



46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

Maringá, PR - UEM - 14 a 17 de julho de 2009



## Identificação de SNPs em parte do gene de um fator de diferenciação celular localizado no BTA14<sup>1</sup>

<sup>2</sup>Gisele Batista Veneroni, <sup>3</sup>Sarah Laguna Meirelles, <sup>4</sup>Henrique Nunes Oliveira, <sup>5</sup>Maurício Melo de Alencar, <sup>6</sup>Luciana Correia de Almeida Regitano

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela FAPESP

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução- UFSCAR/São Carlos- SP. e-mail: giseleveneroni@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Zootecnista pela UNESP/Jaboticabal. e-mail: sarahmeirelles@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal - UNESP Botucatu/SP e-mail: hnunes@fca.unesp.br

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste/ São Carlos-SP e-mail: mauricio@cppse.embrapa.br

<sup>6</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste/ São Carlos-SP e-mail: luciana@cppse.embrapa.br

**Resumo:** Um fator de diferenciação celular localizado no BTA14 foi relacionado com adipogênese. O objetivo desse trabalho foi identificar SNPs no gene desse fator para subsequente associação com espessura de gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim. O valor genético (VG) de 113 touros foi calculado. Seis touros com maior VG e seis touros com menor VG foram escolhidos para identificação de SNPs. Todos os touros foram genotipados para todos os SNPs identificados e então foi aplicado um teste exato de Fisher. 76 SNPs foram identificados. O teste de Fisher revelou um valor de  $P=0.0167$  para um SNP localizado no íntron 13. Esse SNP pode ser um bom candidato para associação com deposição de gordura na população estudada.

**Palavras-chave:** canchim, espessura de gordura subcutânea, gene candidato, snp

### SNP identification of part of the cell differentiation factor gene located in BTA14

**Abstract:** A cell differentiation factor of BTA14 was related with adipogenesis. The scope of this work was to identify SNPs in the gene that factor for subsequent association with fat thickness in Canchim cattle. Breeding value (BV) of 113 bulls to fat thickness was calculated. Six bulls with higher BV and six bulls with lower BV were chosen for identification of SNPs. All bulls were genotyped for all SNPs identified and then a Fisher's exact test was applied. 76 SNPs were identified. Fisher's exact test revealed a  $P=0.0167$  for a SNP located in intron 13. This SNP can be a good candidate for association with fat deposition in the population studied.

**Keywords:** canchim, candidate gene, fat thickness, snp

### Introdução

O Brasil apresenta em sua maioria bovinos *Bos indicus* os quais são bem adaptados ao ambiente brasileiro, no entanto são os *Bos taurus* que apresentam melhor qualidade de carcaça. A raça Canchim foi criada com o objetivo de produzir animais que fossem resistentes às condições brasileiras (como os bovinos *Bos indicus*) e que apresentassem carcaça de boa qualidade (como bovinos *Bos taurus*). Esta raça consiste no cruzamento da raça charolesa (*Bos taurus*) com animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) que, por meio de cruzamentos alternados, produzem mestiços com 5/8 Charolês e 3/8 Zebu, de cujo acasalamento resulta o Canchim. Animais da raça Canchim são bovinos dóceis, de temperamento ativo, precoces, rústicos, bastante resistentes aos ectoparasitos e ao calor, possui elevada capacidade digestiva para aproveitamento de forragens grosseiras, boa adaptação ao regime exclusivo de campo, conformação ideal para o corte e produção abundante de carne, no entanto possui pouca gordura de cobertura. A carcaça deve apresentar quantidade adequada de gordura de cobertura para garantir características organolépticas desejáveis pelo consumidor e para preservação da mesma após o abate. Por isso o aumento da espessura de gordura subcutânea na raça Canchim é altamente desejável.

A acurácia da seleção tradicional pode ser aumentada com a implementação da Seleção Assistida por Marcadores (MAS), a qual se utiliza de marcadores moleculares para detecção de indivíduos geneticamente superiores. Um dos marcadores mais estudados é o SNP (polimorfismo de um nucleotídeo), que consiste na mudança de uma única base na sequência de DNA com a possibilidade de dois tipos de nucleotídeos em uma dada posição.

Moore e colaboradores (2003) descreveram um QTL para espessura de gordura na região centromérica do BTA14.

Os objetivos do presente trabalho foram identificar SNPs no gene de um fator de diferenciação celular do BTA14 e verificar se SNPs presentes em exons alteram aminoácidos na proteína de tal gene para posterior teste de associação desses polimorfismos com a espessura de gordura de bovinos da raça Canchim.

### Material e Métodos

Para identificação de SNPs no gene, primeiramente foi calculado o valor genético (VG) para espessura de gordura de 113 touros, pais de 1171 animais avaliados para espessura de gordura. O valor genético foi calculado utilizando o método de Máxima Verossimilhança Restrita Livre de Derivadas, com o programa computacional MTDFREML. Em seguida os touros foram ranqueados segundo o valor genético e acurácia e, foram escolhidos 6 touros com maior valor genético e maior acurácia e 6 touros com menor valor genético e maior acurácia. Os DNAs desses touros foram utilizados nas reações de amplificações (PCR) e sequenciamentos para identificação de polimorfismos.

O gene possui 339054 bp, o que inviabiliza seu sequenciamento completo. Por esse motivo, com base nos dados depositados no GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), foram detectados os domínios conservados da proteína codificada por esse gene. Esses domínios são: o domínio homólogo da centaurina plecstrina (*Centaurin Plekstrin Homology domain -P H centaurina*), da anquina (ANK), domínio homólogo Src 3 (*Src homology 3 domains – SH3*) e ArfGap. Em seguida foram identificadas no RNAm as bases codificadoras desses domínios. Logo após, foram localizadas, na sequência genômica, as regiões correspondentes a tais domínios. Assim foram desenhados 13 pares de *primers* (um para cada exon). Foi verificado que no exon 31 desse gene há um sítio alvo do micro RNA mmu-miR-721 descrito em *Mus músculos*, cuja região é homeóloga a *Bos taurus* ([http://micorna.sanger.ac.uk/cgi\\_bin/targets/v5/detail\\_view.pl?transcript\\_id=ENSMUST00000023008](http://micorna.sanger.ac.uk/cgi_bin/targets/v5/detail_view.pl?transcript_id=ENSMUST00000023008)). Dessa forma, também foi desenhado um par de primer no exon 31 englobando a região do sítio alvo do micro RNA.

Os produtos de PCR utilizados nas reações de sequenciamento foram purificados com a utilização do kit Wizard SV gel and PCR clean-up system. As reações de sequenciamento foram realizadas segundo adaptações do protocolo descrito por Regitano et al. 2007 utilizando o Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing da Applied. Os produtos de sequenciamento foram purificados e precipitados com álcool para evitar que os ddNTPs, dNTPs, primers e enzima não incorporados interferissem na leitura do sequenciador. Os produtos das reações de sequenciamento foram analisados em um sequenciador ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram submetidos ao programa de base calling Phred. Em seguida tais sequências foram submetidas ao programa de montagem Phrap (*Phragment Assembly Program*), onde as sequências foram agrupadas e organizadas em contigs. A visualização das sequências geradas foi realizada através do programa Consed, onde foi possível a observação dos SNPs (Prosdocimi *et al.*, 2002). A presença de 2 picos no eletroferograma foi interpretada como um polimorfismo. Esta metodologia permite identificação de polimorfismos somente em indivíduos heterozigotos para o SNP, isto é, se dois indivíduos forem homozigotos para alelos distintos de um polimorfismo esta metodologia não identifica o SNP. Por isso foi obtida a sequência consenso de cada animal, através dos programas Phred, Phrap e Consed para cada região analisada e, em seguida, as sequências consenso foram alinhadas pelo programa BioEdit (HALL, 1999) que utiliza o algoritmo do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) para identificação de polimorfismos entre indivíduos.

Para verificação de predominância de um alelo de um dado SNP em um dos extremos para espessura de gordura, segundo o Valor Genético, foi realizado um teste exato de Fisher para cada SNP encontrado. O SNP que apresentou menor valor de P será escolhido para validação na população de canchins filhos dos touros utilizados na identificação de SNPs.

### Resultados e Discussão

Foram identificados 76 SNPs nas regiões analisadas, sendo que 16 SNPs encontram-se em exons e 1 SNP está localizado no primeiro nucleotídeo do sítio alvo do miRNA mmu-miR-721.

Os 12 touros utilizados na identificação de SNPs foram genotipados para todos os SNPs detectados e um teste exato de Fisher foi realizado para cada SNP. Um valor de  $P = 0.0167$  foi revelado para um SNP localizado no íntron 13 do gene. Esse SNP é um bom candidato a ser testado para deposição de gordura na população estudada e, será genotipado em aproximadamente 1000 animais,

filhos dos touros utilizados na identificação dos SNPs para validação de associação. Uma vez que foi relatada a presença de um QTL para deposição de gordura nesse cromossomo (Moore et al. 2003) e há discussões contrastantes a respeito de qual gene dessa região influencia a característica, esse polimorfismo pode ser um candidato a influenciar a espessura de gordura em bovinos.

Além disso, os SNPs encontrados em exons foram analisados quanto à alteração de aminoácidos na proteína. Três SNPs localizados no exon 31 do gene provocaram alteração de aminoácidos na proteína. No entanto, os aminoácidos alterados possuem propriedade química semelhante, sendo aminoácidos não polares e alifáticos e valores de P resultantes do teste exato de Fisher não mostraram significância ( $P > 0,05$ ).

### Conclusões

O gene do fator de diferenciação celular do BTA14 apresenta SNPs nas regiões codificantes do domínio homólogo da centaurina plectrina, da anquirina, do domínio homólogo Src 3, ArfGap, em regiões intrônicas que circundam tais domínios e na região em que se encontra o sítio alvo do miRNA mmu-miR-721, sendo que há um SNP localizado no primeiro nucleotídeo do sítio alvo do miRNA mmu-miR-721.

Três SNPs localizados no exon 31 do gene provocaram alteração de aminoácidos na proteína.

A diferença de distribuição de frequência entre os animais que representam extremos de espessura de gordura subcutânea sugere que um desses SNPs pode ser associado à essa característica na população estudada.

### Literatura citada

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. V. 41, p.95-98. 1999.

MOORE, S. S.; LI, C.; BASARAB, J. et al. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1919-1925, 2003.

PROSDOCIMI, F.; COUTINHO, G.; BINNECK, C.E. et al. Bioinformática: Manual do Usuário Ano 5, Número 29 - Novembro/Dezembro 2002. **Biociência & Desenvolvimento** - nº 29. 2002.

REGITANO, L.C.A., et al. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1. ed. online. Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 1994.