT	g.93396736T>C	5,73	0,0167	-0,478	0,1983	22	rs425885251
LT	g.93397428C>T	4,18	0,0410	-0,414	0,2013	22	rs411571641
LT	g.93398765C>T	8,11	0,0044	0,552	0,1917	24	rs418818682
<b><i>CAPNI</i></b>							
PC	g.42627413T>C	4,28	0,0386	1,6367	0,5496	17	rs420860201
P100	g.42626364G>A	4,32	0,0377	-1,038	0,4953	16	rs417258958
AG	g.42627199G>A	5,62	0,0177	1,396	0,5840	17	rs408790217
EGS	g.42627199G>A	4,51	0,0337	-0,016	0,008	17	rs408790217



AOL	g.42628259A>G	5,21	0,0225	0,409	0,177	19	rs403953588
AOL	g.42628438T>C	6,08	0,0136	0,422	0,168	19	rs430307080
AC	g.42627199G>A	6,11	0,0135	1,304	0,5232	17	rs408790217

P100 e P240 – peso vivo aos 100 e 240 dias de idades, respectivamente; ETC – Escore de terminação de carcaça; EGS – espessura de gordura subcutânea; PT – perímetro torácico; LT – largura do tórax; PC – profundidade do corpo; AG e AC – alturas na garupa e na cernelha, respectivamente; AOL – área de olho de lombo.

Os SNPs *g.93396809G>A*, *g.93397007T>C*, *g.93397419G>A*, *g.93397718C>T*, *g.93397780T>C* e *g.93398765C>T* foram associados com ETC. Exceto para o SNP *g.93398765C>T*, o alelo não-mutante foi associado com valores médios mais elevados de ETC. As diferenças entre homozigotos variou de 0,168 (*g.93397419G>A*) a 0,246 (*g.93398765C>T*). Também encontramos associação entre o SNP *g.93395808G>A* com EGS, onde o alelo mutante foi associado com maior média de EGS e a diferença entre os genótipos *GG* e *AA* foi de 0,038 cm.

#### *Análise de marcas simples no gene CAPNI*

Sete efeitos aditivos sugestivos de polimorfismos no gene *CAPNI* sobre P100, AG, AC, PC, EGS e AOL foram encontrados (Tabela 2), mas efeitos de dominância não foram detectados ( $P > 0,05$ ). Para P100 foi encontrado efeito do SNP *g.42626364G>A*, onde o alelo não-mutante foi associado com maior valor médio e a diferença entre *GG* e *AA* foi de 2,08 kg.

O alelo mutante do SNP *g.42627199G>A* foi associado com valor médio mais elevado de AG e AC, mas também a um valor inferior de EGS. As diferenças entre *GG* e *AA* foram 2,79 cm (AG), 2,61 cm (AC) e 0,032 cm (EGS). O alelo mutante do SNP *g.42627413T>C* foi associado com maior PC e a diferença entre os genótipos *TT* e *CC* foi de 3,27 cm. Além disso, para AOL foram encontrados efeitos dos SNPs *g.42628259A>G* e *g.42628438T>C* e em ambos os casos o alelo mutante foi associado com maior valor médio de AOL. As diferenças entre os homozigotos foram de 0,818 cm<sup>2</sup> (*g.42628259A>G*) e 0,844 cm<sup>2</sup> (*g.42628438T>C*).

#### *Análise de associação por haplótipos*

Nós também testamos substituição de haplótipos e encontramos efeitos de blocos no gene *CAST* sobre AOL, GMD, PT, CC e PP (Tabela 3). Para o bloco-2, a substituição do haplótipo *GGGGA* pelo *AAAGG* foi associado com redução de PT (-

2,72 ± 1,27). Para o bloco-3, a substituição do haplótipo *CTAAT* pelo *TCAAT* foi associada com menor AOL (-0.689 ± 0.290). Para o bloco-4, a substituição de *CGCCC* por *TGCCC* foi associada com menor GMD (-23,6 ± 10,4), enquanto a substituição de *CGCCC* por *TAGTC* foi associada com menores valores de CC (-3.38 ± 1.49) e PP (-2,84 ± 1,37). Além disso, a análise de associação por haplótipos no *CAPNI* revelou efeito sobre EGS, onde a substituição do haplótipo *GG* por *AG* no bloco-1 foi associado com menor EGS (-0.0143 ± 0.0053).

**Tabela 3.** Coeficientes de regressão ( $\beta$ ) e erros-padrão (EP) na análise de associação por haplótipos em ovinos Santa Inês

Traço	Gene	Bloco	Substituição	$\beta$	EP	P-valor
EGS	<i>CAPNI</i>	1	<i>GG</i> por <i>AG</i>	-0,0143	0,0053	0,008
AOL	<i>CAST</i>	3	<i>CTAAT</i> por <i>TCAAT</i>	-0,6890	0,2900	0,018
GMD	<i>CAST</i>	4	<i>CGCCC</i> por <i>TGCCC</i>	-23,600	10,400	0,024
PT	<i>CAST</i>	2	<i>GGGGA</i> por <i>AAAGG</i>	-2,7200	1,2700	0,033
CC	<i>CAST</i>	4	<i>CGCCC</i> por <i>TAGTC</i>	-3,3800	1,4900	0,025
PP	<i>CAST</i>	4	<i>CGCCC</i> por <i>TAGTC</i>	-2,8400	1,3700	0,040

EGS – espessura de gordura subcutânea; AOL – área de olho de lombo; GMD – ganho médio diário; PT – perímetro torácico; CC – comprimento do corpo; e PP – Perímetro da perna.

### Discussão

As associações entre polimorfismos no *CAPNI* e *CAST* com variáveis de crescimento e de carcaça em ovinos Santa Inês podem ser uma consequência das ações da  $\mu$ -calpaína e calpastatina no turnover de proteínas. Kemp *et al.* (2013) sugerem que o sistema calpaínas promove o crescimento da massa muscular esquelética, enquanto Van-Ba *et al.* (2015) demonstraram que a supressão da calpastatina resultou no aumento da expressão de  $\mu$ -calpaina e de outras proteínas, afetando a proliferação celular, sobrevivência celular e apoptose. A redução da atividade das calpaínas causaria uma redução da degradação das fibras musculares e como consequência um maior acúmulo de massa muscular.

### *Gene CAST*

O gene *CAST* em ovinos têm 32 exons e produz um transcrito (ENSOART00000019281.1) com 786 aminoácidos. Este gene tem apenas uma função molecular - *calcium-dependent cysteine-type endopeptidase inhibitor activity* (Go:0010859); e participa de dois processos biológicos - *inhibition of cysteine-type endopeptidase activity* (Go: 0097340), e *negative regulation of type B pancreatic cell apoptotic process* (Go: 2000675). Muitos prévios estudos foram realizados para identificar associação entre polimorfismos no gene *CAST* e variáveis de interesse em ovinos. Contudo, o presente estudo foi o primeiro a investigar a região entre os exons 20 e 23, incluindo introns, em ovinos. Os resultados sugerem que esta região também tem informações úteis para a seleção assistida por marcadores, pois nós encontramos três SNPs associadas com P100 e um com P240, além de uma substituição de haplótipos no bloco-4 associada com GMD. Estes efeitos sobre peso vivo podem ser uma consequência das mudanças em variáveis morfométricas, uma vez que também encontramos efeitos aditivos de SNPs sobre LT e PT, além de haplótipos associados com PT, CC e PP.

Alguns prévios estudos com ovinos identificaram associação entre o polimorfismo *CAST/MspI*, um PCR-RFLP de 622 pb que inclui os exons 1C/1D e o intron-1 (Palmer *et al.*, 1998), com GMD em diferentes raças tais como Kurdi (Nassiry *et al.*, 2005), Balkhi e Kajli (Khan *et al.* 2012), Kıvırcık (Yilmaz *et al.*, 2014), Salsk (Gorlov *et al.* 2016) e Awassi (Jawasreh *et al.*, 2017). Além disso, este mesmo PCR-RFLP foi associado com peso vivo de raças locais na Indonésia (Sumantri *et al.*, 2008) e com as raças Salsk (Gorlov *et al.*, 2016) e Awassi (Jawasreh *et al.*, 2017). Outras regiões do gene *CAST* também foram associadas com variáveis de interesse em ovinos. Chung e Davis (2012) detectaram polimorfismos na intron 24 associados com GMD e peso vivo em um composto das raças Hampshire, Polypay, Rambouillet, Dorset e Suffolk. Dagong *et al.* (2016) relataram um PCR-SSCP, que engloba o intron 5 e exon 6, associado com GMD na raça Thin Tail da Indonésia. Byun *et al.* (2008) encontraram efeito de um PCR-SSCP, no exon 6, associado com o peso ao nascimento em cordeiros Romney. Portanto, diferentes raças podem ter específicos polimorfismos no gene *CAST* associados com crescimento e variáveis de carcaça.

Os polimorfismos no gene *CAST* aqui identificados em associação com variáveis de carcaça obtidas *in vivo* na raça Santa Inês confirmam a importância deste gene na composição corporal dos ovinos. Yilmaz *et al.* (2014) encontraram uma associação entre o *CAST/MspI* com EGS em cordeiros da raça Kıvrıcık. Enquanto Jawasreh *et al.* (2017) relataram associação do *CAST/MspI* com a proporção carne:osso na raça Awassi. Armstrong *et al.* (2018) identificaram o SNP rs404358363 no intron 2, associado com EGS em ovinos Texel. Além disso, Putri *et al.* (2015) relataram associação entre o *CAST/AluI* com EGS em bovinos da raça Bali, enquanto Schenkel *et al.* (2006) identificaram o *CAST/RsaI* associado com produção de gordura em bovinos mestiços (Angus, Charolais, Limousine Simental).

Todos os SNPs no gene *CAST* aqui associados com variáveis de crescimento ou da carcaça estão em intron. Estes SNPs não estão localizados em sítios de *splice* nem participam de genes que produzem miRNA. Portanto, a hipótese principal é que eles estão em desequilíbrio de ligação com a mutação causal, localizada em outra região do *CAST* ou em genes próximos. Neste contexto, o SNP rs418818682, aqui associado com P240, ETC e LT (Tabela 2), está em uma distância de 295 pb do SNP rs596673812, uma variante não-sinônima localizada no exon 24, que causa uma substituição de aminoácido (Ser/Asn) na posição 578. Devido a restrições financeiras, nós não conseguimos estudar a sequência completa do gene, mas nossos resultados indicaram que outras regiões deste gene, especialmente o exon 24, devem ser investigadas.

#### *CAPNI* gene

De acordo com ontologia genética do banco de dados ensembl, o gene *CAPNI* em ovinos tem 22 exons e produz um transcrito (ENSOART00000014657.1) com 729 aminoácidos. Este gene tem quatro funções moleculares: *calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity* (GO:0004198), *calcium ion binding* (GO:0005509), *peptidase activity* (GO:0008233), *cysteine-type peptidase activity* (GO:0008234) e *hydrolase activity* (GO:0016787), as quais podem ajudar a explicar as associações aqui encontradas. Além disso, o gene *CAPNI* está envolvido com quatro processos biológicos: *proteolysis* (GO:0006508), *mammary gland involution* (GO:0060056), *receptor catabolic process* (GO:0032801), *regulation of catalytic activity* (GO:0050790) e *self proteolysis* (GO:0097264). Nosso estudo foi o primeiro a relatar

associação entre polimorfismo no *CAPNI* e variáveis econômicas em ovinos, mas prévios estudos com outras espécies pecuárias dão suporte aos nossos resultados. Um polimorfismo no exon 9 foi associado com peso vivo em bovinos Angus e Brangus (Miquel *et Al.*, 2009), enquanto Felício *et al.* (2013) relataram um SNP no intron 5 (g.2554T>C, ss494474890) associado com peso vivo em frango. Além disso, Ropka-Molik *et al.* (2017) encontram um SNP no intron 3 (rs196951250) associado com AOL e EGS em suínos.

Os polimorfismos no *CAPNI* associados com variáveis de crescimento e carcaça em ovinos Santa Inês também estão em intron. No entanto, é possível observar no banco de dados ensembl que estas variantes além de participar do gene *CAPNI*, também estão em pelo menos mais um gene diferente. Os SNPs rs417258958, rs408790217, rs420860201, rs403953588 e rs430307080 também estão na sequência do gene ENSOARG00000022588 que produz um pequeno RNA com 77 pb (transcrito: ENSOART00000024490.1), o qual tem como consequência uma variante upstream. Além disso, os SNPs rs408790217, rs420860201, rs403953588 e rs430307080 também estão na sequência do gene ENSOARG00000013831, que produz uma proteína (transcrito: ENSOART00000015048.1) com 11 exons e 494 aminoácidos. miRNA são ainda pouco conhecidos em ovinos e apenas um miRNA (MI0025261) no cromossomo 21 foi relatado no site miRbase.org. No entanto Sheng *et al.* (2011) reportaram 12 miRNA altamente expressos no músculo esquelético dos ovinos, os quais podem ter papel importante no desenvolvimento muscular. Por exemplo, a transição G>A na 3' UTR da miostatina cria um local alvo para os miRNAs Mir-1 e Mir-206 e isso contribui para a hipertrofia muscular na raça Texel (Clop *et al.*, 2006). Portanto, nós recomendamos estudar os efeitos destes dois transcritos para tentar esclarecer os efeitos destas variantes em intron sobre as variáveis de crescimento e carcaça em ovinos Santa Inês.

### **Conclusões**

Os nossos resultados indicaram variantes em intron nos genes *CAPNI* e *CAST* associadas com variáveis de crescimento e carcaça em ovinos Santa Inês. A mutação causal não foi encontrada em ambos os genes, mas algumas hipóteses foram propostas. Para o gene *CAST* sugerimos sequenciar a região do exon 24, porque uma variante não

sinônima (rs596673812) neste exon pode ser a causa dos efeitos encontrados no presente estudo. Resultados obtidos com SNPs no *CAPNI* indicaram que outros dois genes devem ser estudados, porque eles podem ser a explicação dos efeitos encontrados aqui: ENSOARG00000022588, que produz um pequeno RNA, e o gene ENSOARG00000013831 que produz uma proteína com 11 exons.

## Referências

- ARMSTRONG E., CIAPPESONI G., IRIARTE W., DA SILVA C., MACEDO F., NAVAJAS E.A., BRITO G., SAN JULIÁN R., GIMENO D., POSTIGLIONI A. 2018. Novel genetic polymorphisms associated with carcass traits in grazing Texel sheep. *Meat Science* 145, 202-208.
- AZARI M.A., DEHNAVI E., YOUSEFI S., SHAHMOHAMADI L. 2012. Polymorphism of calpastatin, calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran. *Slovak Journal of Animal Science* 45, 1-6.
- BARRETT J., FRY B., MALLER J., DALY M. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263-265.
- BRESSAN M.C., ROSSATO L.V., RODRIGUES E.C., ALVES S.P., BESSA R.J.B., RAMOS E.M., GAMA L.T. 2011. Genotype× environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *Journal of Animal Science* 89, 221-232.
- BYUN S.O., ZHOU H., FORREST R.H.J., FRAMPTON C.M., HICKFORD J.G.H. 2008. Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning. *Animal Genetics* 39, 572-573.
- CALVO J.H., IGUÁCEL L.P., KIRINUS J.K., SERRANO M., RIPOLL G., CASASÚS I., JOY L., PÉREZ-VELASCO, SARTO P., ALBERTÍ P., BLANCO M. 2014. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat science* 96, 775-782.
- CASAS E., WHITE S.N., WHEELER T.L., SHACKELFORD S.D., KOOHMARAIE M., RILEY D.G. SMITH T.P.L. 2006. Effects of calpastatin and  $\mu$ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84, 520-525.
- CLOP A., MARCQ F., TAKEDA H., PIROTTIN D., TORDOIR X., BIBE B., BOUIX J., CAIMENT F., ELSÉN J.M., EYCHENNE F., LARZUL C., LAVILLE E., MEISH F., MILENKOVIC D., TOBIN J., CHARLIER C., GEORGES M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics* 38, 813–818.
- CHUNG H., DAVIS M. 2012. PCR-RFLP of the ovine Calpastatin gene and its association with growth. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7, 641-652.
- DAGONG M.I.A., SUMANTRI C., NOOR R.R., HERMAN R., YAMIN M. 2016. Growth Characteristic of Indonesian Thin Tail sheep (TTS) based on calpastatin (CAST) gene genotype variation. *Advances in Environmental Biology* 10, 27-31.
- DEHNAVI E., AHANI-AZARI M., HASANI S., NASSIRY M.R., MOHAJER M., KHAN-AHMADI A.R., SHAHMOHAMADI L., YOUSEFI S. 2012. Association between Yearling Weight and Calpastatin and Calpain Loci Polymorphism in Iranian Zel Sheep. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 2, 131-135.

- DEDIEU S., DOURDIN N., DARGELOS E., POUSSARD S., VESCHAMBRE P., COTTIN P., BRUSTIS J.J. 2002. Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. *Biology of the Cell* 94, 65-76.
- FELÍCIO A.M., BOSCHIERO C., BALIEIRO J.C.C., LEDUR M.C., FERRAZ J.B.S., MICHELAN-FILHO T., MOURA A.S.A.M.T., COUTINHO L.L. 2013. Identification and association of polymorphisms in CAPN1 and CAPN3 candidate genes related to performance and meat quality traits in chickens. *Genetics and Molecular Research* 12, 472-482.
- GOLL D.E., THOMPSON V.F., LI H., WEI W.E.I., CONG J. 2003. The calpain system. *Physiological Reviews* 83, 731-801.
- GORLOV I.F., SHIROKOVA N.V., RANDELIN A.V., VORONKOVA V.N., MOSOLOVA N.I., ZLOBINA E.Y., BAKOEV N.F., LEONOVA M.A. BAKOEV S.Y., KOLOSOV A.Y. GETMANTSEVA L.V., KOLOSOV A.Y. 2016. CAST/MspI gene polymorphism and its impact on growth traits of Soviet Merino and Salsk sheep breeds in the South European part of Russia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 40, 399-405.
- GROCHOWSKA E., BORYS B., GRZESKOWIAK E., MROCZKOWSKI S. 2017. Effect of the calpain small subunit 1 gene (CAPNS1) polymorphism on meat quality traits in sheep. *Small Ruminant Research* 150, 15–21.
- JAWASREH K.I., JADALLAH R., AL-AMAREEN A.H., ABDULLAH A.Y., AL-QAISI A., ALRAWASHDEH I.M., AL-ZGHOUL M.B.F., AHAMED M.K.A., OBEIDAT B. 2017. Association between MspI calpastatin gene polymorphisms, growth performance, and meat characteristics of Awassi sheep. *Indian Journal of Animal Sciences* 87, 635–639.
- KEMP C.M., OLIVER W. T., WHEELER T. L., CHISHTI A.H., KOOHMARAIE M. 2013. The effects of Capn1 gene inactivation on skeletal muscle growth, development, and atrophy, and the compensatory role of other proteolytic systems. *Journal of Animal Science* 91, 3155-3167.
- KHAN S.U.H., RIAZ M.N., GHAFFAR A., KHAN M.F.U. 2012. Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkhi and Kajli sheep and Beetal goat breeds. *Pakistan Journal of Zoology* 44, 377-382.
- LAKE S.L., LYON H., TANTISIRA K., SILVERMAN E.K., WEISS S.T., LAIRD N.M., SCHAID D.J. 2003. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Human Heredity* 55, 56-65.
- LEBART M.C., BENYAMIN Y. 2006. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *The FEBS journal* 273, 3415-3426.
- MAHROUS K.F., HASSANANE M.S., SHAFHEY H.I., MORDY M.A., RUSHDI H.E. 2016. Association between single nucleotide polymorphism in ovine Calpain gene and growth performance in three Egyptian sheep breeds. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 14, 233-240.
- MIQUEL M.C., VILLARREAL E., MEZZADRA C., MELUCCI L., SORIA L., CORVA P., SCHOR A. 2009. The association of CAPN1 316 marker genotypes with growth and meat quality traits of steers finished on pasture. *Genetics and Molecular Biology* 32, 491-496.
- ROPKA-MOLIK K., ROBERT E., TYRA M., PIÓRKOWSKA K., OCZKOWICZ M., SZYNDLER-NEDZA M., BERETA A. 2017. CAPN1 gene as a potential marker for growth performance and carcass characteristics in pigs. *Animal Production Science* 57, 1014–1021 <http://dx.doi.org/10.1071/AN14999>

- NASSIRY M.R., TAHMOORESPOUR M., JAVADMANESH A., SOLTANI M., FAR S.F. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi shee. *Iranian Journal of Biotechnology* 4, 188-192.
- OLIVEIRA M.D.S., REGITANO L.D.A., ROESE A.D., ANTHONISEN D.G., PATROCINIO E.D., PARMA M.M., SCAGLIUSI S.M.M., TIMOTEO W.H.B., BELICUAS S. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. São Carlos: EMBRAPA. 43p.
- PALMER B.R., ROBERTS N., HICKFORD J.G.H., BICKERSTAFFE R. 1998. Rapid Communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the Ovine Calpastatin Gene. *Journal of Animal Science*, 76, 1499–1500.
- PÉREZ-ENCISO M., MISZTAL I. 2011. Qxpak.5: Old mixed model solutions for new genomics problems. *BMC Bioinformatics* 12, 202.
- PUTRI R., PRIYANTO R., GUNAWAN A. (2015). Association of Calpastatin (CAST) Gene with Growth Traits and Carcass Characteristics in Bali Cattle. *Media Peternakan*, 38(3), 145-149.
- SAS. 2011. SAS/STAT User's Guide: version 9.3. SAS Institute, Cary, NC. USA.
- SCHENKEL F.S., MILLER S.P., JIANG Z., MANDELL I.B., YE X., LI H., WILTON J.W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science* 84, 291–299.
- SHENG X., SONG X., YU Y., NIU L., LI S., LI H., WEI C., LIU T., ZHANG L., DU L. 2011. Characterization of microRNAs from sheep (*Ovis aries*) using computational and experimental analyses. *Molecular Biology Reports* 38, 3161–3171
- SUMANTRI C., DIYONO R., FARAJALLAH A., INOUNU I. 2008. Polymorphism of Calpastatin gene and its effect on body weight of local sheeps. *JITV* 13, 117-126.
- VAN-BA, H., BANDUGULA VENKATA, R., AND INHO, H. 2015. Role of calpastatin in the regulation of mRNA expression of calpain, caspase, and heat shock protein systems in bovine muscle satellite cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 51, 447–454. doi: 10.1007/s11626-014-9849-8
- YILMAZ O., CEMAL I., KARACA O., ATA N. 2014. Association of Calpastatin (CAST) gene polymorphism with weaning weight and ultrasonic measurements of loin eye muscle in Kırırcık lambs. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 20, 675-680.
- ZHOU H., HICKFORD J.G.H. 2008. Allelic polymorphism of the caprine calpastatin (CAST) gene identified by PCR–SSCP. *Meat Science* 79, 403-405.



## **CAPÍTULO 2**

### **POLIMORFISMOS NOS GENES *GH*, *IGF1* E *LEP* ASSOCIADOS COM VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO E CARÇAÇA EM OVINOS SANTA INÊS**

## **Polimorfismos nos genes *GH*, *IGF1* e *LEP* associados com variáveis de crescimento e carcaça em ovinos Santa Inês**

**Resumo:** os genes do hormônio do crescimento (*GH*), do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (*IGF1*) e da Leptina (*LEP*) têm um importante papel no metabolismo energético. Assim, este estudo teve como objetivo identificar associação entre polimorfismos nos genes *GH*, *IGF1* e *LEP* com variáveis de crescimento e carcaça mensuradas *in vivo* em ovinos Santa Inês. Pesos vivo aos 100 (P100) e 240 (P240) dias de idade, ganho médio diário entre 100 a 240 dias (GMD), as alturas na cernelha (AC) e na garupa (AG), o comprimento do corpo (CC), os perímetros do tórax (PT) e da perna (PP), as larguras do tórax (LT) e da garupa (LG), a profundidade do corpo (PC), a área do olho de lombo (AOL), a espessura de gordura subcutânea (EGS) e o escore de terminação de carcaça (ETC) foram mensurados em até 192 cordeiros. Um total de 46 polimorfismos foram testados, dos quais 16 no *GH*, 11 no *IGF1* e 19 no *LEP*. O SNP *g.47486819C>A* localizado no *GH* foi associado com P100 e a diferença entre *CC* e *AA* foi 3,2 kg. O SNP *g.171110428C>T* no *IGF1* foi associado com AC, AG, LT, PP e GMD. Neste caso, as diferenças entre os genótipos *CC* e *TT* foram 1,88 cm (AC), 2,86 cm (AG), 1,15 cm (LT), 2,66 cm (PP) e 29,48 gramas/dia (GMD). Os SNPs localizados no gene *LEP* *g.92501407C>T*, *g.92502245A>G*, *g.92502283T>C*, *g.92503024G>A*, *g.92503025C>T*, *g.92503086G>A* foram associados com ETC, AG e EGS. Além disso, os SNPs *g.92502623G>C* e *g.92502947A>C* foram associados com ETC e AG. As diferenças entre os homozigotos variaram de 0,212 (*g.92502947A>C*) a 0,256 escores (*g.92503025C>T* e *g.92503086G>A*) para ETC, de 0,026 (*g.92502283T>C*) a 0,034 cm (*g.92502245A>G*) de EGS e de 1,35 (*g.92503086G>A*) a 1,57 cm (*g.92502245A>G*) de AG. A análise da associação por haplótipos também revelou sete e três associações significativas após correção Bonferroni no *IGF1* e *LEP*, respectivamente. Portanto, existem polimorfismos nos genes *GH*, *IGF1* e *LEP* com informações úteis para seleção assistida por marcadores em ovinos Santa Inês.

**Keywords:** cordeiros, seleção, polimorfismos, SNP

## **Polymorphisms in *GH*, *IGF1* and *LEP* genes associated with growth and carcass traits in Santa Ines sheep**

**Abstract:** growth hormone (*GH*), insulin-like growth factor type-1 (*IGF1*), and leptin (*LEP*) genes play a vital role in energy metabolism and therefore are candidate genes in association studies in livestock. Thus, the present study aims to identify the association between polymorphisms in the *GH*, *IGF1*, and *LEP* genes with growth and carcass traits recorded in vivo, in Santa Ines sheep. Body weight at 100 (BW100) and 240 days (BW240), average daily gain from 100 to 240 days (ADG), withers (WH) and croup (CH) heights, body length (BL), thoracic (TG) and leg girths (LG), thoracic (TW) and croup (CW) widths, body depth (BD), rib eye area (REA), fat thickness (FT), and carcass finishing score (CFS) were measured in up to 192 lambs. A total of 46 polymorphisms were analyzed, of which 16 in *GH*, 11 in *IGF1*, and 19 in *LEP*. The SNP *g.47486819C>A* was associated with BW100, and the difference between *CC* and *AA* genotypes was 3.2 kg. On the other hand, the *IGF1* SNP *g.171110428C>T* was found to be in association with WH, CH, TW, LG, and ADG. In this case, the differences between the *CC* and *TT* genotypes were 1.88 cm (WH), 2.86 cm (CH), 1.15 cm (TW), 2.66 cm (LG), and 29.48 grams (ADG). The SNPs in *LEP* gene *g.92501407C>T*, *g.92502245A>G*, *g.92502283T>C*, *g.92503024G>A*, *g.92503025C>T*, *g.92503086G>A* were associated with CFS, CW, and FT. Moreover, the SNPs *g.92502623G>C* and *g.92502947A>C* were associated with CFS and CW. The differences between homozygous ranged from 0.212 (*g.92502947A>C*) to 0.256 scores (*g.92503025C>T* and *g.92503086G>A*) for CFS, from 0.026 (*g.92502283T>C*) to 0.034 cm (*g.92502245A>G*) for FT, and from 1.35 (*g.92503086G>A*) to 1.57 cm (*g.92502245A>G*) for CW. Additionally, haplotype association analysis revealed seven and three significant association after Bonferroni correction in *IGF1* and *LEP*, respectively. Therefore, there are polymorphisms in *GH*, *IGF1*, and *LEP* genes with useful information for marker-assisted selection in Santa Ines sheep.

**Keywords:** lambs, marker-assisted selection, polymorphisms, Santa Ines, SNP

## **Introdução**

Os principais genes que afetam características de crescimento e carcaça em ovelhas são o Callipyge, o Carwell, o Double Muscling (Cockett *et al.*, 2005) e a Miostatina (Hickford *et al.*, 2010). No entanto esses polimorfismos não explicam a variação genética total dessas variáveis e alguns desses polimorfismos são específicos para algumas raças ovinas. Portanto, é necessário estudar outros genes e neste contexto, tem-se os genes *GH*, *IGF1* e *LEP*, os quais podem ser candidatos em estudos de associação com variáveis de crescimento e carcaça pois os transcritos destes genes têm funções metabólicas importantes (Tuersunjiang *et al.*, 2016), impactando desempenho em animais de produção.

Estudos prévios com diferentes raças ovinas encontraram associação de polimorfismos no gene *LEP* com características de crescimento (Hajihosseini *et al.*, 2012), morfometrias (Belo *et al.*, 2017) e carcaça (Barzehkar *et al.*, 2009). Da mesma forma, alguns polimorfismos no *GH* foram associados com crescimento (Natalia *et al.* 2017) e carcaça (Gorlov *et al.*, 2017) em ovinos. Enquanto Trukhachev *et al.* (2016) relataram associação de polimorfismos no *IGF1* com variáveis de crescimento em ovinos. Além disso, polimorfismos em genes *GH* e *IGF1* (Meira *et al.*, 2018<sup>a</sup>) e *LEP* (Meira *et al.* 2018<sup>b</sup>) foram associados a características de carcaça obtidas após abate em ovinos Santa Inês. No entanto, não foram realizados estudos anteriores com ovinos Santa Inês para avaliar a relação entre polimorfismo nestes genes e variáveis de crescimento ou de carcaça registradas *in vivo*. Assim, este estudo teve por objetivo identificar associação entre polimorfismos nos genes *GH*, *IGF1* e *LEP* e variáveis de crescimento e carcaça mensuradas *in vivo* em ovinos Santa Inês.

## **Material e métodos**

### *Animais e fenótipos*

Este estudo foi realizado com a aprovação do comitê de ética no uso de animal da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (protocolo número 02/2010). Um total de 192 cordeiros Santa Inês, com aproximadamente 240 dias de idade, foram estudados. Destes, 106 nasceram entre 2010

e 2012 no campo experimental em Pedro Arle, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Frei Paulo, Sergipe, enquanto os outros 86 nasceram em 2014 e foram criados na fazenda experimental da UFBA, em São Gonçalo dos Campos, Bahia.

As medidas morfométricas foram mensuradas nos cordeiros à desmama e aos 240 dias de idade com o auxílio de fita métrica e hipômetro. Com o animal em estação foram mensuradas a altura na cernelha (AC - distância do ponto mais alto da vértebra torácica ao solo) e na garupa (AG - distância da tuberosidade coxal ao solo); o comprimento do corpo (CC - distância da tuberosidade supraglenóide a tuberosidade isquiática); as larguras do tórax (LT - distância entre as tuberosidades supraglenóides) e da garupa (LG - distância entre as tuberosidades coxais); a profundidade do corpo (PC - distância das vértebras torácicas ao esterno); os perímetros do tórax (PT leitura do contorno da cavidade torácica, logo após as escápulas) e da perna (PP - leitura do contorno da coxa no seu ponto médio).

O escore de terminação de carcaça (ETC) foi acessado *in vivo* com valores de 1 a 5, por um único avaliador, sendo: escore 1 (carcaça muito magra), 2 (magra), 3 (média), 4 (gorda) e 5 (muito gorda). Além disso, avaliações *in vivo* da carcaça, por ultrassonografia, foi executada para obter a área do olho de lombo (AOL) e a espessura gorda subcutânea (EGS) aos 240 dias de idade. As imagens de AOL e EGS foram registradas entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, sempre do lado esquerdo dos cordeiros. O comprimento (A) e a profundidade máxima (B) do músculo foram medidos para obter a estimativa de AOL com a equação:  $AOL = \frac{A}{2} * \frac{B}{2} * \pi$ . O peso corporal foi mensurado aos 100 (P100) e 240 (P240) dias de idade, com os quais foi calculado o ganho médio diário (GMD). Um resumo estatístico descritivo das variáveis analisadas pode ser observado na Tabela 1.

#### *Extração de DNA e protocolo de PCR*

Para extração de DNA foi coletado em cada animal 5 ml de sangue em tubos vacutainer contendo EDTA. A extração de DNA foi efetuada utilizando um método de precipitação em soluções de sal e proteinase K, seguindo o protocolo Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007). O desenho dos *primers* para amplificação dos fragmentos de DNA foi elaborado usando a sequência do gene no genoma de ovinos versão 4.0 (NC\_019468.2), com os seguintes códigos de acesso: *GH* (ID: 443329), *IGF1* (ID: 443318) e *LEP* (ID: 443534).

Para o *GH*, foram utilizados os *primers* 5'-GCTGCTGACACCTTCAAAGA-3' (*forward*) e 3'-TGACCCTCAGGTACGTCTCC-5' (*reverse*), com os quais obteve-se um fragmento de 1196 pb (posições entre os nucleotídeos 47486992 e 47485797 da sequência referência), o que engloba os exons 2 a 5, incluindo introns. As condições de PCR foram: desnaturação inicial de 98 °C por 5 minutos, seguido por 20 ciclos com desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 63 °C reduzindo a 53 °C (-0,5 °C em cada ciclo por 30 segundos, e extensão a 72 °C por um minuto. Imediatamente após os primeiros ciclos, mais 20 ciclos foram seguidos com desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos, e extensão em 72 °C por 1 minuto, terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Vinte e um polimorfismos foram encontrados neste fragmento do *GH* (Tabela ANEXO Suplemento 3).

**Tabela 1.** Tamanho da amostra (N), média e desvio padrão (DP) das variáveis de crescimento e da carcaça em ovinos Santa Inês.

Variáveis	N	Média	DP
Altura na cernelha (cm)	184	66,26	5,69
Altura na garupa (cm)	184	66,93	5,64
Comprimento do corpo (cm)	184	56,27	8,94
Largura torácica (cm)	184	17,77	2,11
Largura da garupa (cm)	180	15,77	3,36
Perímetro da perna (cm)	184	40,47	8,23
Perímetro torácico (cm)	184	73,21	4,76
Profundidade do corpo (cm)	180	25,23	2,13
Peso vivo aos 100 dias (kg)	172	20,56	4,15
Peso vivo aos 240 dias (kg)	184	34,03	6,27
Ganho médio diário (g)	171	136,99	62,11
Área do olho de lombo (cm <sup>2</sup> )	97	7,17	1,64
Espessura de gordura subcutânea (cm)	99	0,20	0,40
Escore de terminação de carcaça	181	2,32	0,37

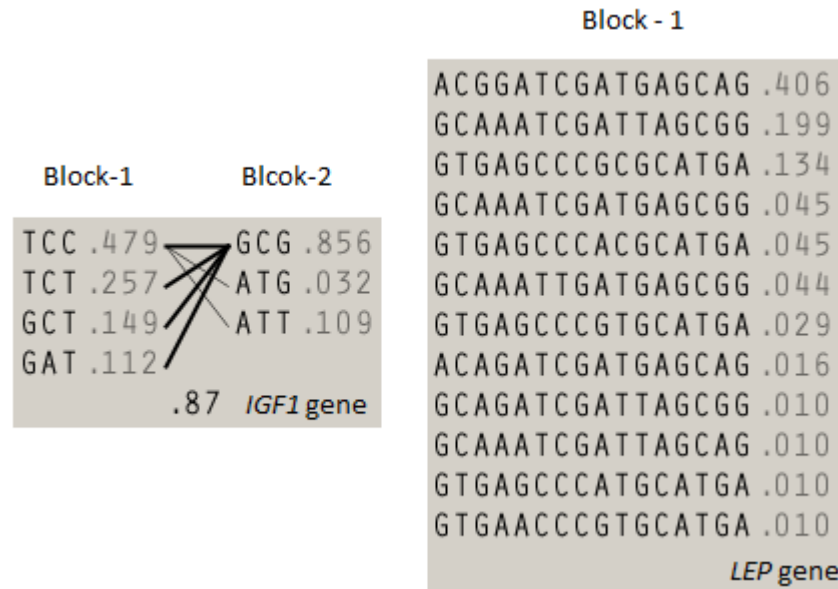
Para a amplificação do *IGFI* foram usados os primers 5'-GTGCTGCTTTTGTGATTCTTG-3' (*forward*) e 3'-GATAGAAGAGGGGGGAGGA-5' (*reverse*) foram utilizados, com os quais obtivemos um fragmento de 4645 pb (nucleotídeos entre as posições 171112938 e 171108292 da sequência referência), englobando parte dos exons 1 a 2 e a sequência completa de intron 1. As condições de PCR foram: desnaturação inicial de 98 °C por 5 minutos, seguida de 10 ciclos com desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 61 °C reduzindo a 56 °C, variando -0,5 °C em cada ciclo de 30 segundos, e extensão a

72 °C por quatro minutos. Imediatamente após os primeiros ciclos, seguiram-se mais 30 ciclos para a desnaturação em 98 °C por 10 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos, terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Dezoito polimorfismos foram encontrados neste fragmento de *IGF1* (ANEXO Suplemento 4).

A PCR do gene *LEP* foi realizada com os primers 5'-GGACCCCTGTATCGATTCCT-3' (*forward*) e 3'-CAAACCTCAGGAGAGGGTGG-5' (*reverse*), com os quais obtivemos um fragmento de 2045 pb (nucleotídeos de 92.501.195 a 92.503.239 da sequência referência), englobando parte dos exons 2 a 3 e todo o intron 2. As condições de PCR foram: desnaturação inicial de 98 °C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 segundos, anelamento a 67 °C diminuindo a 57 °C em intervalos de -0,5 °C a cada ciclo de 30 segundos, e extensão a 72 °C por três minutos. Imediatamente após os primeiros ciclos, mais 20 ciclos foram seguidos para a desnaturação em 98 °C por 10 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão em 72 °C por 3 minutos, terminando com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Vinte e um polimorfismos foram encontrados neste fragmento de *LEP* (ANEXO Suplemento 5).

#### *Haplótipos e equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE)*

O HWE foi testado através da comparação das heterozigosidades predita e observada. A heterozigosidade predita (HP) foi obtida com a equação:  $HP = 2 * (1 - MAF) * MAF$ , onde a MAF é a menor frequência alélica. O programa Haploview (Barrett *et al.*, 2005) foi usado para testar o HWE e identificar blocos haplótipos. No *IGF1* foram encontrados dois blocos de desequilíbrio de ligação (LD) (Figura 1). O bloco-1 com os SNPs *g.171108499T>G*, *g.171108609C>A* e *g.17110428C>T* e o bloco-2 com os SNPs *g.17110600G>A*, *g.17110688C>T* e *g.17110860G>T*. No *LEP* foi encontrado apenas um bloco (Figura 1) com os SNPs na seguinte ordem *g.92501356A>G*, *g.92501407C>T*, *g.92501543A>G*, *g.92501808G>A*, *g.92502245A>G*, *g.92502283T>C*, *g.92502367C>T*, *g.92502623G>C*, *g.92502642A>G*, *g.92502663T>C*, *g.92502922G>T*, *g.92502947A>C*, *g.92503024G>A*, *g.92503025C>T*, *g.92503044A>G*, *g.92503086G>A*. Nenhum bloco foi identificado no gene *GH*.



**Figura 1.** Haplótipos nos genes *IGF1* e *LEP* com frequências  $\geq 1\%$

#### *Análise de dados fenotípicos*

As variáveis fenotípicas analisadas aqui passaram por uma avaliação prévia através do modelo  $y_{ijkl} = \mu + F_i + Y_j + M_k + \alpha_{ijkl}(A) + \varepsilon_{ijkl}$ , onde  $y_{ijkl}$  é o valor da característica sob estudo,  $\mu$  é a média geral,  $F_i$  é o efeito de fazenda (dois níveis),  $Y_j$  é o efeito do ano de nascimento (quatro níveis),  $M_k$  é efeito de mês de nascimento (12 níveis),  $\alpha_{ijkl}(A)$  é o efeito da covariável idade do animal no momento da avaliação e  $\varepsilon_{ij}$  é o resíduo. O PROC MIXED do *statistical analyses system* (SAS, 2011) foi usado nesta análise, e o objetivo da mesma foi identificar possíveis erros de registro, bem como verificar os pressupostos da análise de variância.

#### *Análise de associação por marcas simples*

Uma análise de associação por marcas individuais foi conduzida com a Qxpack 5 (Pérez-Enciso e Mizstal, 2011), com a qual se executa um teste de razão de verossimilhanças. O modelo geral pode ser descrito como,  $y = \beta X + \sum_{k=1}^n Z\delta_k + \varepsilon$ , onde  $y$  é o vetor que contém os registros das variáveis,  $\beta$  é o vetor de soluções para os efeitos fixos,  $\delta_k$  é o vetor de soluções para os efeitos genéticos para qualquer um dos  $n$  QTLs que afetam a variáveis,  $X$  e  $Z$  são as matrizes de incidência que associam observações em  $y$  aos vetores de soluções em  $\beta$  e  $\delta_k$  respectivamente, e  $\varepsilon$  é o vetor dos resíduos. Os efeitos fixos incluídos no modelo foram os mesmos descritos



anteriormente. Os efeitos aditivo e de dominância dos QTLs foram testados. Um efeito aditivo positivo indica que o alelo mutante está associado a valores médios mais elevados. Um efeito dominante positivo indica que o genótipo heterozigoto tem o valor médio mais próximo do homozigoto mutante.

#### *Análise de associação por haplótipos*

A análise da associação por haplótipos foi realizada com a sub-rotina haplo.glm do pacote haplo.stat versão 1.7.7 (<https://Cran.r-Project.org/web/Packages/haplo.stats/index.html>), conforme descrito em Lake *et al.* (2003). Apenas haplótipos com frequência  $\geq 4\%$  foram utilizados nesta análise.

#### *Nível de significância*

Um total de 45 SNPs (18 no *LEP*, 11 no *IGF1* e 16 no *GH*) apresentaram HWE (p-valor  $> 0,05$ ) e MAF  $\geq 1\%$ , os quais foram utilizados na análise associação por marcas simples. Assim, foi estabelecido um nível de significância nominal de 0,0005 para uma correção Bonferroni a 5%. A análise de associação por haplótipos revelou dois blocos no *IGF1* e um no *LEP*, consequentemente o nível de significância nominal foi 0,0074 para uma correção de Bonferroni a 5%. Efeitos significativos a 5%, não corrigidos para Bonferroni, são também apresentados, mas considerados como sugestivos.

## **Resultados**

#### *Análise de marcas simples*

A análise de marcas simples revelou efeitos aditivos sugestivos ( $P < 0,05$ ) para algumas variáveis (Tabela 2), mas efeito de dominância não foi detectado ( $P > 0,05$ ). O alelo mutante do SNP *g.47486819C>A*, localizado no intron 2 do *GH*, foi associado com valores médios mais elevados de P100 e a diferença entre os genótipos *CC* e *AA* foi 3,2 kg. No *IGF1* o SNP *g.171110428C>T*, localizado no intron 1, foi associado com AC, AG, LT, PP e GMD. Neste caso, o alelo referência foi associado com maior valor médio das características e as diferenças entre os genótipos *CC* e *TT* foram: 1,88 cm (AC), 2,86 cm (AG), 1,15 cm (LT), 2,66 cm (PP) e 29,48 gramas/dia (GMD).

**Tabela 2.** Efeito aditivo (a) e erro-padrão (EP) de polimorfismos nos genes *GH*, *IGFI*, e *LEP* associados com atributos de crescimento, carcaça e morfometria em ovinos Santa Inês

Características	SNP	NCBI Registro	Intron	A	EP	LRT	P-valor
<b><i>GH</i></b>							
P100	g.47486819C>A	rs589527314	2-3	1,600	0,7076	5,02	0,0251
<b><i>IGFI</i></b>							
AC	g.171110428C>T	rs412470350	1-2	-0,941	0,4481	4,35	0,0370
AG	g.171110428C>T	rs412470350	1-2	-1,429	0,4970	8,06	0,0045
LT	g.171110428C>T	rs412470350	1-2	-0,576	0,2088	7,45	0,0064
PP	g.171110428C>T	rs412470350	1-2	-1,330	0,6091	4,70	0,0302
GMD	g.171110428C>T	rs412470350	1-2	-14,739	5,1931	7,79	0,0053
<b><i>LEP</i></b>							
P100	g.92501543A>G	rs421064645	2-3	1,186	0,5561	4,47	0,0344
ETC	g.92501407C>T	rs398357543	2-3	0,117	0,0425	7,37	0,0066
ETC	g.92502245A>G	rs422219521	2-3	0,122	0,0435	7,60	0,0058
ETC	g.92502283T>C	rs400734857	2-3	0,116	0,0425	7,19	0,0073
ETC	g.92502623G>C	rs406003615	2-3	0,109	0,0424	6,42	0,0113
ETC	g.92502947A>C	rs418548121	2-3	0,106	0,0421	6,14	0,0132
ETC	g.92503024G>A	rs1135847360	2-3	0,124	0,0432	7,92	0,0049
ETC	g.92503025C>T	rs596008192	2-3	0,128	0,0429	8,65	0,0033
ETC	g.92503086G>A	rs404287904	2-3	0,128	0,0429	8,65	0,0033
LG	g.92501407C>T	rs398357543	2-3	0,706	0,2726	6,58	0,0103
LG	g.92502245A>G	rs422219521	2-3	0,787	0,2815	7,64	0,0057
LG	g.92502283T>C	rs400734857	2-3	0,714	0,2752	6,62	0,0101
LG	g.92502623G>C	rs406003615	2-3	0,725	0,2749	6,82	0,0090
LG	g.92502947A>C	rs418548121	2-3	0,685	0,2740	6,14	0,0132
LG	g.92503024G>A	rs1135847360	2-3	0,744	0,2785	7,00	0,0082
LG	g.92503025C>T	rs596008192	2-3	0,737	0,2774	6,93	0,0085
LG	g.92503086G>A	rs404287904	2-3	0,677	0,2746	5,98	0,0145
EGS	g.92501407C>T	rs398357543	2-3	0,015	0,006	5,93	0,0149
EGS	g.92502245A>G	rs422219521	2-3	0,017	0,006	7,59	0,0059
EGS	g.92502283T>C	rs400734857	2-3	0,013	0,006	4,72	0,0298
EGS	g.92503024G>A	rs1135847360	2-3	0,016	0,006	6,61	0,0101
EGS	g.92503025C>T	rs596008192	2-3	0,016	0,006	6,87	0,0088
EGS	g.92503086G>A	rs404287904	2-3	0,016	0,006	6,87	0,0088

Para o gene *LEP* os SNPs *g.92501407C>T*, *g.92502245A>G*, *g.92502283T>C*, *g.92503024G>A*, *g.92503025C>T* e *g.92503086G>A*, localizados no intron 2, foram associados com ETC, LG e EGS. Além disso, os SNPs *g.92502623G>C* e *g.92502947A>C*, localizados no intron 2, foram associados com ETC e LG, mas não com EGS. Em todos os casos, o alelo mutante foi associado com maior valor médio dessas características. Para ETC a diferença entre homozigotos variou de 0,212 (*g.92502947A>C*) a 0,256 escores (*g.92503025C>T* e *g.92503086G>A*). No caso de EGS a diferença entre homozigotos variou de 0,026 (*g.92502283T>C*) a 0,034 cm

(g.92502245A>G), enquanto para LG os valores ficaram entre 1,35 (g.92503086G>A) e 1,57 cm (g.92502245A>G).

#### Análise de associação com haplótipos

A análise de associação por haplótipos revelou doze associações no gene *IGF1* e sete no *LEP* (Tabela 3). Sete associações no *IGF1* e três no *LEP* foram significativas após correção Bonferroni. A substituição do haplotipo *TCC* pelo *TCT* no bloco 1 do *IGF1* foi significativamente ( $P < 0,0075$ ) associada as variáveis GMD, AG, AC, CC, PT, LT e PP, onde os coeficientes de regressão ( $\beta$ ) e erros-padrão foram  $20,5079 \pm 7,3741$ ,  $4,0859 \pm 1,2121$ ,  $3,5227 \pm 1,2002$ ,  $3,9393 \pm 1,1920$ ,  $3,8814 \pm 1,3036$ ,  $1,1302 \pm 0,3577$ , e  $3,3994 \pm 1,0808$ , respectivamente. A substituição de *TCC* por *GCT* no Bloco-1 do *IGF1* foi sugestivamente ( $P < 0,05$ ) associada com AG ( $3,1585 \pm 1,5026$ ), AC ( $2,9829 \pm 1,4880$ ) e LT ( $1,1406 \pm 0,4437$ ). A substituição de *TCC* por *GAT* no bloco-1 do *IGF1* foi sugestivamente ( $P < 0,05$ ) associada com AG ( $5,1563 \pm 1,9695$ ) e AC ( $4,0960 \pm 1,9502$ ).

**Tabela 3.** Coeficientes de regressão ( $\beta$ ) e erros-padrão (EP) encontrados nos testes de associação com haplótipos nos genes *IGF1* e *LEP* em ovinos Santa Inês

Característica	Substituição	$\beta$	EP	P-valor
<i>IGF1</i>				
AG	<i>TCC&gt;GAT</i>	5,1563	1,9695	0,010
AC	<i>TCC&gt;GAT</i>	4,0960	1,9502	0,037
AG	<i>TCC&gt;GCT</i>	3,1585	1,5026	0,037
AC	<i>TCC&gt;GCT</i>	2,9829	1,4880	0,047
LT	<i>TCC&gt;GCT</i>	1,1406	0,4437	0,011
GMD	<i>TCC&gt;TCT</i>	20,5079	7,3741	0,006*
AG	<i>TCC&gt;TCT</i>	4,0859	1,2121	0,001*
AC	<i>TCC&gt;TCT</i>	3,5227	1,2002	0,004*
CC	<i>TCC&gt;TCT</i>	3,9393	1,1920	0,001*
PT	<i>TCC&gt;TCT</i>	3,8814	1,3036	0,003*
LT	<i>TCC&gt;TCT</i>	1,1302	0,3577	0,002*
PP	<i>TCC&gt;TCT</i>	3,3994	1,0808	0,002*
<i>LEP</i>				
PT	H1>GCAAATCGATGAGCGG	-5,2915	1,9733	0,008
P240	H1>GCAAATCGATTAGCGG	-2,0353	0,9165	0,028
AOL	H1>GCAAATCGATTAGCGG	0,2049	-2,4400	0,016
P100	H1>GCAAATTGATGAGCGG	1,8270	0,5143	<0,0001*
PC	H1>GCAAATTGATGAGCGG	-2,5103	0,5621	<0,0001*
CC	H1>GCAAATTGATGAGCGG	2,4830	0,9563	0,01
ETC	H1>GTGAGCCC GCGCATGA	-0,2441	0,0611	<0,0001*

H1 = *ACGGATCGATGAGCAG*

No gene *LEP* a substituição de *ACGGATCGATGAGCAG* por *GCAAATCGATTAGCGG* foi associada com menores valores médios de P240 ( $-2,0353 \pm 0,9165$ ) e AOL ( $-2,4400 \pm 0,2049$ ). As substituições de *ACGGATCGATGAGCAG* por *GTGAGCCCGCGCATGA* e por *GCAAATCGATGAGCGG* foram associadas com menores valores médios de ETC ( $-0,2441 \pm 0,0611$ ) e PT ( $-5,2915 \pm 1,9733$ ), respectivamente. Enquanto a substituição de *ACGGATCGATGAGCAG* por *GCAAATTGATGAGCGG* foi associada com valores médios mais elevados de P100 ( $1,8270 \pm 0,5143$ ) e CC ( $2,4830 \pm 0,9563$ ), porém também foi associada com valores inferiores de PC ( $-2,5103 \pm 0,5621$ ).

## Discussão

### *IGF1* gene

A função molecular e os processos biológicos associados com o gene *IGF1* dão suportes aos resultados aqui encontrados. Yadav *et al.* (2002) demonstraram que níveis circulantes de IGF-1 regulam diretamente o crescimento e a densidade óssea em camundongos, enquanto o Sun *et al.* (2014) encontraram associação entre a expressão do *IGF1* e peso vivo em ovinos da raça Hu. Além disso, a ontologia genética do *IGF1* indica importantes funções moleculares associadas com o crescimento animal como a proliferação celular (GO:0008283), o crescimento de células em indivíduos multicelulares (GO: 0040014); manutenção de células de satélite musculares esqueléticas envolvidas na sua regeneração (GO: 0014834); e papel essencial na hipertrofia muscular (GO: 0014896). Nossos resultados também são suportados por estudos anteriores com outras raças de ovinos. Trukhachev *et al.* (2016) encontraram associação de um polimorfismo no intron-1 (rs430457475) com AC e AG em ovinos da raça Merino na Rússia.

Segundo levantamento efetuado no banco de dados Ensembl, o SNP rs412470350 não está em sítio de splice nem é um componente de outros transcritos. Portanto, este SNP pode estar em desequilíbrio de ligação com a mutação causal localizada em outra região de *IGF1* ou em genes próximos. Raji *et al.* (2017)

identificaram associação entre um PCR-RFLP na região regulatória do *IGF1* com CC, LT e peso vivo em ovinos da raça Balami, além da associação com AC em ovinos Yankasa. Um PCR-SSCP no exon-1 foi associado com GMD e CC em ovinos Makui (Hajihosseini *et al.*, 2013) e GMD em ovinos Baluchi (Tahmoorespur *et al.*, 2009) e Makoei (Negahdary *et al.*, 2013). No entanto, segundo o banco de dados Ensembl não há mutações no exon 1 do *IGF1* em ovinos, enquanto no exon 2 tem apenas um variante (rs596120787), mas não foi polimórfica na amostra de ovinos Santa Inês avaliada aqui. Outra hipótese é de efeito de um miRNA, os quais ainda são pouco conhecidos em ovinos. Logo, futuros estudos podem identificar fragmentos de intron 2 associados a miRNA, o que pode ajudar a explicar os efeitos relatados aqui.

### *Gene LEP*

Os resultados de associação com o gene *LEP* podem ser consequências de funções moleculares como: atividade hormonal (GO: 0005179), que regula processos metabólicos importantes; e atividade de fatores de crescimento (GO: 0008083) que estimula as células a crescer ou proliferar. Além disso, o gene *LEP* é componente de vários processos biológicos, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo de gordura, como metabolismo de lipídeos (GO: 0006629) e beta-oxidação de ácidos graxos (GO: 0006635), o que explicaria as associações com EGS e ETC. A leptina desempenha uma importante função em processos biológicos que estão relacionados com a regulação negativa do apetite (GO: 0032099), absorção intestinal (Go: 0050892) e crescimento ósseo (Go: 0098868), os quais podem explicar os efeitos sobre variáveis de crescimento e morfométricas encontrados aqui em Santa Inês.

Nossos resultados com gene *LEP* confirmam prévios estudos com outras raças de ovinos. No intron 2 foram relatadas associações com AOL na raça Suffolk (Boucher *et al.*, 2006) e com peso de carcaça fria, gordura na inserção da cauda, e gordura corporal total em ovinos das raças Shal e Zel (Barzehkar *et al.*, 2009). Além disso, Meira *et al.* (2018<sup>b</sup>) encontraram associação entre os SNPs (*g.92501372G>A*, *g.92501407C>T*, *g.92501543A>G* e *g.92503024G>A*) localizados no intron 2 com várias características de carcaça mensuradas pós-abate, como os pesos e rendimentos das carcaças quente e fria, comprimento interno da carcaça, rendimentos de pernil e pescoço, peso de epescoço, e ETC. Polimorfismos em outras regiões do gene *LEP*,

especialmente mutações no exon 3, também foram associadas com características de interesse econômico. Um PCR-SSCP no exon 3 foi associado com valores genéticos estimados para TG e comprimento da garupa nos ovinos Makooei (Sadeghi *et al.*, 2014), peso corporal e GMD nos ovinos Makooei (Hajihosseini *et al.*, 2012), peso corporal aos 90 dias em ovinos Baluchi (Tahmoorespur *et al.*, 2010) e peso corporal nos ovinos Kermani com 3, 6, 9 e 12 meses de idade (Shojaei *et al.*, 2010). Alguns SNPs no exon 3 foram associados com CC em ovinos Sanjabu (Bakhtiar *et al.*, 2017), conversão alimentar, consumo alimentar residual e consumo alimentar em ovinos mestiços Awassi-Merino (Jonas *et al.*, 2016) e peso de carcaça fria em ovinos Santa Inês (Quirino *et al.*, 2016).

Os SNPs aqui associados com variáveis de crescimento e carcaça em Santa Inês não estão localizados em regiões que produzam miRNA ou em sítios de splice, mas alguns destes SNPs estão localizados próximo de variantes não sinônimas localizadas nos exons 2 e 3. O banco de dados Ensembl indica três mutações não-sinônimas no exon 2 (rs414488761, rs1086818376 e rs593507294), mas as variantes rs1086818376 e rs593507294 não foram polimórficas em ovinos Santa Inês, enquanto o SNP rs414488761 está fora o fragmento amplificado aqui (nós sequenciamos 135 pb do exon 2, o que corresponde a 78,5%). Portanto, o rs414488761 deve ser estudado, pois pode ser a mutação causal associada com as variáveis de crescimento e carcaça nos ovinos Santa Inês.

O fragmento de 72 pb do exon 3 aqui sequenciado contém, segundo banco de dados Ensembl, uma variante (rs1085831959) que é ao mesmo tempo um sítio de splice e uma mutação sinônima, além de duas variantes não-sinônimas (rs592349134 e rs426762318). Porém, nenhuma destas variantes foram polimórficas na amostra de ovinos Santa Inês aqui estudada. No entanto, existem outras cinco variações não sinônimas no exon-3 (rs429690456, rs409584889, rs1093355763, rs420693815E rs428185456), as quais estão fora da sequência estudada aqui. Essas variantes causam substituições de aminoácidos Asn/Thr, Arg/Gln, Pro/Gln, Val/Leu e Arg/Gln, nas posições 136, 142, 157, 181 e 196, respectivamente. Portanto, estes SNPs são potenciais mutações causadoras dos efeitos encontrados no presente estudo.

*Gene GH*

No presente estudo foi identificado um SNP localizado no intron-2 do *GH* associado com P100, o que corrobora prévios estudos com ovinos de outras Raças. Han *et al.* (2016) relataram polimorfismo no intron-2 associado a peso vivo em ovinos da raça Black Tibetan, enquanto Natalia *et al.* (2017) relataram um SNP no intron-2 associado com pesos ao nascimento e 120 dias de idade em ovinos da raça Harri, além de GMD entre essas idades. Outras regiões do *GH* também foram associadas com o peso corporal em ovinos. Cauveri *et al.* (2016) encontraram um SNP no intron 1 associado com peso ao desmame e GMD em ovinos da raça Nilagiri. No exon 4 foram relatados um PCR-SSCP associado com peso vivo em ovinos Makoei (Moradian *et al.*, 2013) e um SNP associado com peso vivo nas raças Tibetan e Poll Dorset (Jia *et al.*, 2014). Um PCR-SSCP no exon 5 foi associado com peso corporal em ovinos Baluchi aos seis meses de idade (Tahmoorespur *et al.*, 2011), enquanto um PCR-RFLP foi associado com peso vivo e GMD nas raças Donggala e East Java (Malewa *et al.*, 2014) e em ovelhas da província de Jambi (Despison *et al.*, 2017). Nossos resultados são suportados também por processos biológico envolvidos com a atividade do hormônio do crescimento, como a secreção de insulina (GO:0030073) e regulação positiva do crescimento de organismos multicelulares (GO: 0040018).

Segundo o banco de dados Ensemble, o SNP rs589527314 no *GH*, aqui associado com P100, está localizado perto da mutações não-sinônima do exons 2 (rs1093018839 e rs397514062) e 3 (rs1093457796), mas estas mutações não foram polimórficas na amostra de ovinos Santa Inês estudadas aqui. Nós encontramos três mutações não-sinônimas (ANEXO Suplemento 3), as quais estão nos exons 3 (rs397514070), 4 (rs397514102) e 5 (rs1135847308). Porém, elas não foram associadas ( $P > 0,05$ ) com qualquer variável no presente estudo, provavelmente devido à alta frequência do genótipo homozigoto para o alelo referência (97,9%, 89,6%, e 88,0%, respectivamente). Além disso, a análise haplótipo não encontrou nenhum bloco no *GH*, o que impediu o estudo de associação por haplótipos. Portanto, o nosso resultado com *GH* deve ser interpretado com cautela e um estudo com outra amostra de Santa Inês para validar esse resultado é necessário.

## Conclusões

O presente estudo encontrou evidências de polimorfismos nos genes *IGF1*, *LEP* e *GH* associados com variáveis de crescimento e de carcaça avaliadas *in vivo* em ovinos Santa Inês, as podem ser fonte de informação para a seleção assistida por marcador.

## Referências

- Abdelmoneim T.S., Brooks P.H., Afifi M., Swelum A.A.A. 2017. Sequencing of growth hormone gene for detection of polymorphisms and their relationship with body weight in Harri sheep. *Indian Journal of Animal Research* 51, 205-211.
- Bakhtiar R., Abdolmohammadi A., Hajarian H., Nikousefat Z., Kalantar-Neyestanaki D. 2017. Identification of 332G>A polymorphism in exon 3 of the leptin gene and partially effects on body size and tail dimension in Sanjabi sheep. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences* 11 506-509.
- Barrett J., Fry B., Maller J., Daly M. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, Harvard 21, 263-265.
- Barzehkar R., Salehi A., Mahjoubi F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Biotechnology* 7, 241-246.
- Boucher D., Palin M.F., Castongua F., Gariépy C., Pothier F. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: association of single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science* 86, 31-35.
- Cauveri D, Sivaselvam S.N., Karthickeyan S.M.K., Tirumurugaan K.G., Kumanan K., Venkataramanan R. 2016. Single nucleotide polymorphisms in *GH* (growth hormone) gene associated with growth traits in Nilagiri sheep of Tamil Nadu. *International Journal of Science, Environment and Technology* 5, 4097-4103.
- Cockett N.E., Smit M.A., Bidwell C.A., Segers K., Hadfield, T.L., Snowden G.D., Georges M., Charlier C. 2005. The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. *Genetics Selection Evolution* 37, S65-S81.
- Depison, Anwar S., Jamsari, Arnim, Yurnalis 2017. Association of growth hormone gene polymorphism with quantitative characteristics of thin-tailed sheep using PCR-RFLP in Jambi province. *African Journal of Biotechnology* 16, 1159-1167.
- Gorlov I.F., Kolosov Y.A., Shirokova N.V., Getmantseva L.V., Slozhenkina M.I., Mosolova N.I., Bakoev N.F., Leonova M.A., Kolosov A.Y., Zlobina E.Y. 2017. Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in Salsk sheep breed. *Small Ruminant Research* 150, 11-14.
- Hajihosseini A., Hashemi A., Razavi-Sheshdeh S.A., Pirany N. 2013. Association of the polymorphism in the 5' flanking region of the ovine IGF-I gene with growth and development traits in Makui sheep of Iran. *European Journal of Zoological Research*, 2, 19-24.
- Hajihosseini A., Hashemi A., Sadeghi S. 2012. Association between polymorphism in exon 3 of leptin gene and growth traits in the Makoei sheep of Iran. *Livestock Research for Rural Development* 24, 543-546.



- Han Y.C., Sun Y.G., Li Q. 2016. Growth hormone polymorphisms and growth traits in Chinese Tibetan sheep *Ovis aries*. *Genetics and Molecular Research* 15, 15038397.
- Hickford J.G.H., Forrest R.H., Zhou H., Fang Q., Han J., Frampton C.M., Horrell A.L. 2010. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. *Animal Genetics* 41, 64-72.
- Jia J.L., Zhang L.P., Wu J.P., Ha Z.J., Li W.W. 2014. Study of the correlation between *GH* gene polymorphism and growth traits in sheep. *Genetics and Molecular Research* 13, 7190-7200.
- Jonas E., Martin G.B., Celi P., LI L., Soattin M., Thomson P.C., Raadsma H.W. 2016. Association of polymorphisms in leptin and leptin receptor genes with circulating leptin concentrations, production and efficiency traits in sheep. *Small Ruminant Research* 136, 78–86.
- Lake S.L., Lyon H., Tantisira K., Silverman E.K., Weiss S.T., Laird N.M., Schaid D.J. 2003. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Human Heredity* 55, 56-65.
- Malewa A.D., Hakim L., Maylinda S., Husain M.H. 2014. Growth hormone gene polymorphisms of Indonesia fat tailed sheep using PCRFLP and their relationship with growth traits. *Livestock Research for Rural Development* 26 (6).
- Meira A.N., Montenegro H., Coutinho L.L., Mourão G.B., Azevedo H.C., Muniz E.N., Machado A.L., Sousa-JR L.P., Pedrosa V.B., Pinto L.F.B. 2018a. Single nucleotide polymorphisms in the GH and IGF1 genes associated with carcass traits in Santa Ines sheep. *Animal* Published online: 06 July 2018 <https://doi.org/10.1017/S1751731118001362>
- Meira A.N., Moreira G.C.M., Coutinho L.L., Mourão G.B., Azevedo H.C., Muniz E.N., Machado A.L., Sousa-JR L.P., Pedrosa V.B., Pinto L.F.B. 2018b. Carcass and commercial cut yield of Santa Ines sheep affected by polymorphisms of the LEP gene. *Small Ruminant Research* 166, 121-128.
- Moradian C., Mohamadi N., Razavi-Sheshdeh S.A., Hajihosseini A., Ashrafi F. 2013 Effects of genetic polymorphism at the growth hormone gene on growth traits in Makoei sheep. *European Journal of Experimental Biology* 3, 101-105.
- Negahdary M., Hajihosseini A., Ajdary M. 2013. PCR-SSCP variation of IGF1 and PIT1 genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Makoei sheep. *Genetics Research International* 2013, ID 272346.
- Oliveira M.D.S., Regitano L.D.A., Roese A.D., Anthonisen D.G., Patrocínio E.D., Parma M.M., Scagliusi S.M.M., Timoteo W.H.B., Belicuas S. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. São Carlos: EMBRAPA. 43p.
- Pérez-Enciso M., Miszta I. 2011. Qxpack.5: Old mixed model solutions for new genomics problems. *BMC Bioinformatics* 12, 202.
- Quirino C.R., Costa R.L.D., Pacheco A., Madella-Oliveira A.F., Beltrame R.T., Azevedo A.S., Bartholazzi-Junior A., Veja W.H.O. 2016. Identification of polymorphisms in the myostatin and leptin genes of Santa Inês breed and crossbreed sheep and association with carcass traits. *Bioscience Journal* 32, 699-704.
- Raji A.O., Mohammed A., Igwebuike J.U., Alphonsus C. 2017. Association of IGF 1 gene polymorphisms with some morphometric traits of Nigerian indigenous sheep breeds. *Nigerian Journal of Biotechnology* 34, 97-104.

- Sadeghi S., Hajihosseini A., Bohlouli M. 2014. Haplotype association of ovine leptin gene on breeding value of body measurements in Makooei sheep breed. *Biotechnology in Animal Husbandry* 30, 233-242.
- SAS. SAS/STAT User's Guide: version 9.1. SAS Institute, Cary, NC. USA, 2004.
- Shojaei M., Abadi M.M., Fozzi M.A., Dayani O., Khezri A., Akhondi M. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2, 67-73.
- Sun W., Su R., Li D., Musa H.H., Kong Y., Ding J.T., Ma Y.H., Chen L., Zhang Y.F., Wu W.Z. 2014. Developmental changes in IGF-I and MyoG gene expression and their association with meat traits in sheep. *Genetics and Molecular Research* 13, 2772-2783.
- Tahmoorespur M., Taheri A., Gholami H., Ansary M. 2011. PCR-SSCP Variation of GH and STAT5A genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep. *Animal Biotechnology* 22, 37-43.
- Tahmoorespur M., Valeh M.V., Nassiry M.R., Moussavi A.H., Ansary M. 2009. Association of the polymorphism in the 5' flanking region of the ovine IGF-I gene with growth traits in the Baluchi sheep. *South African Journal of Animal Science* 39, 97-101.
- Tahmoorespur M., Taheri A., Valeh M.V., Saghi D.A., Ansary M. 2010. Assessment relationship between Leptin and Ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding values EBVs of growth traits in Baluchi sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 2460-2465.
- Trukhachev V., Skripkin V., Kvochko A., Kulichenko A., Kovalev D., Pisarenko S., Volynkina A., Selionova M., Aybazov M., Shumaenko S., Omarov A., Mamontova T., Yatsyk O., Krivoruchko A. 2016. Polymorphisms of the IGF1 gene in russian sheep breeds and their influence on some meat production parameters. *Slovenian Veterinary Research* 53, 2.
- Tuersunjiang N., Odhiambo J.F., Shasa D.R., Smith A.M., Nathaniels P.W., Ford S.P. 2016. Maternal obesity programs reduced leptin signaling in the pituitary and altered GH/IGF1 axis function leading to increased adiposity in adult sheep offspring. *Plos One* 12, e0181795.
- Yakar S., Rosen C.J., Beamer W.G., Ackert-Bicknell C.L., Wu Y., Liu J.L., Ooi G.T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y.R., Leroith D. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *Journal of Clinical Investigation* 110, 771-781.

**Suplemento 1.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *CAST* de ovinos Santa Inês.

Registro no NCBI	Posição	Região	HO	HP	P-valor	MAF
rs1135847306	g.93395190A>T	Exon-20	0,262	0,401	5,71E-06	0,277
rs420079299	g.93395218A>G	Exon-20	0,251	0,387	5,72E-06	0,262
rs427272171	g.93395243T>G	Exon-20	0,225	0,303	1,60E-03	0,186
rs399829938	g.93395307T>C	Exon-20	0,241	0,396	2,97E-07	0,272
rs411117077	g.93395316A>G	Exon-20	0,288	0,303	6,21E-01	0,186
rs400979323	g.93395469G>C	Exon-20	0,262	0,286	3,39E-01	0,173
rs412318647	g.93395478G>A	Exon-20	0,251	0,396	1,81E-06	0,272
rs423614650	g.93395517C>T	Exon-20	0,099	0,104	8,82E-01	0,055
rs413442067	g.93395643G>A	Exon-20	0,215	0,216	1,00E+00	0,123
rs424912630	g.93395788G>A	Intron-20	0,136	0,154	2,56E-01	0,084
rs403339381	g.93395808G>A	Intron-20	0,115	0,136	1,29E-01	0,073
rs414639908	g.93395835G>A	Intron-20	0,476	0,484	9,13E-01	0,411
rs425997700	g.93395843A>G	Intron-20	0,246	0,239	9,88E-01	0,139
rs415836747	g.93396010G>A	Intron-20	0,168	0,179	5,50E-01	0,099
rs1135847307	g.93396080G>A	Intron-20	0,042	0,472	5,81E-42	0,382
rs426993921	g.93396113G>A	Intron-20	0,000	0,118	9,63E-20	0,063
rs409851241	g.93396125G>A	Intron-20	0,377	0,500	9,00E-04	0,497
rs605481564	g.93396140A>G	Intron-20	0,482	0,481	1,00E+00	0,403
rs417020700	g.93396154T>C	Intron-20	0,497	0,473	6,12E-01	0,385
rs428230968	g.93396162C>T	Intron-20	0,497	0,492	1,00E+00	0,437
rs406915912	g.93396180T>C	Intron-20	0,497	0,486	8,90E-01	0,416
rs422402447	g.93396211C>T	Intron-20	0,455	0,480	5,49E-01	0,401
rs160120782	g.93396257C>T	Intron-20	0,382	0,500	1,60E-03	0,484
rs408105678	g.93396404A>G	Intron-20	0,524	0,452	4,49E-02	0,346
rs419473804	g.93396422A>G	Intron-20	0,450	0,419	4,07E-01	0,298
rs413404444	g.93396553A>C	Intron-20	0,304	0,360	4,91E-02	0,236
rs399204438	g.93396619A>G	Intron-20	0,539	0,500	3,64E-01	0,495
rs425885251	g.93396736T>C	Intron-20	0,545	0,500	2,93E-01	0,497
rs423099226	g.93396809G>A	Intron-20	0,497	0,444	1,39E-01	0,332
rs405663608	g.93396815G>A	Intron-20	0,215	0,208	1,00E+00	0,118
rs428213368	g.93397007T>C	Intron-20	0,429	0,410	6,69E-01	0,288
rs406867092	g.93397044A>G	Intron-20	0,393	0,346	9,45E-02	0,223
rs418210778	g.93397082T>C	Intron-20	0,487	0,498	8,42E-01	0,469
rs429530795	g.93397094T>C	Intron-20	0,539	0,454	1,46E-02	0,348
rs408051866	g.93397157C>A	Intron-20	0,094	0,109	2,31E-01	0,058
rs160120795	g.93397179A>G	Intron-20	0,398	0,500	6,40E-03	0,497
rs409258492	g.93397195G>C	Intron-20	0,403	0,500	1,01E-02	0,490
rs160120800	g.93397267G>T	Intron-20	0,178	0,179	1,00E+00	0,099
rs399091954	g.93397299A>G	Intron-20	0,152	0,166	3,88E-01	0,092
rs160120803	g.93397418C>T	Intron-20	0,168	0,179	5,50E-01	0,099
rs400315475	g.93397419G>A	Intron-20	0,503	0,442	8,71E-02	0,330
rs411571641	g.93397428T>C	Intron-20	0,555	0,500	1,80E-01	0,497
rs422744326	g.93397448G>A	Intron-20	0,225	0,231	8,77E-01	0,134
rs418161864	g.93397600C>G	Intron-20	0,194	0,200	8,65E-01	0,113
rs161885177	g.93397631A>T	Intron-20	0,534	0,459	3,52E-02	0,356
rs403866848	g.93397705C>T	Intron-20	0,246	0,239	9,88E-01	0,139
rs415186098	g.93397718C>T	Intron-20	0,309	0,357	9,18E-02	0,233
rs430517308	g.93397780T>C	Intron-20	0,162	0,192	9,26E-02	0,107
rs409125240	g.93397817A>G	Intron-20	0,120	0,140	1,56E-01	0,076
rs420247553	g.93397857G>T	Intron-20	0,152	0,166	3,88E-01	0,092
rs427755483	g.93397920C>T	Intron-20	0,241	0,235	1,00E+00	0,136
rs193637301	g.93398021G>A	Intron-20	0,487	0,440	2,04E-01	0,327
rs421650487	g.93398162C>T	Intron-20	0,136	0,154	2,56E-01	0,084
rs400201314	g.93398392G>A	Intron-21	0,377	0,423	1,73E-01	0,304
rs411539518	g.93398442C>T	Intron-21	0,236	0,231	1,00E+00	0,134
rs418818682	g.93398765T>C	Intron-22	0,524	0,491	4,71E-01	0,435
rs401407818	g.93398827A>C	Intron-22	0,021	0,051	1,00E-04	0,026

rs423886098	g.93399475G>A	Intron-22	0,225	0,216	8,72E-01	0,123
-------------	---------------	-----------	-------	-------	----------	-------

**Suplemento 2.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *CAPNI* de ovinos Santa Inês.

Registro no NCBI	Nome HGVS	Região	HO	HP	P-valor	MAF
rs417411045	g.42625336G>A	Intron-14	0,071	0,164	1,86E-08	0,090
rs428375521	g.42625414G>T	Intron-14	0,104	0,108	9,11E-01	0,057
rs407017992	g.42625446C>T	Intron-14	0,333	0,345	7,73E-01	0,221
rs422192534	g.42625525G>A	Intron-14	0,361	0,492	4,00E-04	0,437
rs400729075	g.42625534C>T	Intron-14	0,350	0,487	2,00E-04	0,421
rs407944017	g.42625600G>A	Intron-14	0,372	0,486	2,10E-03	0,415
rs419029128	g.42625785T>C	Intron-14	0,306	0,495	3,34E-07	0,448
rs401662939	g.42625811G>A	Intron-14	0,399	0,427	4,51E-01	0,309
rs162278939	g.42625831G>A	Intron-14	0,213	0,255	5,72E-02	0,150
rs424143722	g.42625974C>T	Intron-15	0,273	0,499	9,08E-10	0,481
rs398261375	g.42626055G>A	Intron-16	0,377	0,423	1,88E-01	0,303
rs413668712	g.42626121T>C	Intron-16	0,333	0,494	1,55E-05	0,445
rs424964941	g.42626178C>T	Intron-16	0,339	0,489	4,79E-05	0,426
rs403309597	g.42626214C>T	Intron-16	0,339	0,484	7,75E-05	0,410
rs410518425	g.42626217A>G	Intron-16	0,355	0,491	3,00E-04	0,434
rs423441243	g.42626230A>G	Intron-16	0,104	0,108	9,11E-01	0,057
rs417258958	g.42626364G>A	Intron-16	0,470	0,464	1,00E+00	0,366
rs428514817	g.42626539G>A	Intron-16	0,366	0,414	1,58E-01	0,292
rs403089766	g.42626685G>A	Intron-16	0,148	0,339	2,93E-12	0,216
rs418303621	g.42626803C>T	Intron-16	0,568	0,480	1,97E-02	0,399
rs161627773	g.42626874C>T	Intron-16	0,246	0,224	3,32E-01	0,128
rs407863935	g.42626996C>T	Intron-16	0,552	0,476	4,82E-02	0,391
rs419204865	g.42627113G>A	Intron-17	0,333	0,292	8,66E-02	0,178
rs430177297	g.42627152G>A	Intron-17	0,317	0,274	4,87E-02	0,164
rs408790217	g.42627199G>A	Intron-17	0,355	0,357	1,00E+00	0,232
rs398427062	g.42627301T>C	Intron-17	0,388	0,339	7,29E-02	0,216
rs161627780	g.42627382G>C	Intron-17	0,454	0,379	1,07E-02	0,254
rs593794806	g.42627386C>T	Intron-17	0,142	0,132	7,69E-01	0,071
rs420860201	g.42627413T>C	Intron-17	0,328	0,303	3,98E-01	0,186
rs399366555	g.42627482A>G	Intron-17	0,137	0,127	8,30E-01	0,068
rs1090899021	g.42627701C>T	Intron-18	0,208	0,296	4,00E-04	0,180
rs406194123	g.42627702G>C	Intron-18	0,246	0,326	2,80E-03	0,205
rs403005481	g.42628023G>A	Intron-19	0,191	0,224	1,07E-01	0,128
rs418468486	g.42628173T>C	Intron-19	0,415	0,489	5,36E-02	0,426
rs429532201	g.42628237G>A	Intron-19	0,383	0,348	2,65E-01	0,224
rs403953588	g.42628259A>G	Intron-19	0,541	0,488	2,03E-01	0,423
rs414993519	g.42628421G>A	Intron-19	0,104	0,240	2,22E-10	0,139
rs430307080	g.42628438T>C	Intron-19	0,481	0,486	9,85E-01	0,415
rs161627795	g.42628555G>A	Intron-19	0,049	0,058	2,87E-01	0,030
rs427085960	g.42628581G>A	Intron-19	0,273	0,329	4,02E-02	0,208
rs409655600	g.42628609A>C	Intron-19	0,098	0,132	1,34E-02	0,071
rs421035003	g.42628678C>T	Exon-20	0,404	0,425	6,04E-01	0,306
rs590844301	g.42628813C>T	Intron-20	0,022	0,022	1,00E+00	0,011
rs410614126	g.42628830T>G	Intron-20	0,421	0,446	5,17E-01	0,336
rs400201468	g.42628928G>A	Intron-20	0,454	0,446	9,90E-01	0,336

**Suplemento 3.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *GH* de ovinos Santa Inês.

Registro no NCBI	SNP	Região	HO	HP	P-valor	MAF
rs1135847308	g.47485910G>C	Exon 5	0.016	0.026	5.23E-02	0.013
rs397514078	g.47485969G>A	intron 4	0.037	0.036	1.00E+00	0.018
rs397514077	g.47486059G>A	intron 4	0.052	0.051	1.00E+00	0.026
rs397514076	g.47486149A>C	intron 4	0.225	0.200	1.39E-01	0.113
rs397514074	g.47486221T>C	intron 4	0.911	0.500	1.98E-33	0.492
rs397514102	g.47486322C>T	Exon 4	0.105	0.099	1.00E+00	0.052
rs397514073	g.47486418C>G	Intron 3	0.743	0.488	2.28E-13	0.424
rs397514072	g.47486424T>C	Intron 3	0.921	0.500	1.17E-35	0.487
rs1092944696	g.47486448T>G	Intron 3	0.173	0.175	1.00E+00	0.097
rs1092437056	g.47486453G>A	Intron 3	0.173	0.158	4.41E-01	0.086
rs1135847309	g.47486604G>A	Intron 3	0.099	0.095	1.00E+00	0.050
rs397514070	g.47486736C>T	Exon 3	0.120	0.113	9.89E-01	0.060
rs397514069	g.47486781G>T	intron 2	0.094	0.090	1.00E+00	0.047
rs589527314	g.47486819C>A	intron 2	0.298	0.289	9.08E-01	0.175
rs1087440770	g.47486832T>C	intron 2	0.110	0.104	1.00E+00	0.055
rs397514068	g.47486836C>T	intron 2	0.058	0.140	1.49E-08	0.076
rs1135847310	g.47486837A>T	intron 2	0.021	0.021	1.00E+00	0.010
rs397514066	g.47486853C>T	intron 2	0.052	0.051	1.00E+00	0.026
rs397514065	g.47486896A>G	intron 2	0.157	0.145	5.81E-01	0.079
rs1135847311	g.47486910G>T	intron 2	0.298	0.254	1.45E-02	0.149
rs397514064	g.47486914G>A	intron 2	0.157	0.145	5.81E-01	0.079

**Suplemento 4.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *IGF1* de ovinos Santa Inês.

Registro no NCBI	HGVS	Região	HO	HP	P-valor	MAF
rs430457475	g.171108499T>G	Intron 1	0.388	0.389	1.00E+00	0.265
rs1135847304	g.171108609C>A	Intron 1	0.224	0.199	1.95E-01	0.112
rs595347398	g.171109001delA	Intron 1	0.024	0.023	1.00E+00	0.012
rs1135847305	g.171109002A>G	Intron 1	0.012	0.023	3.53E-02	0.012
rs410261231	g.171109151T>C	Intron 1	0.006	0.106	2.75E-14	0.056
rs421621914	g.171109262T>C	Intron 1	0.259	0.347	2.60E-03	0.224
rs401398263	g.171110364C>G	Intron 1	0.047	0.068	2.46E-02	0.035
rs412470350	g.171110428C>T	Intron 1	0.494	0.499	9.82E-01	0.482
rs402300271	g.171110492C>T	Intron 1	0.118	0.111	1.00E+00	0.059
rs418030625	g.171110600G>A	Intron 1	0.259	0.242	6.30E-01	0.141
rs425204511	g.171110688C>T	Intron 1	0.265	0.247	5.70E-01	0.144
rs403521045	g.171110860G>T	Intron 1	0.194	0.194	1.00E+00	0.109
rs414846691	g.171111015T>G	Intron 1	0.000	0.121	5.64E-18	0.065
rs430449367	g.171111287C>T	Intron 1	0.400	0.395	1.00E+00	0.271
rs409110739	g.171111426G>A	Intron 1	0.353	0.438	1.77E-02	0.324
rs421570650	g.171112440C>T	Intron 1	0.065	0.074	4.24E-01	0.038
rs600588782	g.171112488delCA	Intron 1	0.035	0.035	1.00E+00	0.018
rs400113576	g.171112496C>T	Intron 1	0.294	0.366	1.95E-02	0.241

**Suplemento 5.** Heterozigosidades observada (HO) e predita (HP), probabilidade nominal (P-valor) do teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg e menor frequência alélicas (MAF) dos polimorfismos no gene *LEP* de ovinos Santa Inês.

Registro no NCBI	HGVS	Região	HO	HP	P-valor	MAF
rs161801472	g.92501206C>T	Intron 2	0.000	0.109	1.50E-18	0.058
rs408463464	g.92501356A>G	Intron 2	0.524	0.491	4.71E-01	0.435
rs419596134	g.92501372G>A	Intron 2	0.141	0.200	1.10E-03	0.113
rs398357543	g.92501407C>T	Intron 2	0.377	0.371	1.00E+00	0.246
rs409675427	g.92501438G>A	Intron 2	0.068	0.066	1.00E+00	0.034
rs421064645	g.92501543A>G	Intron 2	0.482	0.455	5.50E-01	0.351
rs410864710	g.92501808G>A	Intron 2	0.503	0.493	9.26E-01	0.440
rs422219521	g.92502245A>G	Intron 2	0.351	0.352	1.00E+00	0.228
rs400734857	g.92502283T>C	Intron 2	0.382	0.368	7.87E-01	0.243
rs423196216	g.92502367C>T	Intron 2	0.084	0.099	1.62E-01	0.052
rs406003615	g.92502623G>C	Intron 2	0.387	0.371	7.15E-01	0.246
rs413205084	g.92502642A>G	Intron 2	0.267	0.309	9.86E-02	0.191
rs424642048	g.92502663T>C	Intron 2	0.251	0.299	5.13E-02	0.183
rs593178720	g.92502821C>T	Intron 2	0.073	0.071	1.00E+00	0.037
rs403103423	g.92502922G>T	Intron 2	0.366	0.349	6.62E-01	0.225
rs418548121	g.92502947A>C	Intron 2	0.393	0.374	6.46E-01	0.249
rs1135847359	g.92502987delA	Intron 2	0.010	0.010	1.00E+00	0.005
rs1135847360	g.92503024G>A	Intron 2	0.366	0.360	1.00E+00	0.236
rs596008192	g.92503025C>T	Intron 2	0.372	0.363	9.36E-01	0.238
rs429879457	g.92503044A>G	Intron 2	0.492	0.495	1.00E+00	0.450
rs404287904	g.92503086G>A	Intron 2	0.366	0.366	1.00E+00	0.241