

ARTIGO ORIGINAL

# Variabilidade genética na cor da pelagem em polimorfismos do gene MC1R em ovinos da raça Santa Inês

*Genetic variability in coat colour in MC1R gene polymorphisms in Santa Inês sheep*

Julia Gazzoni Jardim\*, Celia Raquel Quirino, Aylton Bartholazzi Junior, Gleice Rangel Silveira Lima, Wilder Hernando Ortiz Vega, Aline Pacheco, Thiago da Silva Corrêa, Ana Carolina Barros Freitas, Caroline Marçal Gomes David, André Torres Geraldo

Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil

## Resumo

Este estudo objetivou investigar a variabilidade genética em dois *loci* do gene MC1R associados à cor de pelagem em ovinos Santa Inês. Pelos foram coletados da cauda de 121 animais com diferentes pigmentações. A genotipagem foi realizada por PCR RFLP com enzimas de restrição (NlaIII e BmgBI). As frequências alélicas e genotípicas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificadas no programa GENEPOP, e a diversidade genética, no programa ARLEQUIN. Os fragmentos observados no *locus* Nla1-MC1R apresentaram 46, 110 e 134 pb, frequência genotípica de 37% no genótipo homocigoto selvagem (AA), 23% no genótipo homocigoto mutante (TT) e 40% no genótipo heterocigoto (AT), com frequência de 42,8% para o alelo mutante. O alelo (A) foi associado à pelagem preta, sendo que o genótipo (T/T) aumenta em 4,688 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,001$ ). No *locus* Bmg3-MC1R, os fragmentos apresentaram 107, 260 e 372 pb, 20% do genótipo homocigoto selvagem (GG), 12% do

genótipo homocigoto mutante (AA) e 68% do genótipo heterocigoto (AG), com frequência alélica de 45,8% para o alelo mutante. O alelo (A) foi associado com a pelagem preta, sendo que o genótipo (A/G) acresce em 19,92 vezes a probabilidade de serem multicoloridos ( $p < 0,0001$ ). Mutações no gene MC1R exibiram elevada variabilidade genética (0,49).

**Palavras-chave:** *Ovis aries*. Genotipagem. Mutações. Raça deslanada.

## Abstract

*This study aimed to investigate the genetic variability in two MC1R gene loci associated with coat colour in Santa Inês sheep. Hairs were collected from the tail of 121 animals with different pigmentations. Genotyping was performed with restriction enzymes (NlaIII and BmgBI) by RFLP PCR*

\* Autor correspondente: jugazzoni@hotmail.com

Recebido: 15 mai 2018 | Aprovado: 24 ago 2018

technique. The expected allelic and genotypic frequencies in the Hardy-Weinberg equilibrium were verified in GENEPOP program, and the genetic diversity in ARLEQUIN program. The fragments observed at the *Nla1-MC1R* locus had 46, 110 and 134 bp, genotype frequency of 37% in the wild-type homozygous (AA) genotype, 23% in mutant homozygous (TT) genotype, and 40% in heterozygous genotype of 42.8% for mutant allele. The allele (A) was associated with black coat, the genotype (T/T) increased by 4.688 times the probability of being multicolour ( $p < 0.001$ ). In *Bmg3-MC1R* locus, the fragments presented 107, 260 and 372 bp, 20% of wild-type homozygous genotype (GG), 12% of homozygous mutant genotype (AA) and 68% of heterozygous genotype (AG), 45.8% for the mutant allele. The allele (A) was associated with the black coat, the genotype (A/G) increased by 19.92 times the probability of being multicolour ( $p < 0.0001$ ). Mutations in the *MC1R* gene exhibited high genetic variability (0.49).

**Keywords:** *Ovis aries*. Genotyping. Mutations. Hair Sheep Breed.

## Introdução

A cor de pelagem é uma característica genética qualitativa interessante para a seleção assistida por marcadores, uma vez que a determinação do fenótipo é dependente dos modos de interação gênica e não influenciada por fatores ambientais. A variabilidade da cor de pelagem é determinada por vários *loci*, tais como *agouti* (A), *extension* (E), e *irregular spotting* (S) (Mahmoud et al., 2017). O *locus* E codifica para o gene *MC1R* (Melanocortin 1 receptor) e o *locus* A para o gene *ASIP* (Agouti Signaling Protein), cujos produtos são essenciais na regulação da melanina durante o desenvolvimento do folículo piloso em ovinos. Os alelos dominantes ( $E^p$ ) do gene *MC1R* resultam em uma pelagem mais escura (eumelânicos), enquanto os alelos recessivos ( $E^+$ , selvagem) resultam em uma pelagem mais clara (feomelânicos), atuando de maneira epistática. Geralmente, para que os produtos dos alelos do gene *ASIP* sejam observados, é necessária a presença do alelo selvagem ( $E^+$ ) do *MC1R* (Mahmoud et al., 2017).

Animais da raça Santa Inês possuem uma pele de altíssima qualidade. A espessura da pele

é uma característica valorizada pelos curtumes, determinada pela relação entre a densidade de feixes de fibras colágenas e a densidade de folículos pilosos primários portadores de pelo ou lâ. Consequentemente, quanto menor a relação de densidade folicular existente, maior a elasticidade e a resistência à tração da pele e do couro do indivíduo. O genótipo entre e dentro de raças, além da idade do animal, influenciam a qualidade intrínseca das peles. A raça Santa Inês apresenta pele, em média, mais espessa quando comparada a outras raças (Jacinto et al., 2011).

Além disso, indivíduos da raça Santa Inês são deslançados, com pelos curtos e apresentam duas variações na pigmentação da pelagem, agrupadas em monocoloridas e multicoloridas (Figura 1). Os pelos dos animais monocoloridos são brancos, castanhos ou pretos, enquanto os animais multicoloridos são chitados de preto com branco e chitados de castanho com branco (Lima et al., 2014). Animais com pelo escuro são vulneráveis ao estresse térmico por absorverem maior carga térmica radiante, e os de pelagem clara são mais tolerantes ao calor, pois apresentam maior reflexão da luz solar (Veríssimo et al., 2009). A pelagem mais curta, de maior diâmetro e espessura favorece a eliminação de calor latente de evaporação através da pele (Cruz Jr et al., 2016). Essa raça, localmente adaptada, é resultante do cruzamento entre as raças Bergamácia, Morada Nova e Somalis, e apresenta alto valor adaptativo e reprodutivo, boa resistência a parasitos gastrintestinais e viabilidade produtiva nas diversas regiões tropicais, principalmente no Nordeste e Sudeste, sendo a raça mais difundida no território brasileiro (Moraes et al., 2016).

Este é o primeiro estudo visando a análise molecular genética da cor de pelagem na raça Santa Inês. Portanto, objetivou-se investigar a variabilidade genética em dois *loci* do gene *MC1R* relacionados à cor de pelagem em ovinos desta raça.

## Materiais e métodos

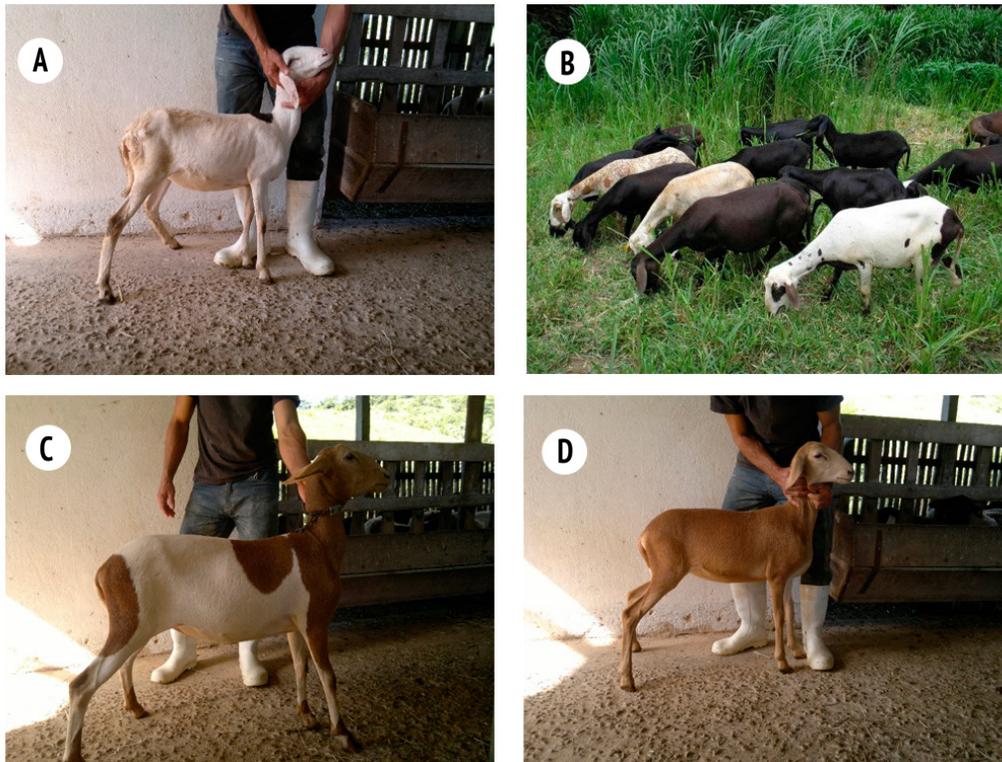
### Animais e amostras

Foram utilizados 121 animais da raça Santa Inês com pelame preto (60), castanho (32) e

multicoloridos (29), localizados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo (Figura 1). Todos os procedimentos experimentais com os ovinos foram aprovados e preenchidos de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da UENF (protocolo n°279/CEUA).

Pelos da porção final da cauda dos animais foram coletados para a extração do DNA. Para isso, 10 bulbos pilosos íntegros por indivíduo foram

colocados em microtubos de 1,5 mL contendo 50  $\mu$ L de uma solução de lise (200mM de NaOH) e misturados levemente com auxílio de uma pipeta. As membranas celulares foram desnaturadas, realizando um aquecimento a 96 °C por 15 minutos. Em seguida, foi efetuada centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto e 50  $\mu$ L de uma solução neutralizante (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) foi adicionada ao tubo.



**Figura 1** - Variações na cor de pelagem em ovinos da raça Santa Inês. A - Branco; B - Preto e multicolorido; C - Multicolorido; D - Castanho.

### **Amplificação e genotipagem dos loci do gene MC1R**

Para a amplificação dos *loci* do gene MC1R foram utilizados os *primers* 1-MC1R e 3-MC1R, descritos por Fontanesi et al. (2012). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por PCR, com um volume de 20  $\mu$ L por reação, utilizando tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], dNTPs (500  $\mu$ M de cada), MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimerase (0,5 U), um par de *primers* (1  $\mu$ M de cada primer), água

deionizada e uma amostra de 2,5  $\mu$ L de DNA. As concentrações de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) foram otimizadas individualmente, obtendo o valor de 1,5 mM para cada *loco*. O protocolo de reação de PCR iniciou com o passo de desnaturação a 94°C, por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (30 segundos/ciclo), 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

produto da PCR foi clivado com enzima de restrição (PCR-RFLP), utilizando as enzimas NlaIII e BmgBI, visualizado em gel de acrilamida a 8% e, em seguida, submetido à eletroforese capilar no equipamento AdvanCE FS96 (Advanced Analytical). O tamanho

dos fragmentos amplificados foi verificado nos softwares GenScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems. O tamanho dos fragmentos amplificados e as temperaturas de anelamento dos *primers* estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Sequência e *primers* utilizados, condições de PCR-RFLP e localização dos polimorfismos no gene MC1R

Primer	Forward e reverse primers (5' → 3')	Condições PCR <sup>(1)</sup>	PCR-RFLP <sup>(2)</sup>	Região gênica <sup>(3)</sup>	CHR <sup>(4)</sup>	Locus ID <sup>(5)</sup>
<b>1-MC1R</b>	agtgctgagggtgtccatcc ctgacgctcaccagcaagt	54/35/169	NlaIII (c. 218 T > A)	M73K	14	KU705374
<b>3-MC1R</b>	gtgagcgtcagcaacgtg acatagaggacggccatcag	65/35/365	BmgBI (c. 361 G > A)	D121N	14	

Nota: <sup>(1)</sup> Condições PCR: Temperatura de anelamento (°C), número de ciclos e tamanho dos fragmentos amplificados (pb). <sup>(2)</sup> PCR-RFLP: Enzima utilizada e local da mutação. <sup>(3)</sup> Região gênica: região do gene onde a ocorre a mudança no aminoácido. <sup>(4)</sup> CHR: Cromossomo. <sup>(5)</sup> Locus ID: Identificação de acesso no NCBI aos *loci* estudados.

## Análise estatística

### *Frequências alélicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidade média*

As frequências alélicas, frequências genotípicas esperadas e equilíbrio de Hardy-Weinberg foram verificados utilizando o programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995).

A heterozigosidade 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 (Nei, 1987). A variabilidade genética média foi calculada para cada amostra por *locus*, utilizando o programa ARLEQUIN (Excoffier et al., 2007).

### *Associações de fenótipos aos genótipos*

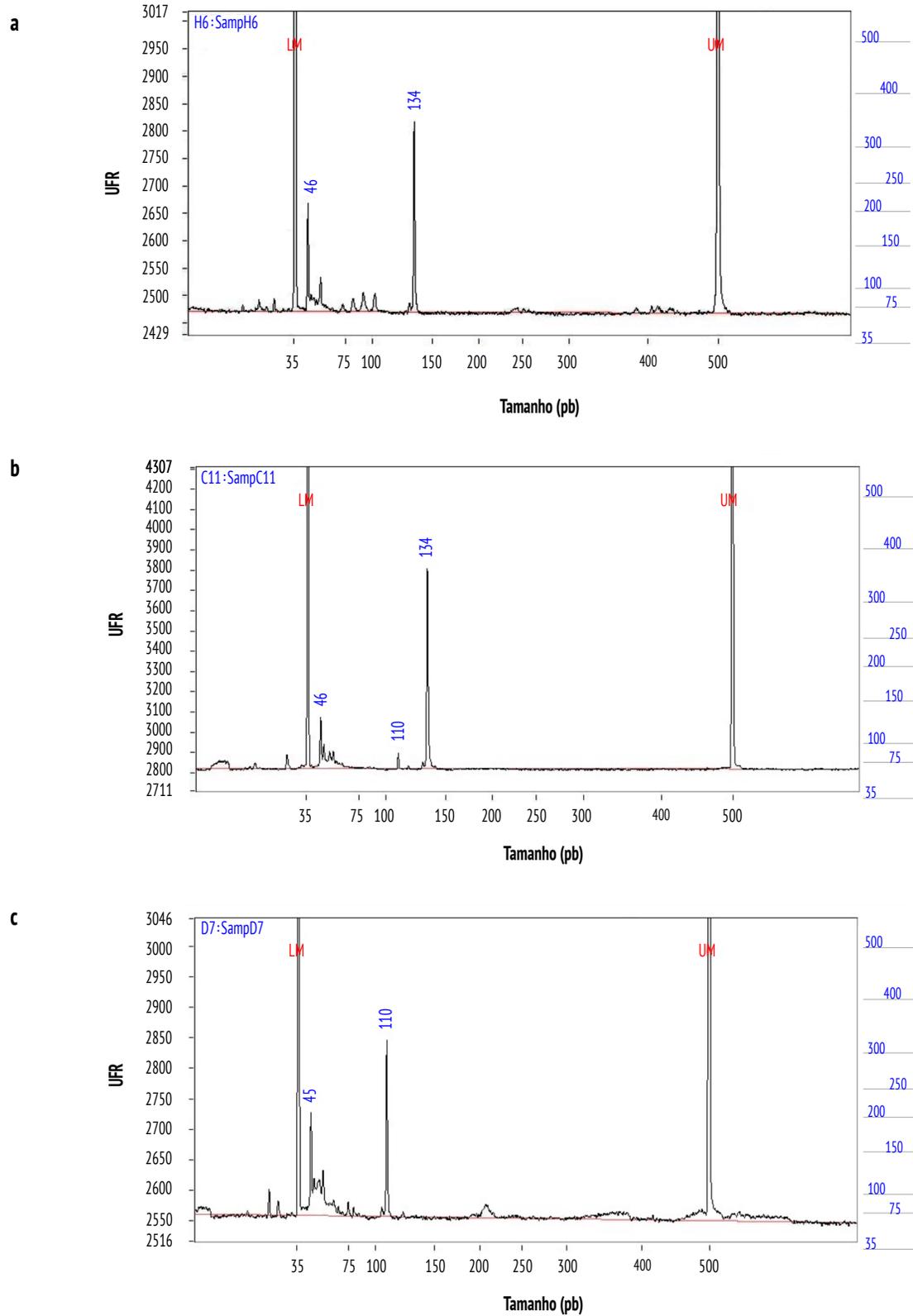
Para verificar a existência de associações entre alelos ou genótipos a um determinado fenótipo foi utilizado o teste exato de Fisher, empregando-se o programa Prism 6 for Mac OS X (Prism, 2014). O Prism 6 for Mac OS X foi também empregado para

determinar o tamanho desta associação através do cálculo de Odds Ratio e seu intervalo de confiança a 95%.

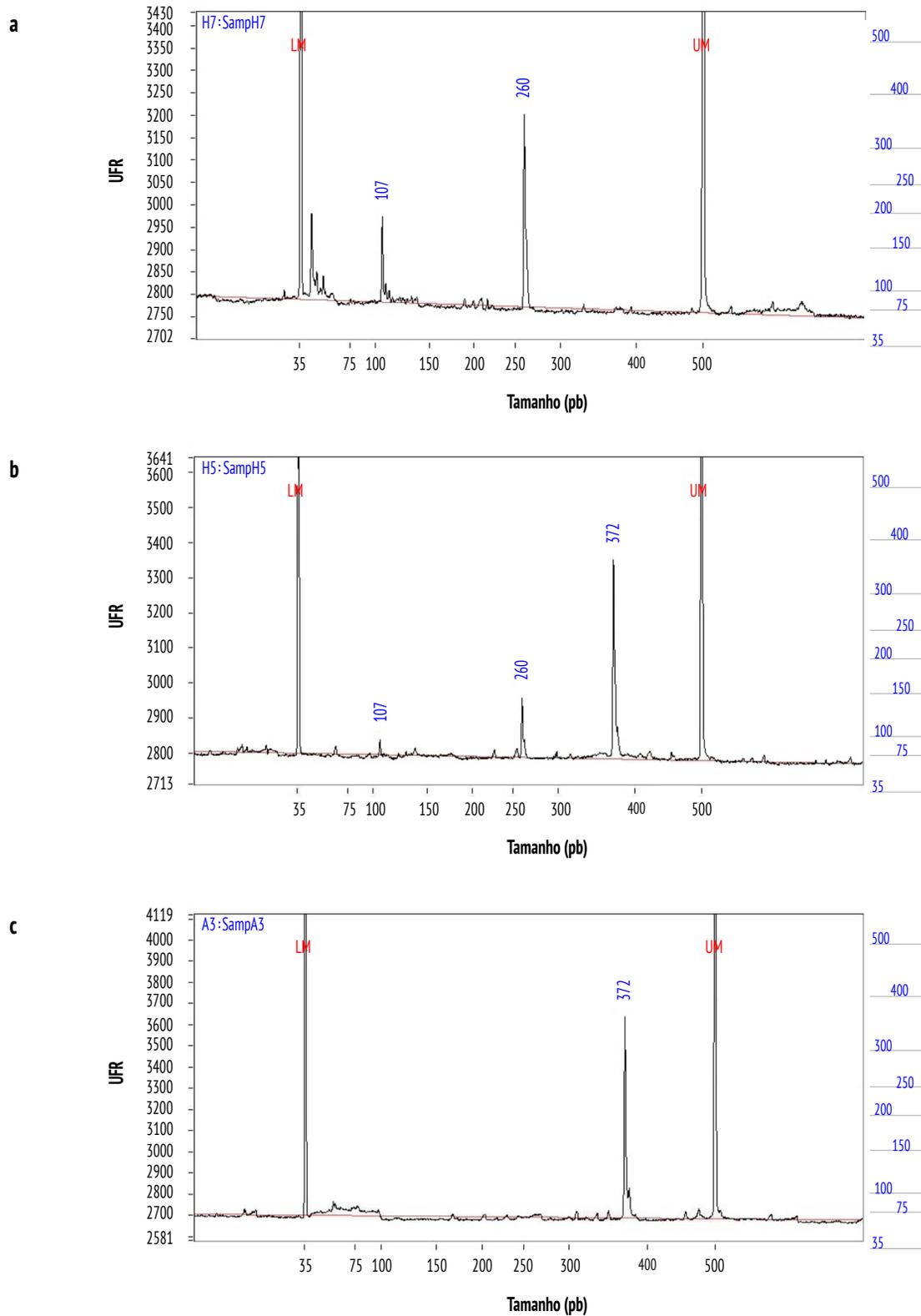
## Resultados

### Caracterização alélica

Os indivíduos puderam ser caracterizados como homozigotos para o alelo selvagem, homozigotos para o alelo mutante e heterozigotos. Para a mutação c.218T > A, fragmentos de DNA apresentaram 46, 110 e 134 pb após a clivagem da enzima NlaIII. O genótipo selvagem (AA) apresentou fragmentos de 46 e 134 pb (Figura 2a); os heterozigotos (AT), 46, 110, 134 pb (Figura 2b); e o genótipo mutante (TT), 46 e 110 pb (Figura 2c). Para a mutação c.361 G > A, foram observados fragmentos de DNA de 107, 260 e 372 pb após a clivagem da enzima BmgBI. O genótipo selvagem (GG) apresentou fragmentos de 107 e 260 pb (Figura 3a); os heterozigotos (AG), 107, 260 e 372 pb (Figura 3b); e para o genótipo mutante (AA) não houve clivagem (Figura 3c), ou seja, manteve-se o tamanho inicial do fragmento de DNA (365 pb).



**Figura 2** - Curvas obtidas após corrida de eletroforese capilar, mostrando no *locus* Nla1-MC1R: (a) um homocigoto para o alelo selvagem (AA); (b) um alelo heterocigoto (AT); (c) um alelo homocigoto para o alelo mutante (TT). O eixo X representa o tamanho de pares de bases e o eixo Y as unidades relativas de fluorescência (UFR).



**Figura 3** - Curvas obtidas após corrida de eletroforese capilar, mostrando no *locus* Bmg3-MC1R: (a) um alelo homocigoto para o alelo selvagem (GG); (b) um alelo heterocigoto (AG); (c) um homocigoto para o alelo mutante (AA). O eixo X representa o tamanho de pares de bases e o eixo Y as unidades relativas de fluorescência (UFR).

### Frequências alélicas, genotípicas e heterozigosidade

As frequências alélicas e a variabilidade gênica dos *loci* estudados estão descritos na Tabela 2. O *locus* Nla1-MC1R apresentou uma alta frequência de genótipos homozigotos (AA), sendo a frequência genotípica de 0,37 para o genótipo selvagem AA e 0,23 para o genótipo mutante TT. Os genótipos heterozigotos (AT) apresentaram uma frequência genotípica média de 0,40. A frequência alélica do alelo mutante (T) foi de 0,43 e para o alelo selvagem (A) foi de 0,57.

O *locus* Bmg3-MC1R apresentou uma frequência

de 0,68 para o genótipo heterozigoto (AG), 0,20 para o genótipo homozigoto selvagem (GG) e 0,12 para o genótipo homozigoto mutante (AA).

Os alelos presentes nos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), ou seja, estão associados de maneira aleatória. A variabilidade genética no *locus* Nla1-MC1R apresentou baixa taxa de heterozigosidade, devido à alta frequência do genótipo homozigoto (AA), enquanto o *locus* Bmg3-MC1R apresentou uma elevada taxa de heterozigosidade (Tabela 2), devido à baixa ocorrência do genótipo homozigoto para o alelo mutante (AA).

**Tabela 2** - Frequência genotípica e alélica (%) e heterozigosidade esperada e observada nos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R, em ovinos da raça Santa Inês

Locus	Frequência Genotípica			Frequência Alélica		He <sup>(6)</sup>	Ho <sup>(7)</sup>
	HS <sup>(4)</sup>	HT <sup>(2)</sup>	HM <sup>(3)</sup>	AS <sup>(4)</sup>	AM <sup>(5)</sup>		
Nla1-MC1R (M73K)	AA 0,37	AT 0,40	TT 0,23	A 0,572	T 0,428	0,4921	0,3983
Bmg3-MC1R (D121N)	GG 0,20	AG 0,68	AA 0,12	G 0,542	A 0,458	0,4978	0,6807

Nota: <sup>(1)</sup> HS: Homozigotos selvagens. <sup>(2)</sup> HT: Heterozigotos. <sup>(3)</sup> HM: Homozigotos mutantes. <sup>(4)</sup> AS: Alelo selvagem. <sup>(5)</sup> AM: Alelo mutante. <sup>(6)</sup> He: Heterozigosidade esperada. <sup>(7)</sup> Ho: Heterozigosidade observada.

### Associações alélicas entre genótipo-fenótipo

Os alelos dos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R foram associados à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês e estão expostos na Tabela 3. No *locus* Nla1-MC1R, o alelo A foi associado aos animais com cor de pelagem preta, enquanto o alelo T foi associado à pelagem castanha e multicolorida. De acordo com os valores de Odds Ratio, o alelo A aumenta em 4,176 vezes a probabilidade de o animal apresentar pelagem preta ( $p < 0,0001$ ). O alelo T aumenta em 1,999 a probabilidade de apresentarem pelagem castanha ( $p < 0,0256$ ) e aumenta em 2,935 a probabilidade de os animais estudados apresentarem pelagem multicolorida ( $p < 0,0007$ ).

No *locus* Bmg3-MC1R, o alelo A foi associado à cor de pelagem preta e o alelo G à cor de pelagem castanha. De acordo com os valores de Odds Ratio

e a significância pelo teste exato de Fisher, o alelo A aumenta em 1,704 vezes a probabilidade do animal em ter pelo preto ( $p < 0,05$ ), e o alelo G aumenta em 2,718 a probabilidade de os animais apresentarem pelos castanhos ( $p < 0,0013$ ).

### Associações genotípicas entre genótipo-fenótipo

Foram realizadas associações genotípicas nos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R para a cor de pelagem (Tabela 4). Conforme os valores do Odds Ratio, referentes ao *locus* Nla1-MC1R, o genótipo AA aumenta em 3,294 vezes a probabilidade de os animais apresentarem pelo preto ( $p < 0,0039$ ). O genótipo TT aumenta em 3,043 vezes a probabilidade de os animais apresentarem

pelos castanhos ( $p < 0,0235$ ) e em 4,688 vezes a probabilidade de os animais apresentarem pelos multicoloridos ( $p < 0,0016$ ). O genótipo AT não

apresentou valores significativos ( $p > 0,05$ ) no teste exato de Fisher. A extensão do intervalo de confiança deste *locus* variou de 1 a 11%.

**Tabela 3** - Associação alélica dos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês

<i>Locus</i>	Fenótipo	Alelo	Teste exato de Fisher bicaudal	Odds Ratio	IC 95%
Nla1-MC1R	Preto	A	< 0,0001 *	4,1760	2,3880 to 7,3050
		T		0,2394	0,1369 to 0,4188
	Castanho	A	0,0256 *	0,5003	0,2796 to 0,8952
		T		1,9990	1,1170 to 3,5770
	Multicolorido	A	0,0007 *	0,3407	0,1845 to 0,6293
		T		2,9350	1,5890 to 5,4210
Bmg3-MC1R	Preto	G	0,0500 *	0,5869	0,3500 to 0,9843
		A		1,7040	1,0160 to 2,8580
	Castanho	G	0,0013 *	2,7180	1,7400 to 5,01300
		A		0,3679	0,1995 to 0,6786
	Multicolorido	G	0,3627	-	-
		A		-	-

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

**Tabela 4** - Associação genotípica dos *loci* Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R em relação à cor de pelagem de ovinos da raça Santa Inês

<i>Locus</i>	Fenótipo	Alelo	Teste exato de Fisher bicaudal	Odds Ratio	IC 95%
Nla1-MC1R	Preto	AA	0,0039*	3,2940	1,5040 to 7,2140
		AT	0,1938	-	-
		TT	< 0,0001*	0,0262	0,0034 to 0,2020
	Castanho	AA	0,2084	-	-
		AT	0,5273	-	-
		TT	0,0235*	3,0430	1,2160 to 7,6130
	Multicolorido	AA	0,0455*	0,3432	0,1272 to 0,9264
		AT	0,5189	-	-
		TT	0,0016*	4,6880	1,8320 to 11,9900
Bmg3-MC1R	Preto	GG	0,1692	-	-
		GA	0,8438	-	-
		AA	0,0204*	4,8070	1,2660 to 18,2600
	Castanho	GG	< 0,0001*	9,0590	3,3380 to 24,5800
		GA	0,0020*	0,2564	0,1097 to 0,5994
		AA	0,3442	-	-
	Multicolorido	GG	0,0009*	0,0453	0,0027 to 0,7711
		GA	< 0,0001*	19,9200	2,5930 to 153,1000
		AA	0,1834	-	-

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

Associação genotípica realizada no *locus* Bmg3-MC1R mostrou que o genótipo AA aumenta em 4,807 vezes a probabilidade do indivíduo em 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 em 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, variando de 1 a 153.

## Discussão

Analisar os padrões de variação genética molecular é fundamental para avaliar a diversidade genética, bem como auxiliar na conservação e controle de variabilidade genética das raças. Em ovinos, a variação na coloração de pelagem se dá pela presença dos pigmentos eumelanina e feomelanina, expressos pelas proteínas dos genes MC1R, ASIP, TYRP1 e MITF nos melanócitos (Li et al., 2014; Mahmoud et al., 2017).

Neste estudo, mutações alélicas nos *loci* do gene MC1R estiveram envolvidas no controle da cor de pelagem em ovinos Santa Inês, particularmente nos fenótipos de coloração preta, e indicariam a existência de alta diversidade genética em relação à cor de pelagem nos *loci* avaliados. Semelhante resultado foi descrito para o polimorfismo no *locus* Nla1-MC1R em ovinos chineses da raça Kazakh Fat-Rumped e Minxian Black-fur, que apresentaram a frequência de 0,33 para o alelo selvagem (A) e de 0,34 para os alelos mutantes (T), respectivamente (Yang et al., 2013). Frequências semelhantes foram reportadas no *locus* Bmg3-MC1R, nas raças sauditas Herri e Sawaknee, para o genótipo homocigoto selvagem (0,18) e mutante (0,13), respectivamente (Mahmoud et al., 2017). Segundo Hartle e Clark (2010), a heterozigosidade mede a variabilidade genética de um *locus* em uma população que esteja submetida ao acasalamento ao acaso. Os valores dessa medida variam de zero (sem heterozigosidade) a quase 1,0 (para um sistema com um grande número de alelos igualmente frequentes). Valores de diferenciação genética acima de 0,25 são considerados muito altos, como é o caso deste estudo. Santa Inês é

provavelmente a raça com a maior diversidade genética entre as raças brasileiras de ovinos e, também, a mais frequente (Moraes et al., 2016). Em um estudo realizado por Souza et al. (2012), utilizando microssatélites para teste de parentesco nesta raça, foi identificada uma heterozigosidade média de 0,745. Paiva et al. (2011) observaram nos *loci* microssatélites valores de heterozigosidade de 0,6451 na raça Somalis. A diversidade genética foi também observada na raça Morada Nova, utilizando marcadores microssatélites e apresentando uma taxa de heterozigosidade média de 0,533 (Ferreira et al., 2014).

Existem outros *loci* que podem determinar os fenótipos eumelânicos e feomelânicos (Yang et al., 2013). Sponenberg et al. (1998) identificaram 11 *loci* que controlam a cor de pelagem em ovinos: *agouti* (A), albino (C), malhado (AsP), castanho (B), lavrada/*extension* (E), cabeça pigmentada (Ph), ruão (Rn), chitada/*spotting* (S), *sur bukhara* (SuB), *sur surkhandarya* (SuS), e *ticking* (Ti). Inonu et al. (2009) também relataram que todos estes *loci* aumentam a variabilidade nos padrões de coloração da pelagem.

A produção desses pigmentos é controlada pelo *locus* E, correspondente ao gene MC1R, e pelo *locus* A, referente ao gene ASIP. Os alelos dominantes neste *locus* (E) são responsáveis pela coloração preta e, em alguns mamíferos, manifestam um efeito epistático no *locus* A (Ferreira et al., 2014). O alelo selvagem no *locus* S admite a pigmentação uniforme do pelo, sem manchas brancas (Sponenberg et al., 1998). Adalsteinsson (1970) sugeriu que a variação no efeito chitado (SS) pode ser explicada pela ação de modificadores, que podem atuar através da inibição ou desregulação da migração de melanócitos da crista neural. As manchas brancas na cabeça ocorrem em animais heterocigotos por dominância incompleta do alelo dominante (S+), com ampla pigmentação.

Hepp et al. (2016) identificaram a frequência dos genótipos do gene MC1R em ovinos lanados crioulos brancos e coloridos. O genótipo homocigoto mutante (HM) ocorreu em todos os indivíduos de coloração branca, enquanto os indivíduos com fenótipo preto, castanho, cinza escuro e cinza claro exibiram maior frequência do genótipo homocigoto selvagem (HS), embora alguns animais coloridos também

carregassem o genótipo HM, indicando a interação epistática com outros genes (e.g., ASIP, TYRP1, KIT) na expressão da cor da lã em indivíduos da raça crioula. Muniz et al. (2016) avaliaram a segregação dos genes responsáveis pela coloração castanha em ovinos da raça Morada Nova. Todos os animais brancos e vermelhos foram homozigotos para o alelo mutante (AM) do gene MC1R, corroborando, portanto, com a teoria de que as diferenças entre as pelagens preta e castanha são decorrentes da expressão de diferentes alelos do mesmo gene.

Lightner (2008) também observou a região de mutação M73K, referente ao *locus* Nla1-MC1R, em ovelhas e frangos de coloração preta, sendo essa região caracterizadora de eumelanina. Hepp et al. (2012) observaram a frequência de alelos associados à coloração preta ( $\chi^2 = 0,778$ ), não preta ( $\chi^2 = 3,29$ ) e colorida ( $\chi^2 = 3,19$ ) na raça crioula lanada. Segundo Lightner (2008), a região da mutação D121N, referente ao *locus* Bmg3-MC1R, identifica duas áreas de mutações associadas com a cor de pelagem dominante preta em diversas raças ovinas e em suínos da raça Hampshire.

A coloração preta da pelagem em ovinos é dominante e tem sido relatada por uma extensão alélica, transportando o p.M73K e p.D121, que provocam alterações na sequência de codificação do gene MC1R (Royo et al., 2008). Assim como neste estudo, foram identificados dois alelos causados por duas variações genéticas do tipo missense (p.M73K e p.D121N) no gene MC1R, região caracterizadora de eumelanina, que poderiam explicar a dominância da pigmentação preta em ovinos da raça Missense, Dala Norueguês, Corriedale, Damara, Preto Merino, Black Castellana, Karakul, Crioula Lanada e Morada Nova (Våge et al., 2003; Hepp et al., 2012; Muhagheh-Dolatabady e Habibizad, 2014; Muniz et al., 2016).

A raça Santa Inês é fruto principalmente do cruzamento entre as raças Bergamácia, Morada Nova e Somalis, logo as variações e frequências na cor da pelagem são derivadas da herança mendeliana destas respectivas raças ancestrais (Moraes et al., 2016). As colorações preta ou multicolorida (com maior parte da pelagem preta) foram frequentemente selecionadas por criadores participantes deste estudo pela alta frequência genotípica do homozigoto para o alelo mutante AA e GG nos *loci*

Nla1-MC1R e Bmg3-MC1R, respectivamente (Tabela 2). A elevada taxa de heterozigosidade observada nas mutações nos dois *loci* deste estudo também confirma a preferência na seleção por indivíduos de coloração preta. Embora McManus et al. (2009) tenham verificado que animais de coloração branca sejam mais bem adaptados ao estresse por calor e às condições tropicais, pois absorvem menor carga térmica radiante e refletem menos luz solar, nenhuma diferença significativa foi identificada em termos de tolerância ao calor em indivíduos Santa Inês preto e marrom e Bergamácia mestiço com o Santa Inês.

Estudos sobre os modos de herança em relação à cor da pelagem em ovinos Santa Inês contribuem para elucidar este tipo de questão de interesse global, incrementar os programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos nesta raça, além de contribuir com futuras investigações utilizando marcadores moleculares em outras regiões associadas a diferentes cores de pelagem.

## Conclusão

Mutações no gene MC1R foram associadas ao fenótipo preto na raça Santa Inês, apontando-o como gene candidato para a cor de pelagem, e elevada variabilidade genética em indivíduos desta raça foi detectada. Os resultados deste estudo fornecem uma base para futuras investigações das associações entre polimorfismos e fenótipos de cor de pelagem em raças de ovinos localmente adaptadas.

## Agradecimentos

A equipe agradece à CAPES e ao CNPq pelo fornecimento de bolsas de estudo e apoio nos projetos de pesquisa financiados pelas respectivas agências de fomento do governo brasileiro.

## Referências

Adalsteinsson S. Colour inheritance in Icelandic sheep and relation between colour, fertility and fertilization. *J Agr Res Icel.* 1970;2(1):3-135.

- Cruz Jr C A, Lucci CM, Peripolli V, Tanure CB, Silva AF, Menezes AM, et al. Breed comparison for heat adaptation in rams using multivariate analysis. *Biosci J*. 2016;32(1):178-90.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005;1: 47-50.
- Ferreira JS, Paiva SR, Silva EC, McManus CM, Caetano AR, Façanha DA, et al. Genetic diversity and population structure of different varieties of Morada Nova hair sheep from Brazil. *Genet Mol Res*. 2014;13(2):2480-90.
- Fontanesi L, Rustempašić A, Brka 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 Rumin Res*. 2012;105(1-3):89-96.
- Hartl DL., Clark AG. *Princípios de Genética de Populações*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 660 p.
- Hepp D, Gonçalves GL, Moreira GR, Freitas TR. Epistatic interaction of the Melanocortin 1 Receptor and Agouti Signaling Protein genes modulates wool color in the Brazilian Creole Sheep. *J Hered*. 2016;107(6):544-52.
- Hepp D, Gonçalves GL, Moreira GR, Freitas TR, Martins CT, Weimer TA, et al. Identification of the e allele at the Extension locus (*MC1R*) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):2997-3006.
- Inounu I, Ambarawati D, Mulyono RH. Coat colour pattern in Garut sheep and its crossbred. *Indones J Anim Vet Sci*. 2009;14(2):118-30.
- Jacinto MAC, Vargas Jr FM, Martins CF, Pinto GS, Reis FA, Oliveira AR. Influence of genotype on the quality of sheep leather. *R Bras Zootec*. 2011;40(8):1830-6.
- Li MH, Tiirikka T, Kantanen J. A genome-wide scan study identifies a single nucleotide substitution in *ASIP* associated with white versus non-white coat-colour variation in sheep (*Ovis aries*). *Heredity (Edinb)*. 2014;112(2):122-31.
- Lightner J. Genetics of Coat Color I: The Melanocortin 1 Receptor (*MC1R*). *Answ Res J*. 2008;1:109-16.
- Lima GRS, Quirino CR, Pacheco A, Jardim JG. Gene polymorphisms responsible for variability in color coat in Santa Inessheep. *PUBVET*. 2014;8(23):1818.
- Mahmoud AH, Mashaly AM, Rady AM, Al-Anazi KM, Saleh AA. Allelic variation of melanocortin-1 receptor locus in Saudi indigenous sheep exhibiting different color coats. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2017;30(2):154-9.
- McManus C, Paludo GR, Louvandini H, Gugel R, Sasaki LC, Paiva SR. Heat tolerance in Brazilian sheep: Physiological and blood parameters. *Trop Anim Health Prod*. 2009;41(1):95-101.
- Moraes JCF, Silva KM, Leal TM, Azevedo HC, Santos SA, Facó O, et al. Núcleos de conservação de ovinos. In: MSM Albuquerque, P Ianello (EE.). *Inventário de recursos genéticos animais da Embrapa*. 1 ed. Brasília/DF: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2016. p. 42-54.
- Muhaghegh-Dolatabady M, Habibizad J. Sequence Characterization of Promoter Region at the Melanocortin-1 Receptor (*MC1R*) Gene in Karakul Sheep Breed. *J Agr Sci Tech*. 2014;16(3):551-60.
- Muniz MMM, Caetano AR, McManus C, Cavalcanti LCG, Façanha DAE, Leite JHGM, et al. Application of genomic data to assist a community-based breeding program: A preliminary study of coat color genetics in Morada Nova sheep. *Livest Sci*. 2016;190:89-93.
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Nova York: Columbia University Press; 1987. 512 p.
- Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barretto GB, Carneiro PL, et al. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop Anim Health Prod*. 2011;43(7):1449-57.
- Prism. Version 6.0 GraphPad Software. 2014.
- Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995;86:248-9.

Royo LJ, Alvarez I, Arranz JJ, Fernández I, Rodríguez A, Pérez-Pardal L, et al. 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. *Anim Genet.* 2008;39(3):290-3.

Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, Mariante AS, Grattapaglia D. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet Mol Res.* 2012;11(2):1217-29.

Sponenberg DP, Dolling CHS, Lundie RS, Rae AL, Renieri C, Lauvergne JJ. Coat colour loci (category 1). In: Lauvergne JJ, Dolling CHS, Renieri C (EE.). *Mendelian inheritance in sheep 1996 (Mis 96)*. Clamart, FR: Comité de Nomenclature Genetique des Ovins et Caprins (COGOVICA); 1996. p. 13-57.

Våge DI, Fleet MR, Ponz R, Olsen RT, Monteagudo LV, Tejedor MT, et al. Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. *Pigment Cell Res.* 2003;16(6):693-7.

Veríssimo CJ, Titto CG, Katiki LM, Bueno MS, Cunha EA, Mourão GB, et al. Tolerância ao calor em ovelhas Santa Inês de pelagem clara e escura. *Rev Bras Saude Prod An.* 2009;10(1):159-67.

Yang GL, Fu DL, Lang X, Wang YT, Cheng SR, Fang SL, et al. Mutations in MC1R gene determine black coat color phenotype in Chinese sheep. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:675382.