

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

GLEICE RANGEL SILVEIRA LIMA

**POLIMORFISMOS GÊNICOS RESPONSÁVEIS PELA COR DE PELAGEM  
EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

Campos dos Goytacazes - RJ

2015

GLEICE RANGEL SILVEIRA LIMA

**POLIMORFISMOS GÊNICOS RESPONSÁVEIS PELA COR DE PELAGEM  
EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ORIENTADORA: Prof. Celia Raquel Quirino

Campos dos Goytacazes - RJ

2015

GLEICE RANGEL SILVEIRA LIMA

**POLIMORFISMOS GÊNICOS RESPONSÁVEIS PELA COR DE PELAGEM  
EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**APROVADA EM 23/02/2015.**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof<sup>a</sup>. Aline Pacheco (Doutora em Ciência Animal) – UFOPA

---

Prof<sup>a</sup>. Aparecida de Fátima Madella Oliveira (Doutora em Ciência Animal) – IFES

---

Prof. Renato Travassos Beltrame (Doutor em Ciência Animal) – UNESC

---

Prof. Ricardo Lopes Dias da Costa (Doutor em Ciência Animal) – IZ

---

Prof<sup>a</sup>. Celia Raquel Quirino (Doutora em Ciência Animal) – UENF (orientadora)

**Dedico este trabalho:**

**Aos meus pais Marly Siqueira Rangel Silveira e José Antônio Silveira**

Que sempre incentivaram minhas escolhas e apostaram no meu crescimento pessoal e profissional. Me apoiaram em todas decisões por muitas vezes questionadas, mas nunca criticadas, apoiando meus objetivos mesmo sendo ora inconstantes. À vocês que abdicaram de si próprios para que eu e minha irmã pudéssemos estudar e nos especializar.

**À minha filha Clarice Silveira Lima**

Por muitos dias deixei de dar a devida atenção que uma criança merece por estar buscando uma especialização e um futuro melhor para a família que construímos. Dedico este trabalho a você minha princesa e mesmo quando a mamãe estava distante era seu rostinho que abrilhantava os dias difíceis no laboratório e todas as noites quando retornava à casa.

**À minha irmã Graziela Silveira Lima**

Pelo companheirismo, amizade, amor e paciência que me ofereceu. Obrigado por sempre estar disposta a ajudar nos momentos de desespero e nos inesquecíveis cooffee breaks! Agradeço a Deus todos os dias por ter o privilégio de poder te chamar de minha “maninha”.

**Ao meu marido Thiago Guerra Lima**

Decido em especial à você este trabalho meu amor, por sempre estar ao meu lado não porque tinha que estar, mas porque queria estar aqui. À você que sempre me apoiou e compreendeu meus objetivos. Hoje essa conquista também é sua.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora, Doutora Célia Raquel Quirino, minha gratidão pela oportunidade de ser lapidada por uma orientadora sábia que encontrou o melhor de mim e pacientemente me proporcionou conhecimento.

À Bolsista de Pós Doutorado, Aline Pacheco, por ajudar a me adaptar as rotinas do laboratório, por todo apoio e incentivo.

À professora, Doutora Aparecida de Fátima Madella Oliveira, que nos concedeu a mensuração de parâmetros fisiológicas e amostras de DNA de alguns ovinos utilizados neste trabalho.

Ao professor, Doutor Álvaro Fabrício Lopes Rios e Doutor Messias Gonzaga Pereira por nos acolherem em seus laboratórios.

Aos professores, Doutor Renato Travassos Beltrame e Doutor Ricardo Lopes Dias da Costa, pelas valiosas sugestões.

Aos mestrandos e doutorandos do LRMGA, Júlia, Junior, Ana, Miguel, Wilder e Amanda, que ajudaram nas coletas amostrais deste trabalho com muita animação e parceria. Obrigado a todos.

Aos técnicos de laboratório, Thiago e Marcela, pelos esclarecimentos metodológicos.

À UENF e ao CNPQ pelo patrocínio do projeto.

## RESUMO

LIMA, G.R.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. **Polimorfismos gênicos responsáveis pela cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Fevereiro, 2015.

Os ovinos da raça Santa Inês naturalizados no Brasil e provenientes do cruzamento das raças Morada Nova e Bergamácia apresentam variações na cor de pelagem. Desta forma, esta raça é um modelo interessante para avaliar os efeitos de polimorfismos dos genes que afetam essa característica fenotípica. O gene MC1R é um dos responsáveis por essas variações. O objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros fisiológicos e as temperaturas superficiais corporais e suas variações de acordo com o sexo, a idade e a cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês e descrever a variação em três locus do gene MC1R visando estudos de correlação com a característica fenotípica cor da pelagem. Foram avaliados 53 ovinos da raça Santa Inês, monocoloridos e multicoloridos, criados na região Norte do Rio de Janeiro. Parâmetros fisiológicos como: frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal e as temperaturas superficiais do corpo foram medidas no período da tarde (13-15h), no mês de fevereiro/2014. Para a análise molecular foram utilizados 121 ovinos da raça Santa Inês, multicoloridos e monocoloridos, criados no estado de São Paulo, norte do estado do Rio de Janeiro e sul do estado do Espírito Santo. O DNA foi extraído dos bulbos de pelos coletados da porção final da cauda dos animais. A genotipagem dos três SNPs foram realizadas a partir da reação em cadeia de polymerase-restrição de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP) avaliada com as enzimas de restrição Acil, NlaIII e BmgBI no gene MC1R. Observou-se diferenças no peso em relação ao sexo e à idade dos animais avaliados. A idade apresentou diferença na frequência cardíaca e na temperatura, sendo que as fêmeas apresentaram maior temperatura de cernelha que os machos. De acordo com a classificação de estresse pela frequência respiratória dos animais avaliados, 47% estavam sob estresse baixo, 11,3% sob estresse médio-alto e 3,77% apresentaram alto nível de estresse ao calor. Não foi possível verificar influência da cor de pelagem sobre os parâmetros fisiológicos. Os ovinos da raça Santa Inês apresentaram a frequência respiratória quantificada pela severidade do estresse ao calor nos

machos de cor preta ou castanha. O genótipo homocigoto para o alelo sem o SNP (selvagem) foi de 75% no *locus* Aci1-MC1R e 25% para heterocigoto, com apenas um cromossomo apresentando SNP (mutante). A frequência do alelo mutante nesse *locus* foi de 12,6%. O *locus* Nla1-MC1R apresentou 37% do genótipo homocigoto selvagem, 23% do genótipo homocigoto mutante e 40% do genótipo heterocigoto, com a frequência de 42,8% para o alelo mutante. O *locus* Bmg3-MC1R apresentou 20% do genótipo homocigoto selvagem, 12% do genótipo homocigoto mutante e 68% do genótipo heterocigoto, com a frequência de 45,8% para o alelo mutante. Para a realização das associações dos fenótipos aos genótipos foi utilizado o programa Prism 6 for Mac OS X, no qual os alelos do *locus* Aci1-MC1R, em que o alelo (T) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (CT) aumenta em 10.76 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto ( $p < 0,0001$ ). No *locus* Nla1-MC1R, o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta, sendo que o genótipo (TT) aumenta em 4,688 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0016$ ). E no *locus* Bmg3-MC1R, onde o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta, com o genótipo (AG) aumentando em 19,92 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0001$ ). As mutações alélicas nos *locus* estudados indicariam a presença de variabilidade da cor de pelagem dos animais avaliados.

Palavras – Chave: polimorfismo, parâmetros fisiológicos, ovinos, cor de pelagem.

## ABSTRACT

LIMA, G.R.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. **Gene polymorphism responsible for variation in coat color in the Santa Inês sheep.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Fevereiro, 2015.

The breed sheep Santa Inês naturalized in Brazil comes the crossing of breeds Morada Nova and Bergamacia present variations in coat color. This fact makes this breed an interesting model to evaluate the effects of polymorphisms in genes that affect this phenotypic trait. The MC1R gene is responsible for variations on this characteristic. The objective of this work was to study the physiological parameters and body surface temperatures and its variations according to body weight, sex, age and coat color in sheep Santa Inês and describe the variation in three MC1R gene locus correlation studies aimed phenotype (coat color). Were evaluated 53 sheep Santa Inês monocolored and multicolored created in the North of Rio de Janeiro. Physiological parameters measures were heart rate, respiratory, and rectal temperature as superficial body temperatures were taken at afternoon period (13-15pm) at February month. For molecular analysis, were used 121 sheep Santa Inês, multicolored and monocolored, created in São Paulo, north of the State of Rio de Janeiro and southern Espírito Santo. The DNA was extracted from those bulbs collected from the animal tail. Genotyping of SNPs three were made from the reaction polymerase chain - Restriction of polymorphic fragments (PCR-RFLP) as evaluated with restriction enzymes, (AciI, NlaIII and BmgBI) in the MC1R gene. It was found differences in the body weight when compared the sex and age of the animals. The age difference showed as the heart rate. Females had higher temperature withers than males. According with the stress classification for respiratory frequency of the animals evaluated, 47% shown stress down, 11.3% medium-high stress and 3.77% had a high level of stress to heat. We found that there is a coat color Influence on the physiological parameters. Were described allelic mutations in the locus studied in addition to this a fee crescent gene heterozygosity. It was shown that the homozygous genotype for the allele without SNP (wild) was 75% in Aci1-MC1R locus and 25% heterozygous, with only one chromosome presenting the SNP (mutated). The frequency of the mutant allele in this locus was 12.6%. The Nla1-MC1R locus

showed 37% of the wild homozygous genotype, 23% of homozygous mutant genotype and 40% of the heterozygous genotype, with the frequency of 42.8% for the mutant allele. The Bmg3-MC1R *locus* showed 20% of the wild homozygous genotype, 12% of homozygous mutant genotype and 68% of the heterozygous genotype, with the frequency of 45.8% for the mutant allele. To carry out the associations of phenotypes to genotypes was used Prism 6 program for Mac OS X where to alleles of the MC1R locus Aci1-MC1R , where the allele (T) is associated with the color black coat , the genotype (CT) increases by 10,76 times the likelihood of the animal having the black ( $p < 0,0001$ ). In Nla1-MC1R locus allele (A) is associated with the black coat color, the genotype (TT) increases by 4,688 times the likelihood of multicolor ( $p < 0,0016$ ). And Bmg3-MC1R locus where the allele (A) is associated with the black coat color , the genotype (AG) 19,92 times in the likelihood of multicolor ( $p < 0,0001$ ). Allelic mutations have been described in the studied locus that would indicate the presence of the color coat variability of animals evaluated.

Key - Words: polymorphism, physiological parameters, sheep, coat color.

## LISTA DE FIGURAS

### **POLIMORFISMOS GÊNICOS RESPONSÁVEIS PELA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

**Figura 1** Receptor de melanocortina 1.....24

### **Trabalho 1: ADAPTABILIDADE TÉRMICA EM RELAÇÃO À COR DE PELAGEM, AOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E ÀS TEMPERATURAS SUPERFICIAIS CORPORAIS EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

**Figura 1** Imagem termográfica delimitando áreas corporais em ovino multicolorido da raça Santa Inês.....34

### **Trabalho 2: POLIMORFISMOS DO GENE MC1R RESPONSÁVEL PELA VARIAÇÃO NA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

**Figura 1** Alelos do *locus* Aci1-MC1R.....55

**Figura 2** Alelos para o *locus* Nla1-MC1R.....56

**Figura 3** Alelos para o *locus* Bmg3-MC1R.....57

## LISTA DE TABELAS

### **Trabalho 1: ADAPTABILIDADE TÉRMICA EM RELAÇÃO À COR DE PELAGEM, AOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E AS TEMPERATURAS SUPERFICIAIS CORPORAIS EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

**Tabela 1** Dados climatológicos do município de Campos dos Goytacazes no norte do estado do Rio de Janeiro no mês de fevereiro de 2014.....33

**Tabela 2** Médias e respectivos desvios padrão para peso (Kg), frequência respiratória (ipm) (FR), cardíaca (bpm) (FC), temperatura retal (°C) (TR) de ovinos da raça Santa Inês.....35

**Tabela 3** Médias e respectivos desvios padrão para as temperaturas superficiais (°C) do olho (TO), cernelha (TC), garupa (TG) e joelho (TJ) em ovinos da raça Santa Inês de acordo com o sexo, idade e cor de pelagem.....38

### **Trabalho 2: POLIMORFISMOS DO GENE MC1R RESPONSÁVEL PELA VARIAÇÃO NA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

**Tabela 1** Primers, condições de PCR, PCR-RFLP, genotipagem e nomenclatura dos *locus* mutantes.....50

**Tabela 2** Frequência Genotípica (%) dos *locus* Aci1-MC1R, Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R.....58

**Tabela 3** Frequência Alélica (%) e Heterozigose / Diversidade Gênica (%) dos *locus* Aci1-MC1R, Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R.....59

**Tabela 4** Associação alélica dos *locus* Aci1-MC1R (1), Nla1-MC1R (2) e Bmg3-MC1R (3) em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês.....60

**Tabela 5** Associação genotípica dos *locus* Aci1-MC1R (1), Nla1-MC1R (2) e Bmg3-MC1R (3) em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês.....62

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 - Objetivo geral.....	16
2.2 - Objetivos específicos.....	16
<b>3- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1- A ovinocultura no Brasil e no Mundo.....	17
3.2- Padrões de pelagem da raça Santa Inês.....	18
3.3- Adaptabilidade Térmica.....	20
3.4-Genética Molecular e genes responsáveis pela cor de pelagem.....	22
3.4.1- Receptor de Melanocortina 1 (MC1R).....	23
<b>4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	25
<b>5- TRABALHOS</b> .....	28
<b>ADAPTABILIDADE TÉRMICA EM RELAÇÃO À COR DE PELAGEM, AOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E ÀS TEMPERATURAS SUPERFICIAIS CORPORAIS EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS</b>	
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1- Animais e local.....	32
2.2- Parâmetros fisiológicos.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

4. CONCLUSÕES.....	39
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
<b>POLIMORFISMOS DO GENE MC1R RESPONSÁVEL PELA VARIAÇÃO NA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS</b>	
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1- Animais e Amostras.....	48
2.2- Extração de DNA.....	49
2.3- Técnica de PCR e genotipagem dos locos mutantes.....	49
2.4- Análise estatística.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1- Alelos.....	55
3.2- Frequência alélica, genotípica e heterozigose.....	58
3.3- Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	59
3.4- Associação fenótipos-genótipos.....	60
4. CONCLUSÕES.....	64
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
6. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	66

## 1- INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, essa amplitude se deve principalmente ao poder de adaptação dos ovinos aos diferentes climas, relevos e vegetações. Sendo assim, sua criação é destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

A criação brasileira de ovinos é destinada, principalmente, à produção de carne e vem se expandido na última década. Dentre as raças criadas no país, destaca-se a raça Santa Inês. Sua origem advém do cruzamento entre ovinos da raça Bergamácia, de origem italiana, com ovelhas crioulas e Morada Nova, seguido de um período de seleção e/ou evolução para ausência de lã. É uma raça com alto potencial para crescimento, mas com baixa taxa de partos múltiplos. Em condições de pastejo, o peso de uma ovelha adulta pode variar entre 40 e 50 kg, podendo os machos atingir até 90 kg (SOUSA *et al.*, 1999).

Os ovinos da raça Santa Inês por serem naturalizados no Brasil e provenientes do cruzamento de duas diferentes raças, apresentam variações na cor de pelagem. Entre essas variações destacam-se a cor branca (pelagem totalmente branca e animais com mucosa e cascos brancos), chitada (pelagem branca com manchas pretas e marrons espalhadas por todo corpo), vermelha (pelagem totalmente vermelha) e preta (pelagem totalmente preta) (OLIVEIRA, *et al.* 2011).

Animais com pelagem escura, geralmente, são mais susceptíveis ao estresse calórico que os de pelagem clara por absorverem maior carga térmica radiante. Para que seja efetiva a reflexão luminosa em uma cor de pelagem clara, a

epiderme do animal deve ser pigmentada e os pelos devem ser bem distribuídos (VERISSIMO *et al.*, 2009).

Um dos fatores importantes na criação e produção de ovinos é a tolerância ao calor e a adaptabilidade a ambientes tropicais.

Entre os animais domésticos, o ovino é um dos que apresentam mecanismos anatomorfológicos mais propícios à sobrevivência em regiões de altas temperaturas, destacando-se a necessidade do conhecimento da tolerância ao calor e da capacidade de adaptação das raças, como forma de aprimoramento quanto à exploração ovina, de forma a propor programas de cruzamento com o objetivo de incluir raças mais adequadas a condições ambientais específicas (SANTOS, 2006).

Devido à presença das variações da cor de pelagem, a raça Santa Inês torna-se interessante para avaliar os efeitos de polimorfismos dos genes que interferem nessa característica fenotípica. De forma que a base genética do padrão da cor recessiva da pelagem em ovinos é ainda pouco compreendida.

A herança da cor de pelagem em mamíferos tem sido estudada principalmente a partir de uma perspectiva qualitativa, onde os fenótipos são definidos por categorias distintas (castanho, preto, marrom, cinza, etc.) e são controlados por poucos genes que mostram uma relação epistática de herança. Entretanto, a variação na cor de pelagem é afetada por um grande número de genes. Por exemplo, foram identificados 127 genes responsáveis pela variação da cor de pelagem em ratos e cerca de 59 desses genes foram relacionados a mutações determinantes dessas variações, sendo recentemente clonados molecularmente (TOTH *et al.*, 2014).

Toth *et al.* (2014) relataram que as informações genéticas sobre a pigmentação nos pelos dos mamíferos é bastante complexa, exibindo assim características quantitativas e qualitativas.

Assim, são cada vez maiores as contribuições da genética quantitativa e molecular no melhoramento genético dos ovinos e conseqüentemente na produção de carne ovina no Brasil, uma vez que as biotecnologias aplicadas a esses animais desencadeiam inúmeras e reais possibilidades de melhora.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi identificar regiões polimórficas no genoma de ovinos da raça Santa Inês que estão diretamente ligadas a variabilidade na cor de pelagem e relacionadas indiretamente ao estresse térmico dos animais.

### 2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da coloração da pelagem, sexo e idade de ovinos da raça Santa Inês sobre a adaptabilidade ao estresse térmico a partir da análise de parâmetros fisiológicos e temperaturas corporais;
- Identificar o polimorfismo dos genes MC1R (Receptor de Melanocortina 1) e a relação com a coloração da pelagem em ovinos da raça Santa Inês;
- Identificar e determinar a frequência dos alelos e genótipos mutantes no gen MC1R;

### 3- REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1- A OVINOCULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticados pelo homem. A sua criação possibilitava alimento, a partir do consumo da carne, leite e pelo uso da lã, fibra que servia como abrigo contra as variações de temperatura ambiental.

No cenário mundial a ovinocultura também é promissora, estimando-se um crescimento anual de 2,1% durante o período de 2005 a 2014 (FAO, 2007). A Austrália e Nova Zelândia controlam o mercado internacional da carne e lã. No entanto, é esperado queda no número de cordeiros abatidos na Austrália, devido à má condição das pastagens e elevação no preço dos grãos. Além disso, o aumento na demanda interna pode diminuir as exportações da Austrália em 7%. Também é esperado queda na exportação da Nova Zelândia, aumento das importações dos Estados Unidos e estagnação das importações da União Europeia, que continua sendo o destino mais importante da carne ovina (FAO, 2009). Este cenário é favorável a países emergentes na produção e exportação da carne ovina.

Em 2010 o efetivo de ovinos no Brasil foi de 17.380.581 animais, apresentando um aumento de 3,4% quando comparado a 2009. Dentre as regiões brasileiras o Centro-Oeste apresentou maior crescimento em 2010, com 12,4%, seguido pela região Norte com 7,1%, Nordeste com 3,0%, Sudeste com 2,6% e Sul com 1,6%. A região Nordeste, apesar de não ter apresentado o maior crescimento

em 2010 é a região que possui o maior efetivo de ovinos para produção de carne e leite, com 56,7% de todo o efetivo nacional. Seus rebanhos começaram a ser explorados economicamente com a introdução de raças especializadas, melhoramento genético e técnicas de manejo que propiciaram a elevação da produtividade nos últimos anos (IBGE, 2010).

A ovinocultura de corte no Brasil possui um alto potencial de crescimento, uma vez que a produção atual não atende a demanda do mercado consumidor, sendo necessária a importação do produto. Isso, devido a diversos fatores que afetam negativamente a estruturação da ovinocultura no Brasil, tais como: o sistema de produção, a escala de produção e constância do fornecimento, o padrão animal, o número de abatedouros e abates clandestinos, preços e importação (REIS, 2009).

O Brasil importa carne ovina, sendo o Uruguai o principal fornecedor, competindo em preço com a carne brasileira e ainda é rotulada como carne especial, de qualidade superior. Essa competitividade da carne ovina importada afeta os preços pagos ao produtor. Além disso, possuem uma maior aceitação dos consumidores em relação à carne ovina brasileira (VIANA, 2008).

O consumo de carne ovina per capita no Brasil é de, aproximadamente 0,7kg, sendo baixo quando comparado ao consumo de carne bovina, 36,5kg, de frango, 29,9kg e suína, 10,5kg (FAO, 2007).

Desafios atuais da ovinocultura de corte no Brasil seriam disponibilizar uma ampla variedade de cortes para que todas as classes sociais tenham acesso à carne ovina, estratégias de marketing e melhorar a estruturação da ovinocultura, através da organização dos produtores e aplicação de sistemas de produção viáveis, fornecendo carne de qualidade aos consumidores (MACEDO *et al.*, 2000).

### 3.2- PADRÕES DE PELAGEM DA RAÇA SANTA INÊS

Características de pelame como a cor, devem ser levadas em consideração na avaliação da tolerância ao calor, uma vez que animais com pelame escuro absorvem maior radiação solar, resultando em maior estresse para estes animais do que os de pelame claro. Muitas vezes, as mudanças nos padrões de comportamento, como a agitação e intolerância, são exemplos de reflexos da

tentativa do animal de amenizar, fugir ou escapar de agentes/estímulos estressantes (SANTOS *et al.*, 2011).

Em regiões tropicais (quentes), o ovino apresenta pele fina coberta por pelos sedosos e finos, uma vez que produzem pouco calor corporal. A coloração da pele é determinada pela quantidade de pigmentos de melanina. A coloração negra da pele garante a defesa contra os raios actínicos (ultravioletas). A coloração clara garante uma melhor resistência ao frio. Assim, nas regiões tropicais os animais precisam ter uma pele muito pigmentada, com muitas glândulas sebáceas, pois a oleosidade da pele funciona como um filtro contra as radiações solares (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Segundo Santos (2007), a raça Santa Inês possui dois tipos de pelagens básicas que incluem todas as possíveis variações:

a) *Monocolorida ou coloração única*: varia desde a branca-suja à negra. Nos dias atuais destacam-se a coloração “pelo-de-boi” (ou castanha), a vermelha e a negra;

b) *Multicolorida*: com manchas escuras sobre um fundo claro, mas também são comuns animais com fundo escuro e manchas claras. Podem ser agrupadas em quatro subvariações:

- Malhada: manchas arredondadas, grandes e nítidas;
- Tartarugada: manchas arredondadas, pequenas com bordas definidas ou não;
- Lavrada: manchas retas ou muito definidas;
- Chitada: pingos, borrões, sem contornos definidos;
- Chuviscada: pingos, salpicos, chuviscos, com contorno definidos.

Uma das virtudes da raça Santa Inês é poder ser criada em diversas situações ambientais, tendo em vista que sua pelagem diversificada é uma riqueza em seu arsenal biológico. Assim, cada região, clima, altitude, exige uma pelagem e uma pele adequada. A pele e a pelagem são duas importantes ferramentas de sobrevivência diante da adaptabilidade térmica do animal ao ambiente, permitindo ser criada em qualquer ambiente, devido a esta versatilidade de sua pelagem (SANTOS, 2007).

### 3.3- ADAPTABILIDADE TÉRMICA

A tolerância ao calor e a adaptabilidade a ambientes sub tropicais são fatores muito importantes na criação e produção de ovinos. O aumento da temperatura ambiente é fator desencadeante do estresse calórico, que acarreta aumento da secreção do hormônio cortisol, provocando uma série de efeitos no metabolismo do animal que alteram o seu comportamento e bem-estar. Esses fatores provocam prejuízos em relação à ingestão e digestão de alimentos e alteração da taxa metabólica dos animais. Isto pode afetar negativamente o desempenho e a função reprodutiva (VERISSIMO *et al.*, 2009).

O animal nas condições sub tropicais adversas deve apresentar características compatíveis com as condições ambientais a fim de expressar todo o seu potencial genético. A cor de pelagem é uma importante característica envolvida na termorregulação, além dos parâmetros fisiológicos dos animais, sendo assim viável o seu uso no processo de seleção dos animais para clima tropical (NEVES, 2008).

Animais com pelagem escura, geralmente, são mais susceptíveis ao estresse calórico que os de pelagem clara por absorverem maior carga térmica por radiação solar. Embora a reflexão seja maior em uma capa de coloração clara, para que essa vantagem seja efetiva, a epiderme deve ser pigmentada e os pelos densamente distribuídos sobre ela (VERISSIMO *et al.*, 2009).

A mensuração da tolerância ao calor pode ser baseada na temperatura corporal do animal. Desta forma, esta temperatura seria um demonstrativo relevante para o índice de estresse calórico, no qual o mesmo é um importante fator que limita o desenvolvimento dos ovinos e a expressão do seu potencial genético produtivo. As limitações à produção em áreas tropicais podem ser ocasionadas por elementos ambientais estressantes, tais como: temperatura do ambiente, umidade do ar, radiação solar aos trópicos e a sobrevivência em condições difíceis, como muitas doenças e escassez de alimentos. Estes fatores somados ao estresse ambiental, causa diminuição das taxas de sobrevivência e crescimento e da eficiência reprodutiva (VERISSIMO *et al.*, 2009).

Segundo Quesada *et al.* (2001), a produtividade animal depende da capacidade do animal manter a temperatura corporal. Os animais utilizam vários

mecanismos para manter a homeotermia, como a vasodilatação periférica, em que há o redirecionamento do fluxo sanguíneo para a superfície corporal, aumentando a temperatura da superfície do animal facilitando a dissipação de calor por mecanismos não evaporativos (condução, convecção e radiação). Entretanto, a eficácia desses mecanismos depende do gradiente térmico entre o corpo do animal e o ambiente. Quanto maior o gradiente maior será a dissipação de calor. A pele mais quente do animal tende a perder calor em contato com o ar mais frio. Se a temperatura do ar aumenta, diminui essa perda de calor por meio do calor sensível, aumentando a temperatura do núcleo central. Assim, o organismo animal através de mecanismos evaporativos, como a sudorese e/ou frequência respiratória, aumenta a dissipação de calor insensível. A forma insensível de dissipação de calor é regulada pela umidade, ou seja, quanto maior a umidade ambiental mais será comprometido esse mecanismo de dissipação.

Todavia, a temperatura do ar e a umidade são consideradas como os principais elementos climáticos responsáveis pelo incremento calórico à temperatura corporal dos animais. Se o animal não conseguir dissipar calor excedente através dos mecanismos citados, a temperatura retal aumenta acima dos valores fisiológicos normais e desenvolve-se o estresse calórico, responsável em parte pela baixa produtividade animal nos trópicos (FILHO *et al.*, 2011).

Santos (2006) relata em seu trabalho que a avaliação de uma raça ou grupo genético não pode ser baseada apenas na capacidade de ganho de peso e no rendimento de carcaça, mas também na eficiência produtiva, adaptabilidade, prolificidade e taxa de sobrevivência. Assim, se a performance produtiva for baseada apenas no desempenho produtivo, pode estar sujeita a erros. Os critérios de tolerância, longevidade e adaptação dos animais são determinados pelas medidas fisiológicas da respiração, frequência cardíaca e temperatura corporal.

Para Brown-Brandl *et al.* (2003), a temperatura retal e a frequência respiratória são consideradas as melhores variáveis fisiológicas para estimar a tolerância de animais ao calor e em menor escala tem sido objeto de estudo a frequência cardíaca, temperatura da pele e os constituintes sanguíneos.

As frequências cardíaca e respiratória são variáveis sujeitas a um grande número de modificações devido a fatores como a temperatura ambiente, como a idade, a individualidade, o temperamento e o grau de excitação do animal. Entretanto, essas frequências são parâmetros altamente significativos quanto à

mensuração para verificação da adaptabilidade do animal ao estresse calórico (SANTOS, 2006).

Desta forma, o estudo da adaptabilidade ambiental em ovinos é importante para a determinação de fenótipos mais adequados à condição ambiental específica visando a obtenção de uma melhor produtividade.

### 3.4- GENÉTICA MOLECULAR E GENES RESPONSÁVEIS PELA COR DE PELAGEM

Várias têm sido as contribuições da genética molecular na produção ovina ao redor do mundo. Marcadores moleculares e genes de efeito maior têm sido identificados, relacionados à maior deposição de músculos, maior prolificidade e a resistência aos parasitos (BARRETT, 2012).

As características de qualidade da carne ovina têm sido objeto de intensos estudos fora do Brasil. A maciez, cor, aroma, sabor e marmoreio da carne são estudadas também sob o ponto de vista genético. A diversidade das aptidões dos ovinos também podem ser observadas em relação às características reprodutivas (PEREIRA, 2008).

As análises fenotípicas podem ser facilitadas a partir da identificação direta de genótipos, baseado em marcadores moleculares que segregam juntamente com os genes de interesse (ROYO *et al.*, 2008).

Desta forma, os marcadores moleculares são uma ferramenta que pode auxiliar no melhoramento animal, destacando a seleção assistida por marcador molecular para características qualitativas, verificação de parentesco e diagnóstico de anomalias hereditárias.

Cor de pelagem em mamíferos depende, basicamente, da quantidade relativa dos dois tipos básicos de tirosina derivada de melanina: eumelanina (coloração escura) e feomelanina (coloração clara) (ROYO *et al.*, 2008).

Dos diversos *locus* gênicos envolvidos na pigmentação, dois deles são os principais responsáveis pela ampla variedade de coloração em mamíferos: o *Receptor de Melanocortina-1 (MC1R)* e a *Proteína Sinalizadora de Agouti (ASIP)*, os quais eram originalmente conhecidos como *agouti* e *extension* quando identificados

por estudos com camundongos. Ambos apresentam um papel essencial na regulação da síntese de melanina durante o desenvolvimento do pelo (SCHNEIDER, 2013).

A variabilidade da cor de pelagem é influenciada pelos genes MC1R e ASIP, cujos produtos interagem na regulação da produção de melanina. Foi relatado por Schneider (2013) que os fenótipos melânicos em camundongos, frequentemente, se devem a mutações dominantes associadas com a proteína MC1R super ou constitutivamente ativa ou a mutações de herança recessiva causando a perda parcial ou total da função da proteína ASIP. Ou seja, exacerbação da função do MC1R ou perda da função do ASIP induzem o melanismo.

A coloração preta da pelagem em ovelhas é dominante e tem sido relatada por uma extensão alélica, transportando o p.M73K e p.D121, que indica alterações na sequência de codificação do gene MC1R (ROYO *et al.*, 2008).

Royo *et al.* (2008) relatam a ligação entre a pigmentação recessiva na cor de pelagem com os marcadores de DNA do cromossomo 13 em ovinos, em que os mapas do *locus agouti*, indicam o gene ASIP como um candidato para a pigmentação recessiva em ovelhas.

Desta forma, o estudo das variações da cor de pelagem em ovinos Santa Inês abrangeria não apenas as características qualitativas, mas também as características quantitativas possibilitando assim, melhores esclarecimentos a essa variações.

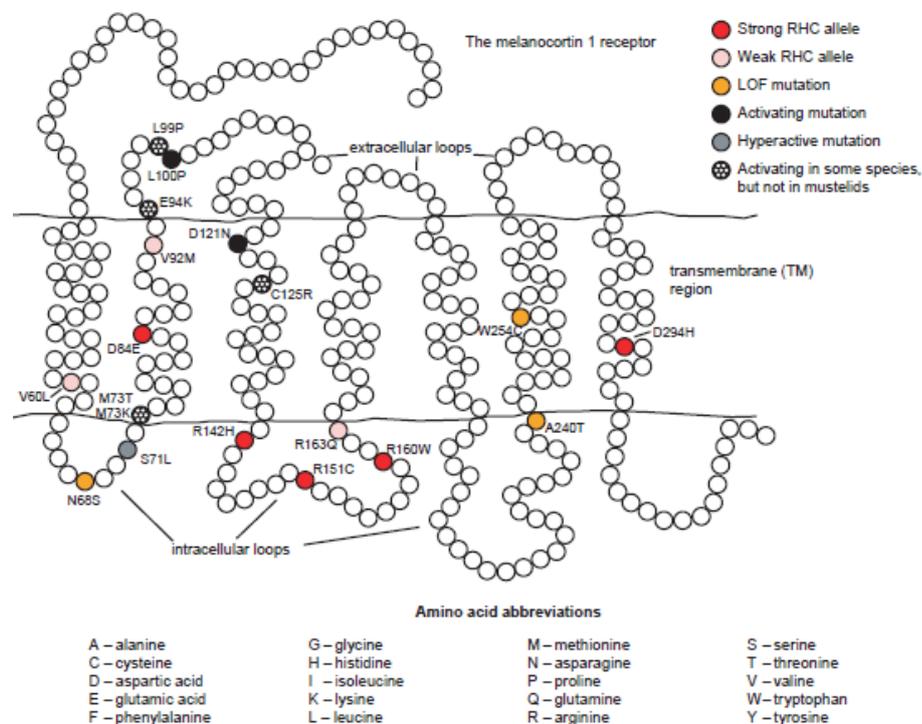
### **3.4.1- Receptor de Melanocortina-1 (MC1R)**

O gene MC1R codifica um receptor acoplado à proteína G contendo sete hélices transmembrana, que é expresso em melanócitos da pele, folículos pilosos e em células do sistema imune. Ao se ligar ao hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH), o MC1R ativa a síntese de AMP cíclico (cAMP) intracelular induzindo a síntese de eumelanina (pigmento escuro: preto, marrom). A ativação do MC1R é inibida pelo gene ASIP, que impede sua ativação pelo  $\alpha$ -MSH e, assim, induz a troca da síntese de eumelanina para feomelanina (pigmento claro: amarelo, avermelhado) (BARRETT, 2012).

Ganhos e perdas de funções devido às mutações do gene MC1R como determinantes de dominância para cor de pelagem preta/escuro e determinantes de recessividade para cor de pelagem amarela ou parcialmente recessivo para cor vermelho/branco, têm sido descritos num grande número de mamíferos, como por exemplo, ratos, humanos, gado, suínos, cavalos, cães, gatos, coelhos e caprinos (FONTANESI *et al.*, 2009).

Em ovinos, estudos genéticos identificaram na raça Missense, em regiões da Toscana e Emilia Romagna, na Itália, dois alelos causados por duas mutações no gene MC1R (p.M73K e p.D121N) que também estão presentes nas raças Dala noruegueses, Corriedale, Damara, Preto Merino, Black Castellana e Karakul e o tipo selvagem que é um alelo amplamente distribuído na maioria das raças. Outra mutação no gene MC1R (p.R67C) na raça Valle del Belice também foi descrita (FONTANESI, 2010).

**Figura 1** Receptor de melanocortina 1.



(LIGHTNER, 2008)

#### 4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETT R. D. H. **Bad coat, ripped genes: cryptic selection on coat colour varies with ontogeny in Soay sheep.** Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA *Molecular Ecology* (2012) 21, 2833–2835.

BOREM A., CAIXETA E.T. **Marcadores Moleculares.** Universidade Federal de Viçosa: 2009. Viçosa-MG: 2 ed.

BROWN-BRANDL T. M., NIENABER J. A., EIGENBERG R. A. Thermoregulatory responses of feeder cattle. **Journal of Thermal Biology**, [S.l.], v. 28, p. 149-157, 2003.

FILHO A. E., TEODORO S. M., CHAVES M. A., SANTOS P. E., FERREIRA D., SILVA M. W. R., MURTA R. M., CARVALHO G. G. P., SOUZA L. E. B. Zona de conforto térmico de ovinos da raça Santa Inês com base nas respostas fisiológicas. **Rev. Bras. Zootec.**, v.40, n.8, p.1807-1814, 2011.

FONTANESI L., RUSTEMP A., BRKAB M., RUSSO V. Analysis of polymorphisms in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes and association with coat colours in two Pramenka sheep types. **Small Ruminant Research** 105 (2012) 89– 96.

FONTANESI L., DALL'OLIO S., BERETTI F., PORTOLANO B., RUSSO V. Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. **Sezione di Allevamenti Zootecnici, University of Bologna.** July 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, 2010. Disponível em: <http://www.iepec.com/noticia/ovinocultura-de-corte-no-brasil-e-no-mundo>: Acesso em: 10/03/2013.

LIGHTNER J. K., Genetics of Coat Color I: The Melanocortin 1 Receptor (MC1R). **Answers Research Journal**. p. 109–116. 2008.

LOBO e LOBO, Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. **Rev. Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.247-253, abr./jun. 2007.

MACEDO, A.F.; SIQUEIRA, E.R.; MARTINS, E.N. Análise econômica da produção de carne de cordeiros sob dois sistemas de terminação: pastagem e confinamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.4, p.677-680, 2000.

NEVES M. L., MENEZES W. **Índices de conforto térmico para ovinos Santa Inês de diferentes cores de pelame em condições de pastejo**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Área: Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia. Orientador: Marcílio de Azevedo. 2008.

OLIVEIRA R. V., XIMENES F. H. B., MENDES C. Q., FIGUEIREDO C.R. R., F. PASSOS. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. CODEVASF. Brasília-DF: 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO. **Estatísticas FAO**. 2007. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 20/02/2013.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO. **Estatísticas FAO - Meat and meat products**. 2009. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 20/02/2013.

QUESADA M., MCMANUS C., COUTO F. A. D. Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Zootec.**, 30(3):1021-1026, 2001.

REIS, F.A. Atualidades na criação de ovinos no Brasil Central. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL FEINCO**, 5, 2009, São Paulo: FEINCO, 2009. p.1-14.

ROYO L. J., ALVAREZ I., ARRANZ J. J., FERNÁNDEZ I., RODRÍGUEZ A., PE´REZ-PARDAL L., GOYACHE F. Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. **Animal Genetics**, 39, 290–293.

SANTOS J. R. S., SOUZA B. B., SOUZA W. H., CEZAR M. F., TAVARES G. P. Physiologic responses and thermal variation of Santa Inês, Morada Nova sheep and their crossbreed with Dorper breed to the semi-arid northeastern of Brazil. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 995-1001, set./out., 2006.

SANTOS M. M., AZEVEDO M., COSTA L. A. B., FILHO F. P. S., MODESTO E. C., LANA A. M. Q., Comportamento de ovinos da raça Santa Inês, de diferentes pelagens, em pastejo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 33, n. 3, p. 287-294, 2011.

SANTOS, R. **Santa Inês: a raça fundamental**. Editora Agropecuária Tropical Ltda: 2007. Uberaba-MG

SCHNEIDER A. **Investigação da base molecular e história evolutiva do Melanismo em felídeos selvagens**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Faculdade de Biociências - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre, 2013.

TITTO, E.A.L., FILHO, J.C.M., VELLOSO, L., FUKUSHIMA, R.S., LIMA, C.G. Termorregulação em ovinos: estudo de temperatura retal, frequência respiratória e ingestão de água. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v.5, n.1, p.56-65, 1998.

TOTH Z., KAPS M., LKNER SO J., BODO I., CURIK I. Quantitative genetic aspects of coat color in horses. **Journal of animal science**. February 2014.

TUPY, O. Importância econômica da bovinocultura de corte. In: **CRIAÇÃO DE BOVINOS DE CORTE NA REGIÃO SUDESTE, EMBRAPA**. Pecuária Sudeste, 2003.

VERÍSSIMO C. J., TITTO C. G., KATIKI L. M., BUENO M. S., CUNHA, E. A., MOURÃO G. B., OTSUK I. P., PEREIRA A. M. F., FILHO J. C. M., TITTO E. A. L. Tolerância ao calor em ovelhas Santa Inês de pelagem clara e escura. **Rev. Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.159-167, jan/mar, 2009.

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

## **5- TRABALHOS**

## **ADAPTABILIDADE TÉRMICA EM RELAÇÃO À COR DE PELAGEM, AOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E ÀS TEMPERATURAS SUPERFICIAIS CORPORAIS EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros fisiológicos e as temperaturas superficiais corporais e suas variações de acordo com o peso corporal, o sexo, a idade e a cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês criados na região Norte do Rio de Janeiro. Foram avaliados 53 ovinos da raça Santa Inês monocoloridos e multicoloridos. Parâmetros fisiológicos como: frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal e as temperaturas superficiais do corpo como a temperatura de garupa, do olho, da cernelha e do joelho foram mensurados no período da tarde (13-15h), no mês de fevereiro/2014. Paralelamente aos parâmetros fisiológicos, foram mensuradas, com auxílio de termômetro de globo portátil, a temperatura ambiente, temperatura do globo negro e a umidade relativa do ar. Foi realizada a análise de variância das características incluindo os efeitos fixos de sexo, idade, cor de pelagem e as interações simples entre os efeitos. Verificaram-se diferenças no peso em relação ao sexo e à idade dos animais avaliados. A idade apresentou diferença na frequência cardíaca e na temperatura, observou-se que as fêmeas apresentaram maior temperatura de cernelha que os machos. De acordo com a classificação de estresse pela frequência respiratória dos animais avaliados, 47% estavam sob estresse baixo, 11,3% sob estresse médio-alto e 3,77% apresentaram alto nível de estresse ao calor. Não existe influência da cor de pelagem sobre os parâmetros fisiológicos nem sobre as temperaturas corporais. Os animais da raça Santa Inês apresentaram características fisiológicas compatíveis à termorregulação para as condições climáticas do norte do estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chaves: cor da pelagem, parâmetros fisiológicos, ovinos Santa Inês.

**THERMAL ADAPTABILITY IN RELATION TO COAT COLOR, THE  
PHYSIOLOGICAL PARAMETERS AND BODY SURFACE TEMPERATURES IN  
SANTA INES SHEEP BREED**

**ABSTRACT**

The objective of this work was to study the physiological parameters and body surface temperatures and its variations according to body weight, sex, age and coat color in the Santa Inês sheep breed in northern Rio de Janeiro, Brazil. We evaluated 53 Santa Ines sheep monocolored and multicolored. Of physiological parameters measured as heart rate, respiratory, rectal temperature, surface temperature of the body like the back of temperature, the eye, the withers and knee were taken in the afternoon (13-15h) in the month of February/2014. During the collection of physiological parameters at the same time were measured environmental parameters using a portable globe thermometer as at room temperature, the black globe temperature and relative humidity. Were realized the analysis of variance of characteristics. The effect sex, age, coat color and their interaction were included in the model. It was found differences in the body weight when compared the sex and age of the animals. The age difference showed as the heart rate. Females had higher temperature withers than males. According with the stress classification for respiratory frequency of the animals evaluated, 47% shown stress down, 11.3% medium-high stress and 3.77% had a high level of stress to heat. We found that there is an influence of the coat color on the physiological parameters but not happen on body surface temperatures in the evaluated sheep. The Santa Ines breed presents physiological characteristics compatible thermoregulation the northern climatic conditions of the Rio de Janeiro state.

Key words: coat color, physiological parameters, Santa Inês sheep.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os animais domésticos, os ovinos apresentam mecanismos anatomorfológicos mais propícios à sobrevivência em regiões de altas temperaturas (SANTOS et al., 2006). Em condições tropicais, onde a maioria dos dias do ano são quentes, o animal deve apresentar características de termorregulação tais como controle de padrões fisiológicos e temperaturas superficiais do corpo a fim de expressar todo o seu potencial genético.

A cor de pelagem e os parâmetros fisiológicos são importantes fatores envolvidos na termorregulação dos animais, sendo assim viável o seu uso no processo de seleção dos animais para clima tropical (NEVES, 2008).

No Brasil, os ovinos da raça Santa Inês por serem localmente adaptados e provenientes do cruzamento de duas diferentes raças, a Morada Nova e a Bergamácia, apresentam variações na cor de pelagem (OLIVEIRA, et al. 2011).

Segundo Santos (2007), a raça Santa Inês possui dois tipos de pelagens básicas que incluem todas as possíveis variações a *Monocolorida ou coloração única* que varia desde a branca-suja à negra. Destacam-se a coloração “pelo-de-boi” (ou castanha), a vermelha e a negra; e a *Multicolorida*: com manchas escuras sobre um fundo claro, mas também são comuns animais com fundo escuro e manchas claras (malhada, tartarugada, lavrada, chitada, chuviscada).

VERISSIMO et al. (2009) relataram que animais com pelagem escura são, geralmente, mais susceptíveis ao estresse calórico do que os de pelagem clara por absorverem maior carga térmica por radiação solar. Os autores salientam que, embora a reflexão seja maior em uma capa de coloração clara, para que essa vantagem seja efetiva, a epiderme deve ser pigmentada e os pelos densamente distribuídos sobre ela.

A produtividade animal depende da capacidade do animal manter a temperatura corporal. Os animais utilizam vários mecanismos para manter a homeotermia, como a vasodilatação periférica, em que há o redirecionamento do fluxo sanguíneo para a superfície corporal, aumentando a temperatura da superfície do animal facilitando a dissipação de calor por mecanismos não evaporativos (condução, convecção e radiação). Quesada et al. (2001) relataram que a eficácia desses mecanismos dependem do gradiente térmico entre o corpo do animal e o

ambiente, ou seja, quanto maior o gradiente maior será a dissipação de calor. Segundo esses autores, a pele mais quente do animal tende a perder calor em contato com o ar mais frio e se a temperatura do ar aumenta, diminui essa perda de calor por meio do calor sensível, aumentando a temperatura do núcleo central, assim, o organismo animal através de mecanismos evaporativos, como a sudorese e/ou frequência respiratória, aumenta a dissipação de calor insensível. Os autores também comentaram que a forma insensível de dissipação de calor é regulada pela umidade, ou seja, quanto maior a umidade ambiental será mais comprometido esse mecanismo de dissipação a partir da perda de líquido pela pele.

Se o animal não consegue dissipar calor excedente através dos mecanismos citados, a temperatura retal aumenta acima dos valores fisiológicos normais (38,3 – 39,9°C) e desenvolve-se o estresse calórico, responsável em parte pela baixa produtividade animal nos trópicos (FILHO et al., 2011). O aumento da temperatura ambiente acima daquela considerada crítica máxima para o animal (superior a 35°C) pode desencadear reações ou respostas fisiológicas, tais como o aumento da temperatura retal, da temperatura da superfície da pele e da frequência respiratória, o que leva conseqüentemente a diminuição do nível de produção e ingestão de alimentos (RIBEIRO et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros fisiológicos e as temperaturas superficiais corporais e suas variações de acordo com o peso corporal, o sexo, a idade e a cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês criados na região Norte do Rio de Janeiro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- ANIMAIS E LOCAL**

Foram utilizados 53 animais jovens (de 15 a 18 meses) e adultos (acima dos 18 meses) machos e fêmeas da raça Santa Inês, multicoloridos (malhados, chitados, lavrados, tartarugados e chuviscados) e monocoloridos (pretos e castanhos).

Os animais foram criados em sistema semi extensivo com capim- estrela-branco (*Cynodon plectostachyus* (K.Schun) Pilger) e com suplementação de ração peletizada com nível de proteína bruta de 16% (Linha ovinos - Presence Nutrição Animal®) em Campos dos Goytacazes, região Norte do Rio de Janeiro. Os parâmetros fisiológicos, temperatura superficial do corpo e os dados ambientais foram coletados no mês de fevereiro-2014, no período da tarde (13-15h).

As temperaturas ambientais como a umidade relativa do ar, temperatura do globo negro e temperatura global de bulbo úmido, durante o período experimental, foram obtidas por meio do termômetro de globo portátil modelo ITWTG-2000, podendo ser observadas na tabela 1.

**Tabela 1** Dados climatológicos do município de Campos dos Goytacazes no norte do estado do Rio de Janeiro no mês de fevereiro de 2014.

TEMPERATURA AMBIENTAL	UR (%)	T (°C)
MÉDIA MÁXIMA	76,1	27,6
MÉDIA MÍNIMA	70,1	26,3

Umidade Relativa do ar (UR), Temperatura ambiental (T).

## 2.2- PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Os parâmetros fisiológicos avaliados foram a frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR), e a temperatura retal (TR).

A temperatura retal, em °C foi mensurada por meio de termômetro clínico digital veterinário mantido no reto do animal até o disparo do sonarizador. A frequência cardíaca, em batimentos por minuto (bpm), foi obtida com a utilização de um estetoscópio, posicionado entre o terceiro e quarto espaço intercostal, auscultando-se por 15 segundos e o resultado multiplicado por quatro, obtendo-se assim a frequência em um minuto. A frequência respiratória, em incursões por minuto (ipm), foi avaliada através da observação dos movimentos respiratórios da caixa torácica do animal durante 15 segundos e o resultado multiplicado por quatro, totalizando o número de incursões por minuto.

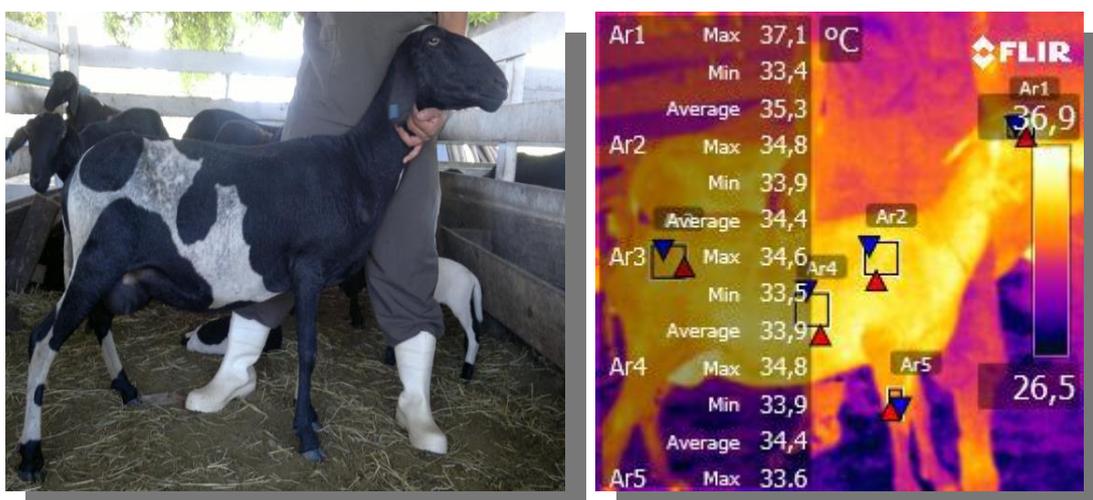
As temperaturas superficiais do corpo foram medidas do lado direito do animal, de modo a obter a temperatura corporal, na região da cernelha (TC), do olho (TO), da garupa (TG) e do joelho (TJ), avaliando assim com maior precisão a temperatura superficial corporal do animal. As temperaturas superficiais corporais foram mensuradas ao ar livre e obtidas através da câmera termográfica FLIR i50 (Figura 1) posicionada a uma distância de 1 metro de cada animal avaliado.

A severidade ao estresse térmico foi classificada de acordo com Silanokove (2000), onde foi descrito que a frequência respiratória pode quantificar a severidade do estresse ao calor, no qual uma frequência de 40-60, 60-80 e 80-120 incursões por minuto caracteriza, respectivamente, estresse baixo, médio-alto e alto para ruminantes. O estresse é considerado severo acima de 150 incursões por minuto para bovinos e 200 para ovinos.

### 2.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância das características de peso corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal para verificar os efeitos fixos de cor de pelagem, sexo e idade dos animais e as interações simples entre os efeitos (PROC GLM, SAS 2009). As médias foram comparadas pelo teste SNK.

**Figura 1** Imagem termográfica delimitando áreas corporais em ovino multicolorido da raça Santa Inês.



### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários fatores são capazes de causar variações na temperatura corporal, entre os quais estão idade, sexo, estação do ano, período do dia, exercício e ingestão de alimentos (RIBEIRO et al., 2008). As médias dos parâmetros fisiológicos para as frequências respiratórias, cardíacas e temperatura retal, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** Médias e respectivos desvios padrão para peso (Kg), frequência respiratória (ipm) (FR), cardíaca (bpm) (FC), temperatura retal (°C) (TR) de ovinos da raça Santa Inês.

EFEITOS	CARACTERÍSTICA	PESO	FC	FR	TR	Severidade ao estresse
<b>Sexo</b>	<i>Macho</i>	68,5 ± 20,5 <sup>a</sup>	125,3 ± 22,0 <sup>a</sup>	66,6 ± 22,0 <sup>a</sup>	39,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	EMA
	<i>Fêmea</i>	45,5 ± 8,0 <sup>b</sup>	104,3 ± 22,7 <sup>a</sup>	57,8 ± 19,5 <sup>a</sup>	39,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	EB
<b>Idade</b>	<i>Adulto</i>	50,7 ± 8,9 <sup>a</sup>	100,4 ± 16,9 <sup>a</sup>	58,6 ± 21,6 <sup>a</sup>	39,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	EB
	<i>Jovens</i>	37,4 ± 4,8 <sup>b</sup>	116,1 ± 29,6 <sup>b</sup>	58,1 ± 16,0 <sup>a</sup>	39,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	EB
	<i>Preto</i>	47,3 ± 8,1 <sup>a</sup>	109,1 ± 19,9 <sup>a</sup>	60,6 ± 18,8 <sup>a</sup>	39,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	EMA
<b>Cor</b>	<i>Castanho</i>	46,6 ± 7,4 <sup>a</sup>	97,7 ± 14,9 <sup>a</sup>	62,0 ± 23,6 <sup>a</sup>	39,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	EMA
	<i>Multicolorido</i>	46,4 ± 14,2 <sup>a</sup>	112,4 ± 31,0 <sup>a</sup>	52,4 ± 14,7 <sup>a</sup>	39,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	EB

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste SNK a 5%. Classificação de Severidade ao estresse térmico de acordo com Silanokove (2000): EMA (Estresse Médio Alto), EB (Estresse Baixo).

Foram achadas diferenças significativas do sexo ( $P < 0,05$ ) em relação ao peso dos animais, os machos apresentaram maior peso que as fêmeas. Segundo Santos (2007), em condições de pastejo, o peso de uma ovelha adulta varia de 40 a 50 kg e os machos podem atingir até 90 kg. A mesma variação de peso ocorre com a idade, na qual ovinos na fase adulta possuem maior peso corporal que quando jovens. Os animais avaliados não apresentaram diferenças de peso quanto a cor de pelagem ( $P > 0,05$ ).

Oliveira et al. (2005) relataram em seu trabalho uma alta tolerância da raça Santa Inês quanto ao ganho de peso devido aos múltiplos efeitos do ambiente tropical, que inclui efeitos indiretos, como baixa qualidade dos alimentos, baixo potencial genético dos animais, além do efeito direto do estresse ambiental e os

elementos climáticos como temperatura do ar, umidade e radiação solar, os quais frequentemente se encontram acima do ideal para ótimo desempenho do rebanho.

A frequência cardíaca não mostrou alterações quando comparada ao sexo, porém em relação a idade, os animais jovens apresentaram maior frequência cardíaca que os adultos. Segundo Santos et al. (2006), as frequências cardíacas e respiratórias são variáveis sujeitas a um grande número de variações devido a fatores como a temperatura ambiente, como a idade, a individualidade, o temperamento e o grau de excitação do animal. As frequências são parâmetros importantes para a verificação da adaptabilidade do animal ao estresse calórico. A cor de pelagem não influenciou a frequência cardíaca ( $P>0,05$ ) dos animais avaliados.

Cruz (2012) relata em seu trabalho que a frequência respiratória considerada normal para espécie ovina é de 16 a 34 incursões por minuto, podendo variar até 300 incursões por minuto em ovinos estressados, no qual o impacto do calor sobre as variáveis fisiológicas resulta em um aumento percentual de 194% na frequência respiratória.

Dos animais avaliados, 47% estavam sob estresse baixo, 11,3% sob estresse médio-alto e 3,77% apresentaram alto nível de estresse ao calor, sendo estes animais com cor de pelagem castanha, fêmeas com cinco anos de idade. Esses resultados corroboram com Oliveira et al. (2012) em que os ovinos da raça Santa Inês avaliados em seu trabalho estavam 23,73% sob estresse alto e 51,75% sob estresse muito alto no período da tarde. Esses dados sugerem que os animais utilizam a frequência respiratória como forma de dissipação de calor para conseguir a termorregulação.

O sexo e a cor de pelagem mostraram diferença ( $P<0,05$ ) quanto à frequência respiratória em ovinos da raça Santa Inês. Os animais machos, os pretos e os castanhos, apresentaram valores de frequência respiratória entre 60-80 incursões por minuto, o que indica um estresse calórico médio-baixo. É importante salientar que a maior parte dos animais dos rebanhos da região norte do estado do Rio de Janeiro são de coloração castanha escura ou preta. Sendo que os resultados achados no presente estudo indicaram que os animais não seriam os mais indicados para esta região quente, com alta luminosidade e radiação solar.

As fêmeas e os animais multicoloridos apresentaram valores entre 40-60 incursões por minuto indicando um baixo nível de estresse calórico. Esses valores sugerem uma adaptação dos animais multicoloridos ao estresse calórico ambiental.

Houve diferença significativa na temperatura retal ( $P < 0,05$ ) em relação ao sexo dos animais, no qual os machos apresentaram maior temperatura retal que as fêmeas. Segundo McDowell et al. (1976), citado por Cruz (2012), os ovinos apresentam temperatura retal média de aproximadamente 39,1°C a 40°C e a elevação de apenas 1°C ou menos dessa temperatura é o bastante para reduzir o desempenho das espécies de animais domésticos. Andrade et al. (2007) descreveram alterações na temperatura retal dos animais quando comparados no período da tarde com variação de aproximadamente 2°C quando comparados a outros períodos do dia.

Balieiro et al. (2003) não encontraram efeito da cor de pelagem em relação à temperatura retal e à frequência respiratória em ovelhas da raça Santa Inês de diferentes cores de pelagem (branca, vermelha e preta) sugerindo a adaptação térmica dos animais.

Nos animais deste estudo, observaram-se variações na pigmentação da epiderme, no qual os animais pretos possuíam epiderme acinzentada, os malhados apresentaram epiderme acinzentada na parte escura da pelagem e epiderme rosa na parte branca, ou seja, a pigmentação da epiderme acompanhou a pigmentação da pelagem. Os chuviscados e os chitados apresentaram epiderme rosa e os castanhos apresentaram a epiderme acinzentada clara. Essas variações na pigmentação da epiderme sugerem uma adaptação dos animais ao clima e umidade ambiental. Segundo Veríssimo et al. (2009) uma pele com pigmentação escura apresenta maior absorção da radiação solar e, portanto, armazena maior quantidade de energia térmica que uma de coloração clara que apresenta maior refletividade.

A inclusão de animais de cor branca usados como controle poderia apresentar fatores determinantes de termorregulação a partir de alterações significativas de seus parâmetros fisiológicos.

As médias das temperaturas de superfície corporal são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** Médias e respectivos desvios padrão para as temperaturas superficiais (°C) do olho (TO), cernelha (TC), garupa (TG) e joelho (TJ) em ovinos da raça Santa Inês de acordo com o sexo, idade e cor.

EFEITOS	CARACTERÍSTICA	TO	TC	TG	TJ
<b>Sexo</b>	<i>Macho</i>	36,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	34,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	34,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	33,5 ± 1,0 <sup>a</sup>
	<i>Fêmea</i>	36,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	35,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	35,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	34,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
<b>Idade</b>	<i>Adulto</i>	36,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	35,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	35,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	34,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
	<i>Jovens</i>	36,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	34,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	34,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	33,9 ± 1,1 <sup>a</sup>
	<i>Preto</i>	36,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	35,1 ± 1,0 <sup>a</sup>	34,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	34,2 ± 1,1 <sup>a</sup>
<b>Cor</b>	<i>Castanho</i>	36,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	35,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	35,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	34,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
	<i>Multicolorido</i>	36,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	34,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	34,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	34,0 ± 1,0 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK a 5%.

Observou-se maior temperatura de cernelha nas fêmeas em relação aos machos. Marai et al. (2007) observaram que o tamanho do animal, forma e superfície corporal são importantes características morfológicas para o equilíbrio térmico corporal.

Os dados observados da temperatura de cernelha, garupa e joelho nos machos avaliados são parecidos com os obtidos por Cruz (2012) que ao estudar a tolerância ao calor em ovinos reprodutores observou a temperatura de 35,01°C em cernelha, 36,78°C em garupa e 34,1 em joelho. Esses resultados sugerem uma termorregulação dos animais às altas temperaturas do norte do estado do Rio de Janeiro.

As temperaturas superficiais não foram influenciadas pela característica de peso e pelos fatores idade e cor de pelagem dos ovinos da raça Santa Inês avaliados neste trabalho. Esses resultados corroboram com Ribeiro (2008) que verificou a não variação dos valores médios em avaliações de temperatura superficial e temperatura retal em ovinos nativos como Cariri, Morada Nova, Barriga Negra e Cara Curta no estado da Paraíba, sugerindo que os animais deslanados apresentam alta capacidade de adaptação à região, com alta tolerância ao calor.

Além da cor de pelagem, outro fator importante é a espessura da mesma, Filho et al. (2011) relataram que em animais com pelagem menos espessa, como os ovinos da raça Santa Inês, a evaporação cutânea permanece praticamente inalterada à medida que a temperatura ambiente se eleva até 45°C, ao mesmo tempo em que a evaporação respiratória sobe mais rápido nas temperaturas mais

altas. Mantendo assim o animal em sua região de neutralidade ao estresse calórico ambiental por adaptação.

Segundo Tutida et al. (1999) a adaptação do ovino às condições ambientais específicas é necessária para que o animal procure seu alimento na pastagem. O conhecimento da interação ambiente-animal em qualquer tipo de exploração de animais domésticos tem grande importância para a determinação das técnicas de manejo de forma correta, o que é muito importante para se obter uma maior produtividade.

#### 4- CONCLUSÕES

A cor da pelagem não influenciou nem os parâmetros fisiológicos nem as temperaturas superficiais corporais dos ovinos avaliados.

A frequência respiratória, quantificada pela severidade do estresse ao calor seria o parâmetro que afeta a termorregulação dos ovinos da raça Santa Inês do Norte do estado do Rio de Janeiro, especialmente nos machos de cor preta ou castanha.

#### 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, I. S. et al. Parâmetros fisiológicos e desempenho de ovinos Santa Inês submetidos a diferentes tipos de sombreamento e a suplementação em pastejo. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 540-547, mar./abr., 2007.

BALIEIRO, J.C.C.; PRADO, M.D.; ALKMIN, L.H.F.; IVO, M.A.; MARTINELLI, D.Z.; SILVA, A.R. Análise de algumas variáveis fisiológicas em ovinos da raça Santa Inês submetidos ao estresse calórico na região da Mantiqueira paulista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 13, 2003, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: SBA, 2003.

CRUZ C. A. J. **Tolerância ao calor em ovinos reprodutores criados no Distrito Federal**. 2011. 95 f. il. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Brasília, Brasília, 2012.

FILHO A. E., TEODORO S. M., CHAVES M. A., SANTOS P. E. F., SILVA M. W. R., MURTA R. M., CARVALHO G. G. P., SOUZA L. E. B. Zona de conforto térmico de ovinos da raça Santa Inês com base nas respostas fisiológicas. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.8, p.1807-1814, 2011.

MARAI I.F.M., EL-DARAWANY, A.A., FADIEL, A., *et al.* Physiological traits as affected by heat stress in sheep - A review. **Small Ruminant Research**, v.71, p.1-12. 2007.

NEVES M. L., MENEZES W. **Índices de conforto térmico para ovinos Santa Inês de diferentes cores de pelame em condições de pastejo**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Área: Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia. Orientador: Marcílio de Azevedo. 2008.

OLIVEIRA et al. Parâmetros de conforto térmico e fisiológico de ovinos Santa Inês, sob diferentes sistemas de acondicionamento. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, Campina Grande, v.9, n.4 , p.631-635, 2005.

OLIVEIRA R. V., XIMENES F. H. B., MENDES C. Q., FIGUEIREDO C.R. R., F. PASSOS. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. CODEVASF. Brasília-DF: 2011.

OLIVEIRA E. M. B., PERES M. C. R., LIMA F. G., LOUVANDINI H., PAIVA S. R., McMANUS C. Tolerância ao calor em ovinos criados no Estado de Goiás. **IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**. João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012.

QUESADA M., MCMANUS C., COUTO F. A. D. Tolerância ao calor de duas raças de ovinos deslanados no Distrito Federal. **Rev. Bras. Zootec.**, 30(3):1021-1026, 2001.

RIBEIRO N. L., FURTADO D. A., MEDEIROS A. N., RIBEIRO M. N., SILVA R. C.B., SOUZA C. M. S. Avaliação dos índices de conforto térmico, parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de ovinos nativos. **Eng. Agríc., Jaboticabal**, v.28, n.4, p.614-623, out./dez. 2008.

SANTOS J. R. S., SOUZA B. B., SOUZA W. H., CEZAR M. F., TAVARES G. P. Physiologic responses and thermal variation of Santa Inês, Morada Nova sheep and their crossbreed with Dorper breed to the semi-arid northeastern of Brazil. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 995-1001, set./out., 2006.

SANTOS, R. **Santa Inês: a raça fundamental**. Editora Agropecuária Tropical Ltda: 2007. Uberaba-MG.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**. v. 67, p. 1-18, 2000.

TUTIDA, L., BARBOSA O. R., MARTINS E. N., MACEDO F. A. F., ROMAN M. J. R., SIMONELLI S. M. Influência das Estações do Ano na Temperatura Retal e Frequência Respiratória de Carneiros. **Rev. bras. zootec.**, v.28, n.5, p.1133-1140, 1999.

VERÍSSIMO C. J., TITTO C. G., KATIKI L. M., BUENO M. S., CUNHA, E. A., MOURÃO G. B., OTSUK I. P., PEREIRA A. M. F., FILHO J. C. M., TITTO E. A. L. Tolerância ao calor em ovelhas Santa Inês de pelagem clara e escura. **Rev. Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.159-167, jan/mar, 2009.

## POLIMORFISMOS DO GENE MC1R RESPONSÁVEL PELA VARIAÇÃO NA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever a variação em três locus do gene MC1R, uma vez que este gene é responsável por variações na cor de pelagem dos mamíferos. Foram utilizados 121 animais da raça Santa Inês, multicoloridos e monocoloridos,. O DNA foi extraído dos bulbos de pelos coletados da porção final da cauda dos animais. A genotipagem dos três SNPs foi realizada a partir da reação em cadeia de polymerase-restrição de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP) avaliada com as enzimas de restrição, (AciI, NlaIII e BmgBI) no gene MC1R. A identificação dos alelos foi realizada pela eletroforese capilar. As frequências alélicas e a taxa de heterozigose foram obtidas a partir dos programas GENEPOP 3.4 e ARLEQUIM, respectivamente. Verificou-se que o genótipo homozigoto para o alelo selvagem (sem o SNP) foi de 75% no *locus* Aci1-MC1R e 25% para heterozigoto, com apenas um cromossomo apresentando SNP (mutante). A frequência do alelo mutante nesse *locus* foi de 12,6%. O *locus* Nla1-MC1R apresentou 37% do genótipo homozigoto selvagem, 23% do genótipo homozigoto mutante e 40% do genótipo heterozigoto, com a frequência de 42,8% para o alelo mutante. O *locus* Bmg3-MC1R apresentou 20% do genótipo homozigoto selvagem, 12% do genótipo homozigoto mutante e 68% do genótipo heterozigoto, com a frequência de 45,8% para o alelo mutante. Para a realização das associações dos fenótipos aos genótipos foi utilizado o programa Prism 6 for Mac OS X, no qual para os alelos do *locus* Aci1-MC1R, em que o alelo (T) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (CT) aumenta em 10.76 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto ( $p < 0,0001$ ). No *locus* Nla1-MC1R, o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (TT) aumenta em 4,688 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0016$ ). E no *locus* Bmg3-MC1R, em que o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (AG) aumenta em 19,92 vezes a probabilidade de

serem multicoloridos ( $p < 0,0001$ ). As mutações alélicas nos *locus* estudados indicariam a presença de variabilidade da cor de pelagem dos animais avaliados.

Palavras-chaves: cor de pelagem, heterozigose, homozigose, mutação

## GENE POLYMORPHISMS OF MC1R RESPONSIBLE FOR VARIATION IN COAT COLOR IN THE SANTA INÊS SHEEP

### ABSTRACT

The objective of this study was to describe the variation in three MC1R locus gene targeting studies in correlation phenotypes (color coat), since this gene is responsible for variations in coat color in mammals. Were used 121 animals of breed Santa Inês, multicolored and monocolored, created in the São Paulo state, north of the Rio de Janeiro state and southern of Espírito Santo state. The DNA was extracted from the hair follicle collected in the final portion of the tail. The genotyping of three Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) evaluated with restriction enzymes, (AciI, NlaIII and BmgBI) in the MC1R gene. The identification of alleles was made by capillary electrophoresis in advanCE FS96 equipment (Advanced Analytical). The allele frequency and heterozygosity rate were described from GENEPOP 3.4 and HARLEQUIN programs, respectively. It was shown that the homozygous genotype for the allele without SNP (wild) was 75% in Aci1-MC1R *locus* and 25% heterozygous, with only one chromosome presenting the SNP (mutated). The frequency of the mutant allele in this *locus* was 12.6%. The Nla1-MC1R *locus* showed 37% of the wild homozygous genotype, 23% of homozygous mutant genotype and 40% of the heterozygous genotype, with the frequency of 42.8% for the mutant allele. The Bmg3-MC1R *locus* showed 20% of the wild homozygous genotype, 12% of homozygous mutant genotype and 68% of the heterozygous genotype, with the frequency of 45.8% for the mutant allele. To carry out the associations of phenotypes to genotypes was used Prism 6 program for Mac OS X where to alleles of the MC1R locus Aci1-MC1R, where the allele (T) is associated with the color black coat, the genotype (CT) increases by 10,76 times the likelihood of the animal having the black ( $p < 0,0001$ ). In Nla1-MC1R *locus* allele (A) is

associated with the black coat color, the genotype (TT) increases by 4,688 times the likelihood of multicolor ( $p < 0,0016$ ). And Bmg3-MC1R locus where the allele (A) is associated with the black coat color, the genotype (AG) 19,92 times in the likelihood of multicolor ( $p < 0,0001$ ). Allelic mutations have been described in the studied locus that would indicate the presence of the color coat variability of animals evaluated.

Keywords: coat color, heterozygous, homozygous, mutation

## 1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes. Essa amplitude se deve principalmente ao poder de adaptação dos ovinos aos diferentes climas, relevos e vegetações. Sendo assim, sua criação é destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

Os ovinos da raça Santa Inês por serem naturalizados no Brasil e provenientes do cruzamento de duas diferentes raças, apresentam variações na cor de pelagem (OLIVEIRA, et al. 2011).

Segundo Santos (2007), a raça Santa Inês possui dois tipos de pelagens básicas que incluem todas as possíveis variações: a *Monocolorida ou coloração única*, que varia desde a branca-suja à negra. Destacam-se a coloração “pelo-de-boi” (ou castanha), a vermelha e a negra; e a *Multicolorida*: com manchas escuras sobre um fundo claro, mas também são comuns animais com fundo escuro e manchas claras (malhada, tartarugada, lavrada, chitada, chuviscada).

Devido à presença das variações da cor de pelagem, a raça Santa Inês é um modelo interessante para avaliar os efeitos de polimorfismos dos genes que interferem nessa característica fenotípica. De forma que a base genética do padrão da cor recessiva da pelagem em ovinos é ainda pouco compreendida.

A herança da cor da pelagem em mamíferos tem sido estudada principalmente a partir de uma perspectiva qualitativa, em que os fenótipos são definidos por categorias distintas (louro, preto, marrom, cinza, etc.) e são controlados por poucos genes que mostram uma relação epistática de herança. Entretanto, a variação cor da pelagem é afetada por um grande número de genes. Por exemplo, foram identificados 127 genes responsáveis pela variação da cor de pelagem em ratos e cerca de 59 desses genes foram relacionados a mutações determinantes dessas variações, sendo recentemente clonados molecularmente (TOTH et al., 2014).

Toth et al. (2014) relatou em seu trabalho que as informações genéticas sobre a pigmentação nos pelos dos mamíferos são bastante complexas, exibindo assim características quantitativas, bem como qualitativas.

A cor da pelagem em mamíferos depende, basicamente, da quantidade relativa dos dois tipos básicos de tirosina derivada de melanina: eumelanina (coloração escura) e feomelanina (coloração clara) (ROYO et al., 2008).

Dos diversos *locos* gênicos envolvidos na pigmentação, dois deles são os principais responsáveis pela ampla variedade de coloração em mamíferos: o *Receptor de Melanocortina-1 (MC1R)* e a *Proteína Sinalizadora de Agouti (ASIP)*, os quais eram originalmente conhecidos como *agouti* e *extension* quando identificados por estudos com camundongos. Ambos apresentam um papel essencial na regulação da síntese de melanina durante o desenvolvimento do pelo (SCHNEIDER, 2013).

A coloração preta da pelagem em ovelhas é dominante e tem sido relatada por uma extensão alélica, transportando o p.M73K e p.D121, que indica alterações na sequência de codificação do gene MC1R (ROYO et al., 2008).

A variabilidade da cor da pelagem é influenciada pelos genes MC1R e ASIP, cujos produtos interagem na regulação da produção de melanina. Foi relatado por Schneider (2013) que os fenótipos melânicos em camundongos frequentemente se devem a mutações dominantes associadas com a proteína MC1R super ou constitutivamente ativa ou a mutações de herança recessiva causando a perda parcial ou total da função da proteína ASIP. Ou seja, exacerbação da função do MC1R ou perda da função do ASIP induzem o melanismo.

O gene MC1R codifica um receptor acoplado a proteína G contendo sete hélices transmembranas e é expresso em melanócitos da pele, folículos pilosos e em células do sistema imune. Ao se ligar ao hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH), o MC1R ativa a síntese de AMP cíclico (cAMP) intracelular induzindo a síntese de eumelanina (pigmento escuro: preto, marrom). A ativação do MC1R é inibida pelo gene ASIP, que impede sua ativação pelo  $\alpha$ -MSH e, assim, induz a troca da síntese de eumelanina para feomelanina (pigmento claro: amarelo, avermelhado) (BARRETT, 2012).

Ganhos e perdas de funções devido as mutações do gene MC1R como: determinantes de dominância para cor de pelagem preta/escuro e determinantes de recessividade para cor de pelagem amarela ou parcialmente recessivo para cor vermelho/branco, têm sido descritos num grande número de mamíferos, como por exemplo, ratos, humanos, gado, suínos, cavalos, cães, gatos, coelhos e caprinos (FONTANESI et al., 2009) .

Em ovinos, estudos genéticos identificaram na raça Missense em regiões da Toscana e Emilia Romagna, na Itália, dois alelos causados por duas mutações no gene MC1R (p.M73K e p.D121N) que também estão presente nas raças Dala noruegues, Corriedale, Damara, Preto Merino, Black Castellana e Karakul e o tipo selvagem (E1) que é um alelo amplamente distribuído na maioria das raças. Uma outra mutação no gene MC1R (p.R67C) na raça Valle del Belice também foi descrita (FONTANESI et al., 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a intensidade da correlação entre os alelos selvagens e mutantes nos três SNPs avaliados no gen MC1R responsável pela variação na cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês criados no Norte do estado do Rio de Janeiro e Sul do estado do Espírito Santo e São Paulo.

São cada vez maiores as contribuições da genética molecular para o melhoramento genético dos ovinos e conseqüentemente na produção de carne ovina no Brasil. Uma vez que as biotecnologias aplicadas a esses animais desencadeiam inúmeras e reais possibilidades de melhora eminente da ovinocultura brasileira.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- ANIMAIS E AMOSTRAS**

Foram utilizados 121 animais jovens (de 15 a 18 meses) e adultos (acima dos 18 meses) machos e fêmeas da raça Santa Inês, multicoloridos (malhados, chitados, lavrados, tartarugados e chuviscados) e monocoloridos (pretos e castanhos) pertencentes a criadores localizados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo.

Para as amostras de fonte de DNA foram coletados pelos dos animais da porção final da cauda. Os pelos após coletados foram avaliados em microscópio óptico, sendo selecionados apenas os que estejam com os bulbos pilosos íntegros.

## 2.2- EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA das amostras de pelo foi realizada utilizando 10 bulbos dos pelos coletados de cada animal. Esses bulbos foram cortados e colocados em tubos de 1,5 ml onde ocorrerá a reação de extração de DNA.

A reação de extração dos materiais provenientes dos pelos teve início com uma solução de lise, constituída por 200mM de NaOH. Foram adicionados 50 µl da solução de lise em cada tubo contendo os bulbos. Para separar as possíveis células ainda presas ao pelo, essa mistura foi levemente agitada com auxílio da pipeta. Um aquecimento de 96°C por 15 minutos sucede essa etapa, com isso as membranas celulares são desnaturadas. Posteriormente, é efetuada uma centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto, a qual permite a separação do DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a lise celular, estarão dispersas na solução. Finalmente, para que a atividade da primeira solução (solução de lise) não continue em ação, deverão ser adicionados 50 µl de uma solução neutralizante, composta de 200mM de HCL e 100mM de Tris HCL, como consequência também é reduzido o pH de toda a reação, aproximando-se ao pH neutro.

## 2.3- TÉCNICA DE PCR E GENOTIPAGEM DOS LOCOS MUTANTES

A PCR\_RFLP foi usada para genotipar mutações no gene MC1R, o qual está relacionado com a variação de cor de pelos em ovinos.

Para a amplificação do gene MC1R foram utilizados os *primers* 1-MC1R e 3-MC1R, descritos por Fontanesi *et al.* (2012) a partir de publicações das sequências do gene MC1R em ovinos, bovinos e caprinos (GenBank números: AF445641, Y13965 e FM212940).

Cada reação de amplificação foi realizada com um volume de 20 µl por reação, utilizando tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], dNTPs (500 µM de cada), MgCl<sub>2</sub>, *Taq* DNA polimerase (0,5 U), um par de *primers* (1 µM de cada *primer*), água deionizada, e uma amostra de 2,5 µl do conteúdo obtido da extração

do DNA do pelo. As concentrações de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) foram otimizadas individualmente obtendo o valor de 1,5 mM para cada loco.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador e terá como passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo foi estabelecido um tempo de 30 segundos para a desnaturação da dupla fita a 94°C, 60 segundos para o anelamento dos *primers*, e 60 segundos para a síntese da nova fita a 72°C. Após o último ciclo, as reações foram submetidas a um passo final de 5 minutos a 72°C para a extensão final das fitas. O tamanho dos fragmentos amplificados e as temperaturas de anelamento dos *primers* estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1** Primers, condições de PCR, PCR-RFLP, genotipagem e nomenclatura dos *locus* mutantes.

Primers	Forward e reverse primers (5'–3')	PCR	PCR-RFLP	Locus	Área de mutação
<b>1-MC1R</b>	agtgacctggagggtgccatcc	54/35/169	Acil (c. 199 C>T)	Aci1-MC1R	R67C
	ctgacgctcaccagcaagt		NlaIII (c. 218 A>T)	Nla1-MC1R	M73K
<b>3-MC1R</b>	gtgagcgtcagcaacgtg	65/35/365	BmgBI (c. 361	Bmg3-MC1R	D121N
	acatagaggacggccatcag		G>A)		

PCR (Temperatura de anelamento (°C), Número de ciclos, Tamanho dos fragmentos amplificados (pb); PCR-RFLP (Enzima utilizada, Local da mutação); Locus (Nome dado ao *locus* mutante estudado).

Alíquotas de 10 µl das amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% com 20 centímetros de tamanho para uma corrida extensa com o objetivo de separar fragmentos de DNA que possam diferir por uma pequena quantidade de pares de banda. Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de peso molecular (25pb e 100pb) para a comparação dos tamanhos dos fragmentos obtidos. A coloração dos géis de poliacrilamida foi executada mergulhando-os em uma solução fixadora (100ml de Etanol, 5ml de Ácido Acético e 895ml de água destilada) por 5 minutos. Depois, foram adicionados 50ml de solução de Nitrato de Prata (0,2g de Nitrato de Prata e 50ml de Água destilada) por 10 minutos. As soluções foram descartadas, o gel lavado com água destilada por 2 minutos. Por fim, o gel foi mergulhado na solução

Reveladora (30g NaOH, 5ml de Formol e aproximadamente 900ml de Água) até que as bandas do gel correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados apareçam.

Após o uso PCR foi feita a PCR-RFLP, no qual o produto da PCR foi clivado com enzima de restrição que reconhecem as sequencias das mutações, caracterizando os *locus* mutantes (Tabela 1).

O produto da clivagem com enzima de restrição foi visualizado em acrilamida e em seguida submetido à eletroforese capilar no equipamento AdvanCE FS96 (Advanced Analytical). A genotipagem dos alelos foi realizada nos softwares GenScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems.

A partir da eletroforese capilar foram determinados três genótipos diferentes para cada *locus* mutante:

- *Locus* Aci1-MC1R: os fragmentos de DNA observados após a clivagem da enzima AciI apresentaram 16, 71, 82 e 87pb. O *genótipo selvagem* determinado pelas letras (CC) possuindo fragmentos de DNA de 16, 71 e 82 bp, os *heterozigotos* (CT) – 16, 71, 82 e 87pb e o *genótipo homozigoto para o alelo mutante* (TT) – 82 e 87pb;

- *Locus* Nla1-MC1R: os fragmentos de DNA observados após a clivagem da enzima NlaIII apresentaram 23, 27, 119 e 146 pb. O *genótipo selvagem* (AA) possuindo fragmento de DNA de 23 e 146pb, os *heterozigotos* (AT) – 23, 27, 119 e 146 pb e o *genótipo mutante* (TT) – 23, 27 e 119pb;

- *Locus* Bmg3-MC1R: após a clivagem da enzima BmgBI foram observados fragmentos de DNA de 105 e 260pb para o *genótipo selvagem* (GG), os *heterozigotos* (AG) – 105, 260 e 365pb e para o *genótipo mutante* (AA) não haverá clivagem, ou seja, mantém-se o tamanho inicial do fragmento de DNA – 365pb.

## 2.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 2.4.1- Frequências alélicas

As frequências alélicas ( $x_i$ ) de cada *locus* em cada amostra foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), segundo as equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

Em que:

$x_i$  é a frequência do alelo  $i$ ;

$n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo  $i$ , respectivamente;

$n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

### 2.4.2- Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Em que:

$x_i^2$  é a frequência esperada dos homozigotos do alelo  $i$ ;

$2 x_i x_j$  é a frequência esperada do heterozigoto  $ij$ ;

$2x_j^2$  é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

A aderência das frequências genóticas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o emprego do programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

### 2.4.3- Diversidade Gênica

#### Heterozigose média

A diversidade gênica média com o respectivo erro padrão foi calculada para cada amostra por *locus*, utilizando o programa ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 2000) conforme a equação 8.6 apresentada por Nei (1987):

$$H = \sum_{j=1}^r h_j / r$$

Em que:

$r$  é o número de loci utilizados;

$h_j$ , de acordo com a equação 8.1 de Nei (1987), é a heterozigose esperada para cada *locus* na  $j$ -ésima população, estimada por:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Em que:

$m$  é o número de alelos.

Esta medida de heterozigose média é equivalente à proporção média de heterozigotos por *locus* em uma população com padrão de acasalamento aleatório

e, também, é igual à proporção de *loci* heterozigotos em um indivíduo escolhido aleatoriamente. O desvio padrão dessa estimativa é descrito pela seguinte equação adaptada (NEI, 1987):

$$H = \left[ \sum_{j=1}^r h_j - H \right)^2 / (r - 1)r \right]^{1/2}$$

#### **2.4.4- Associações de Fenótipos aos Genótipos**

Para a verificação da existência de associações entre alelos ou genótipos de um determinado fenótipo, foi utilizado o Teste de Fisher, empregando-se o programa Prism 6 for Mac OS X (GraphPad Software, 2014). O Prism 6 for Mac OS X foi também empregado para determinar o tamanho desta associação por meio do cálculo de *Odds Ratio* e seu intervalo de confiança de 95%.

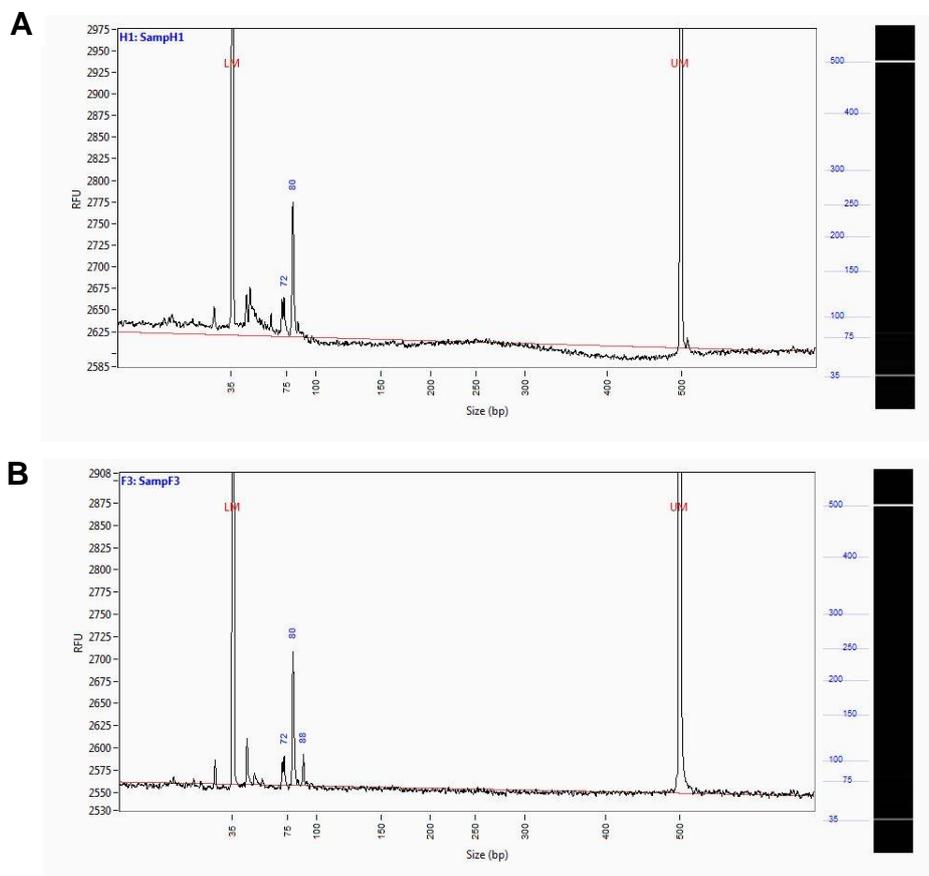
O *Odds Ratio* corresponde na razão entre a probabilidade de um indivíduo apresentar um determinado fenótipo quando possuir um determinado alelo/genótipo e a probabilidade de um indivíduo não apresentar o fenótipo quando possuir o mesmo alelo/genótipo. Esse parâmetro é apropriado para estudos de associação e representa o risco de um animal apresentar o fenótipo considerado dado que possua o alelo/genótipo em questão. Por exemplo, um *Odds Ratio* igual a 10 significa que o fenótipo considerado ocorre com frequência de 10 vezes maior em indivíduos que apresentem o alelo, genótipo ou fenótipo em questão do que em indivíduos que não os apresentem.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- ALELOS

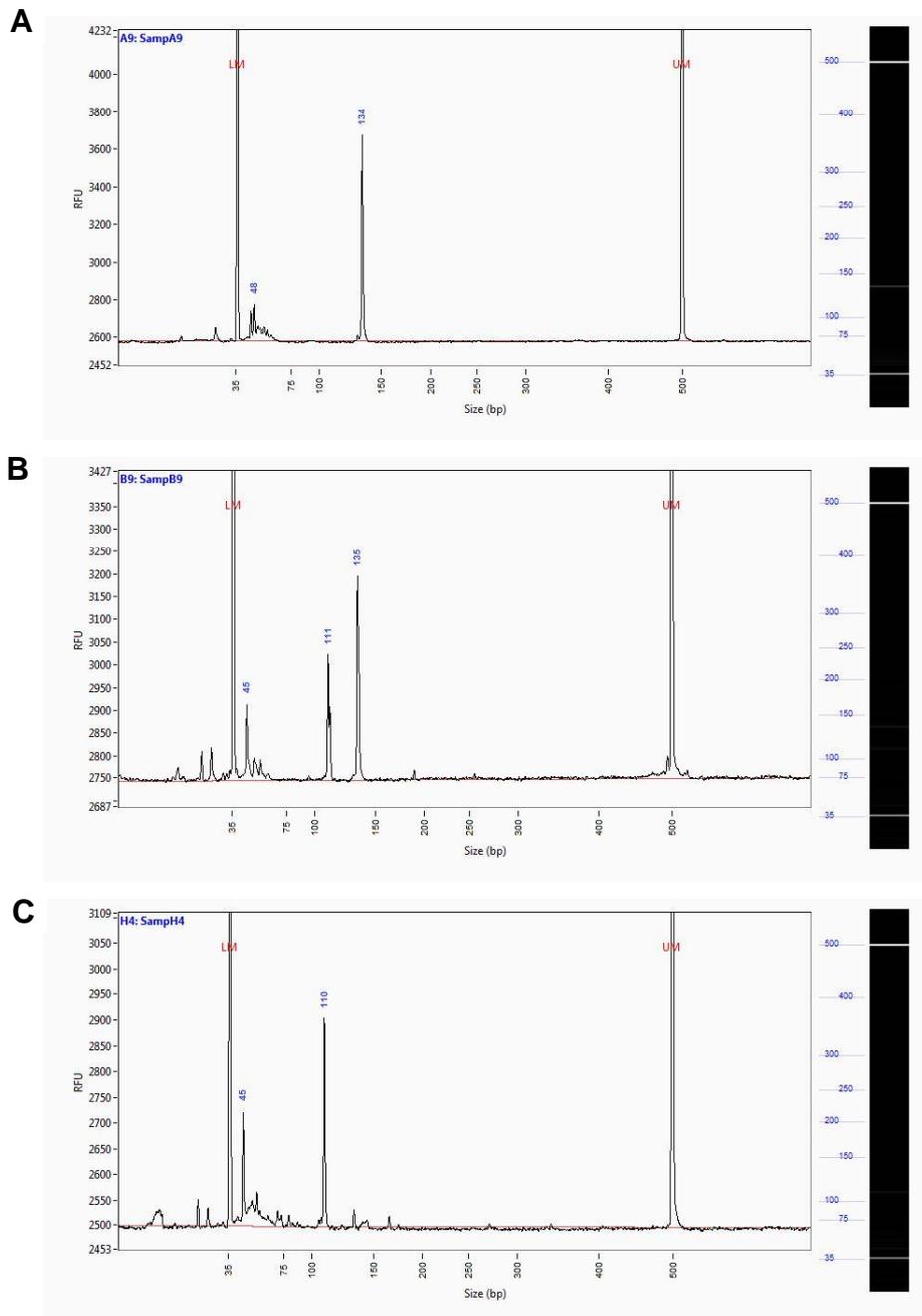
Os alelos para os *locus* em estudos estão exemplificados nas figuras 1, 2 e 3. No *locus* Aci1-MC1R foi encontrado fragmentos de 72, 80 e 88pb, no *locus* Nla1-MC1R fragmentos de 111 e 134 pb e no *locus* Bmg3-MC1R fragmentos de DNA de 107, 260 e 372pb. Dessa forma, caracterizando os indivíduos como homozigotos para o alelo selvagem ou mutantes e heterozigotos. Os fragmentos de DNA que continham menos de 35pb não foram demonstrados nas análises, uma vez que o marcador utilizado variava de 35 – 500pb.

**Figura 1** Alelos do *locus* Aci1-MC1R.



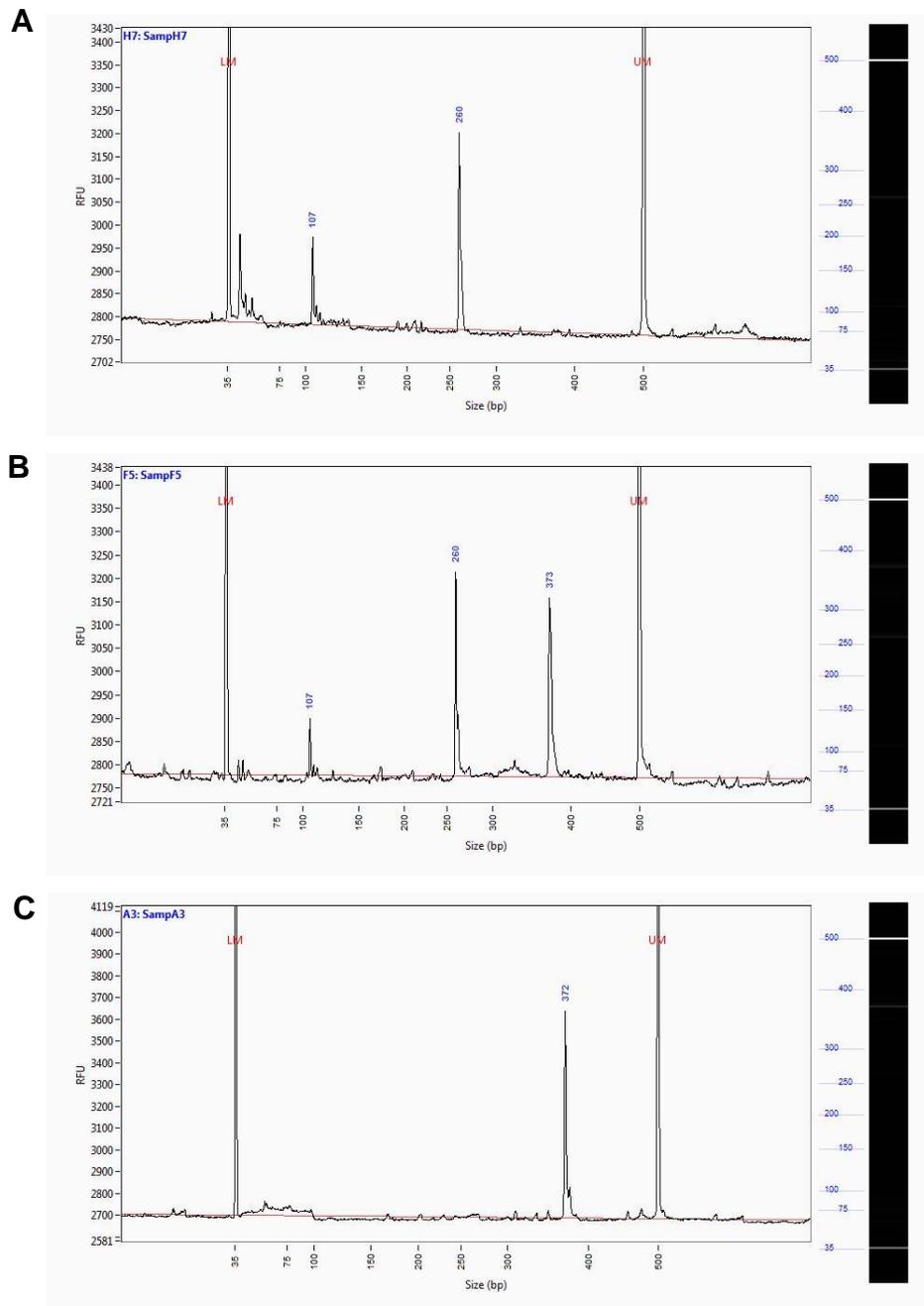
**(A)** Genótipo homozigoto para o alelo selvagem (CC); **(B)** Heterozigoto (CT).

Figura 2 Alelos para o *locus* Nla1-MC1R.



(A) Genótipo homozigoto para o alelo selvagem (AA); (B) Heterozigoto (AT); (C) Genótipo homozigoto para o alelo mutante (TT).

**Figura 3** Alelos para o *locus* Bmg3-MC1R.



**(A)** Genótipo homocigoto para o alelo selvagem (GG); **(B)** Heterocigoto (AG); **(C)** Genótipo homocigoto para o alelo mutante (AA).

### 3.2- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E HETEROZIGOSE

A tabela 2 descreve a frequência dos genótipos selvagens e mutantes, além dos heterozigotos.

**Tabela 2** Frequência Genotípica (%) dos *locus* Aci1-MC1R, Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R.

Genótipos / Locus	HS	HT	HM
<b>Aci1-MC1R</b>	0,75	0,25	0
<b>Nla1-MC1R</b>	0,37	0,4	0,23
<b>Bmg3-MC1R</b>	0,2	0,68	0,12

Homozigotos Selvagens (HS), Heterozigotos (HT) e Homozigotos Mutantes (HM).

O genótipo homozigoto para o alelo selvagem foi o mais comum no *locus* Aci1-MC1R. Nesse mesmo locus, não foi encontrado o genótipo homozigoto para o alelo mutante, e conseqüentemente apresentou uma menor diversidade genética desse *locus*, devido à baixa frequência do alelo mutante (T) e a alta frequência do alelo selvagem (C). Esse resultado sugere que a baixa frequência do alelo (T) condiz com a ocorrência de um alelo mutante em evidencia. Esses resultados corroboram com Fontanesi *et al.* (2010) que demonstraram em seu trabalho a existência de 63,6% de homozigotos para o alelo selvagem e 30,1% para os heterozigotos em ovelhas da raça Valle del Belice para esta mutação.

Nos *locus* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R houve a ocorrência do genótipo homozigoto para o alelo mutante. Entretanto, o *locus* Nla1-MC1R apresentou uma maior frequência de genótipos homozigotos (AA) para o alelo selvagem enquanto o *locus* Bmg3-MC1R apresentou uma maior frequência no genótipo heterozigoto (AG). Royo (2014) quando estudou a cor de pelagem em raças puras de cavalos espanhóis verificou que as variações de cores poderiam ocorrer por diferentes combinações genotípicas a partir de variações alélicas no gen MC1R.

As frequências alélicas e a diversidade gênica dos *locus* estudados estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3** Frequência Alélica (%) e Heterozigose / Diversidade Gênica (%) dos *locus* Aci1-MC1R, Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R.

Alelos / Locus	AS	AM	H
<b>Aci1-MC1R</b>	0,874	0,126	0,2211
<b>Nla1-MC1R</b>	0,572	0,428	0,4921
<b>Bmg3-MC1R</b>	0,542	0,458	0,4978

Alelo Selvagem (AS), Alelo Mutante (AM) e Heterozigose / Diversidade Gênica (H).

A frequência do alelo selvagem foi maior no *locus* Aci1-MC1R, entretanto a diversidade gênica deste *locus* é baixa devido a ausência do genótipo homozigoto mutante.

Existe uma grande semelhança nas frequências alélicas e na diversidade gênica dos *locus* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R. Ambos apresentam uma taxa de heterozigose mais elevada que o *locus* Aci1-MC1R. Esse fato pode ser devido a ocorrência do genótipo homozigoto para o alelo mutante descrito nestes dois *locus*, uma vez que a frequência do alelo mutante é mais elevada aumentando assim a diversidade gênica. Fontanesi *et al.* (2010) também descreve a ocorrência das três mutações em estudo com ovelhas da raça Massese.

### 3.3- EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Os resultados do teste de desequilíbrio de ligação mostraram que os *locus* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R estão em equilíbrio, pois apresentaram valores de  $P < 0,05$ . Apenas o *locus* Aci1-MC1R encontra-se em desequilíbrio ( $P > 0,05$ ;  $P = 0,211$ ). Foi demonstrado ainda, através do programa GENEPOP versão 3.4, que esse desequilíbrio é causado pelo excesso de heterozigotos ( $P = 1$ ), uma vez que a grande maioria dos indivíduos é heterozigota, além de não terem sido encontrados indivíduos homozigotos para o alelo (T) que descreveria o genótipo homozigoto para o alelo mutante.

### 3.4- ASSOCIAÇÕES FENÓTIPO-GENÓTIPO

Foram avaliadas as associações entre fenótipos e genótipos, representadas pelos valores obtidos da significância pelo teste exato de Fisher bicaudal e seus valores de *Odds Ratio*. As tabelas 4 e 5 possuem as características fenotípicas (cor da pelagem) separadas por *locus*, usadas nas análises com objetivo de avaliar a presença da associação.

**Tabela 4** Associação alélica dos *locus* Aci1-MC1R (1), Nla1-MC1R (2) e Bmg3-MC1R (3) em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês.

COR	<i>Locus</i>	Alelo	Teste exato de Fisher bicaudal	Odds Ratio	IC 95%
Preto	1	C	< 0,0001 *	0,1232	0,04110 a 0,3693
Preto	1	T	< 0,0001 *	8,118	2,708 a 24,33
Castanho	1	C	0,011 *	5,674	1,304 a 24,69
Castanho	1	T	0,011 *	0,1763	0,04050 a 0,7670
Multicolorido	1	C	0,031 *	4,698	1,077 a 20,49
Multicolorido	1	T	0,031 *	0,2129	0,04879 a 0,9286
Preto	2	A	< 0,0001 *	4,176	2,388 a 7,305
Preto	2	T	< 0,0001 *	0,2394	0,1369 a 0,4188
Castanho	2	A	0,0256 *	0,5003	0,2796 a 0,8952
Castanho	2	T	0,0256 *	1,999	1,117 a 3,577
Multicolorido	2	A	0,0007 *	0,3407	0,1845 a 0,6293
Multicolorido	2	T	0,0007 *	2,935	1,589 a 5,421
Preto	3	G	0,05 *	0,5869	0,3500 a 0,9843
Preto	3	A	0,05 *	1,704	1,016 a 2,858
Castanho	3	G	0,0013 *	2,718	1,474 a 5,013
Castanho	3	A	0,0013 *	0,3679	0,1995 a 0,6786
Multicolorido	3	G	0,3627	-	-
Multicolorido	3	A	0,3627	-	-

Intervalo de Confiança (IC); (\*) Valores significativos  $p < 0,05$ ; (-) Valores não avaliados por falta de significância pelo teste exato de Fisher.

No *locus* Aci1-MC1R o alelo (T) foi associado a cor de pelagem preta, enquanto que o alelo (C) foi associado a cor de pelagem castanha e multicolorida. Essas associações foram percebidas de acordo com os valores do *Odds Ratio*, na qual o alelo (T) aumenta em 8,118 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto

com  $p < 0.0001$  de significância pelo teste exato de Fisher, o alelo (C) aumenta em 5,674 a probabilidade de ter pelo castanho ( $p < 0,011$ ) e também, aumenta em 4,698 a probabilidade dos ovinos terem pelos multicoloridos ( $p < 0,031$ ). Este *locus* apresentou um intervalo de confiança muito extenso por variar de 1 a 24, esse fato pode ser devido ao tamanho amostral.

Schneider *et al.* (2012) relatam em seu trabalho que as variações na cor de pelagem em mamíferos tem tido muitos exemplos de sucessos nas identificações de mutações que indicam melanismo. Comentam ainda que, em geral essas variações ocorrem nos genes MC1R e ASIP, que foram associados com a cor de pelagem preta em fenótipos de populações de animais domésticos.

No *locus* Nla1-MC1R o alelo (A) foi associado a cor de pelagem preta, enquanto que o alelo (T) foi associado a cor de pelagem castanha e multicolorida. Nos valores do *Odds Ratio*, o alelo (A) aumenta em 4,176 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto ( $p < 0.0001$ ), o alelo (T) aumenta em 1,999 a probabilidade de ter pelo castanho ( $p < 0,0256$ ) e também aumenta em 2,935 a probabilidade dos ovinos estudados terem pelos multicoloridos ( $p < 0,0007$ ).

No *locus* Bmg3-MC1R o alelo (A) foi associado a cor de pelagem preta e o alelo (G) foi associado a cor de pelagem castanha. De acordo com os valores do *Odds Ratio* e a significância pelo teste exato de Fisher, o alelo (A) aumenta em 1,704 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto com  $p < 0.05$  de significância e o alelo (G) aumenta 2,718 a probabilidade dos ovinos da raça Santa Inês terem pelos castanhos ( $p < 0,0013$ ).

A regra fundamental da evolução é o processo de evolução natural e genético, de forma a manter a variabilidade em uma população. Exemplos de fenótipos e genótipos são relatados a partir da biologia molecular, e relatos em que ovelhas com diferentes cores de pelagem são mais suscetíveis a alterações climáticas que as de coloração preta, tem sido observado (GRATTEN *et al.*, 2010).

A tabela 5 mostra a associação genotípica dos *locus* estudados quanto a as características fenotípicas de cor de pelagem.

**Tabela 5** Associação genotípica dos *locus* Aci1-MC1R (1), Nla1-MC1R (2) e Bmg3-MC1R (3) em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês.

COR	<i>Locus</i>	Genótipo	Teste exato de Fisher bicaudal	Odds Ratio	IC 95%
Preto	1	CC	< 0,0001 *	0,09295	0,02949 a 0,2930
Preto	1	CT	< 0,0001 *	10,76	3,413 a 33,91
Preto	1	TT	1	-	-
Castanho	1	CC	0,0064 *	6,681	1,483 a 30,10
Castanho	1	CT	0,0064 *	0,1497	0,03322 a 0,6743
Castanho	1	TT	1	-	-
Multicolorido	1	CC	0,0207 *	5,444	1,203 a 24,64
Multicolorido	1	CT	0,0207 *	0,1837	0,04059 a 0,8315
Multicolorido	1	TT	1	-	-
Preto	2	AA	0,0039 *	3,294	1,504 a 7,214
Preto	2	AT	0,1938	-	-
Preto	2	TT	< 0,0001 *	0,02618	0,003394 a 0,2020
Castanho	2	AA	0,2084	-	-
Castanho	2	AT	0,5273	-	-
Castanho	2	TT	0,0235 *	3,043	1,216 a 7,613
Multicolorido	2	AA	0,0455 *	0,3432	0,1272 a 0,9264
Multicolorido	2	AT	0,5189	-	-
Multicolorido	2	TT	0,0016 *	4,688	1,832 a 11,99
Preto	3	GG	0,1692	-	-
Preto	3	GA	0,8438	-	-
Preto	3	AA	0,0204 *	4,807	1,266 a 18,26
Castanho	3	GG	< 0,0001 *	9,059	3,338 a 24,58
Castanho	3	GA	0,002 *	0,2564	0,1097 a 0,5994
Castanho	3	AA	0,3442	-	-
Multicolorido	3	GG	0,0009 *	0,04531	0,002663 a 0,7711
Multicolorido	3	GA	< 0,0001 *	19,92	2,593 a 153,1
Multicolorido	3	AA	0,1834	-	-

Intervalo de Confiança (IC); (\*) Valores significativos  $p < 0,05$ ; (-) Valores não avaliados por falta de significância pelo teste exato de Fisher.

De acordo com a associação observada para os alelos do *locus* Aci1-MC1R, em que o alelo (T) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (CT) aumenta em 10.76 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto, isso baseado nos valores do *Odds Ratio*, com  $p < 0.0001$  de significância pelo teste exato de Fisher. Enquanto que o genótipo (CC) aumenta em 6.681 vezes a probabilidade dos ovinos da raça Santa Inês terem pelos castanhos ( $p < 0,0064$ ) e em 5,444 vezes a

probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0207$ ). Não houve nenhuma ocorrência do genótipo (TT) na população amostral que caracterizaria um indivíduo homocigoto para o alelo mutante, se houvesse, talvez pudesse ser observada associação deste genótipo com a cor de pelagem preta. Este *locus* apresentou um intervalo de confiança muito extenso por variar de 1 a 33, esse fato pode ser devido ao tamanho amostral.

Um efeito funcional da área de mutação R67C é provocar a substituição de aminoácidos que provavelmente causam efeitos deletérios na funcionalidade da proteína MC1R. Tal substituição tem sido relatada com associações aos fenótipos eumelânicos em ratos, frangos, ovelhas e cabras. Duas deleções foram identificadas e tem sido relatada como causas de variações na cor de pelagem em coelhos (FONTANESI *et al.*, 2010).

Na associação alélica do *locus* Nla1-MC1R descrita anteriormente, o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta. De acordo com os valores do *Odds Ratio* o genótipo (AA) aumenta em 3,294 vezes a probabilidade do animal ter pelo preto com  $p < 0.0039$  de significância pelo teste exato de Fisher. O genótipo (TT) aumenta em 3,043 vezes a probabilidade dos ovinos da raça Santa Inês terem pelos castanhos ( $p < 0,0235$ ) e em 4,688 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0016$ ). Lightner (2008) relata em seu trabalho que a área de mutação M73K foi relatada em outros trabalhos em frangos de cor preta e ovelhas com cor de pelagem preta, sendo essa área caracterizadora de eumelanina. O genótipo (AT) não apresentou valores significativos ( $p < 0.05$ ) no teste exato de Fisher, o que demonstra a ausência de variações na cor de pelagem. Esse *locus* apresentou um intervalo de confiança muito extenso por variar de 1 a 11, esse fato pode ser devido ao tamanho amostral.

De acordo com a associação alélica do *locus* Bmg3-MC1R, em que o alelo (A) está associado com a cor de pelagem preta, o genótipo (AA) aumenta em 4,807 vezes a probabilidade do indivíduo ter pelo preto, baseado nos valores do *Odds Ratio*, com  $p < 0.0204$  de significância pelo teste exato de Fisher. O genótipo (GG) aumenta em 9,059 vezes a probabilidade dos ovinos da raça Santa Inês terem pelos castanhos ( $p < 0,0001$ ) e o genótipo (AG) em 19,92 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0001$ ). Este *locus* apresentou um intervalo de confiança muito extenso por variar de 1 a 153, esse fato pode ser devido ao tamanho amostral.

Segundo Lightner (2008), a área de mutação D121N identifica duas áreas de mutações associadas com a cor de pelagem dominante preta na maioria das raças ovinas e em porcos da raça Hampshire.

#### 4. CONCLUSÕES

Foram descritas mutações alélicas nos *locus* estudados, o que indicaria a presença de variabilidade da cor de pelagem dos animais avaliados.

A frequência do alelo mutante nos *locus* estudados dos animais castanhos e multicoloridos sugeriria uma adaptação dos ovinos da raça Santa Inês ao ambiente, favorecendo as variações na cor de pelagem clara com o objetivo de tornar o animal mais adaptado as mudanças climáticas e estresse calórico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETT R. D. H. **Bad coat, ripped genes: cryptic selection on coat colour varies with ontogeny in Soay sheep.** Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA *Molecular Ecology* (2012) 21, 2833–2835.

FONTANESI L., DALL’OLIO S., BERETTI F., PORTOLANO B., RUSSO V. Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. **Sezione di Allevamenti Zootecnici, University of Bologna.** July 2010.

GRAPHPAD SOFTWARE, I., EUA. San Diego California. USA. 2014.

GRATTEN J., WILSON A. J., MCRAE A. F., BERALDI D., VISSCHER P. M., PEMBERTON J. M. e SLATE J.. Evidence for warming climate theory of coat colour change in Soay sheep: a comment on Maloney *et al.* **Biol. Lett.** 2010.

LIGHTNER J. K., Genetics of Coat Color I: The Melanocortin 1 Receptor (MC1R). **Answers Research Journal.** p. 109–116. 2008.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics.** New York: Columbia University Press. 1987.

OLIVEIRA R. V., XIMENES F. H. B., MENDES C. Q., FIGUEIREDO C.R. R., F. PASSOS. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. CODEVASF. Brasília-DF: 2011.

RAYMOND M, ROUSSET F. GENEPOP (version 2.0): population genetics software for exact tests and ecumenism. **J Hered**, 86:248-249, 1995a.

ROYO L. J., ALVAREZ I., ARRANZ J. J., FERNÁNDEZ I., RODRÍGUEZ A., PE´REZ-PARDAL L., GOYACHE F. Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. **Animal Genetics**, 39, 290–293. 2014.

SANTOS, R. **Santa Inês: a raça fundamental**. Editora Agropecuária Tropical Ltda: 2007. Uberaba-MG.

SCHNEIDER A. **Investigação da base molecular e história evolutiva do Melanismo em felídeos selvagens**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Faculdade de Biociências - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre, 2013.

SCHNEIDER A., DAVID V. A., JOHNSON W. E., O'BRIEN S. J., BARSH G. S., RAYMOND M. M., EIZIRIK E. How the Leopard Hides Its Spots: ASIP Mutations and Melanism in Wild Cats. **Plos one**. Vol. 7. 2012.

SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 2000.

TOTH Z., KAPS M., LKNER SO J., BODO I., CURIK I. Quantitative genetic aspects of coat color in horses. **Journal of animal science**. February, 2014.

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

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível verificar que os parâmetros fisiológicos foram influenciados pela cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês.

A raça Santa Inês apresentou características fisiológicas compatíveis à termorregulação das condições climáticas do Norte do estado do Rio de Janeiro.

Foram encontradas mutações alélicas nos ovinos da raça Santa Inês avaliados neste trabalho.

Foram descritas mutações alélicas nos *locus* estudados, o que indicaria a presença de variabilidade da cor de pelagem dos animais avaliados.

A frequência do alelo mutante nos *locus* estudados dos animais castanhos e multicoloridos sugeriria uma adaptação dos ovinos da raça Santa Inês ao ambiente, favorecendo as variações na cor de pelagem clara com o objetivo de tornar o animal mais adaptado às mudanças climáticas e ao estresse calórico.