

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Prospecção de SNPs no gene *TNF α* e sua possível associação à verminose gastrointestinal em caprinos.

Flavia Aline Bressani¹, Polyana Cristine Tizioto², Luiz Vieira³, Lilian Zarus⁴, Sarah Laguna Meirelles⁵, Luciana Regitano¹.

¹ Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, UFSCar, São Carlos, SP. Bolsista da FAPESP. e-mail: polytizioto@yahoo.com.br

³ Embrapa Caprinos e Ovinos/Sobral, Ceará.

⁴ Departamento de Microbiologia e Parasitologia- UFRN

⁵ Departamento de Zootecnia - UFLA.

Resumo: O objetivo desse estudo foi investigar a associação entre marcadores moleculares do tipo SNP (Polimorfismo de base única) prospectados no gene *TNF α* (fator de necrose tumoral alfa) e resistência à verminose gastrointestinal em caprinos. Para isso, foram produzidos 229 caprinos a partir de animais das raças Saanen, raça considerada susceptível a endoparasitas gastrointestinais e Anglo-nubiana, raça considerada resistente. Para a prospecção de SNPs, foram sequenciados 44 animais extremos para OPG (contagem de ovos por grama de fezes) escolhidos a partir dos resíduos obtidos através do modelo estatístico usado para corrigir os dados fenotípicos para as variações ambientais. O sequenciamento inclui quatro regiões do gene *TNF α* . Nestas regiões, foram encontrados dez SNPs: dois estão localizados na região promotora do gene, dois no *intron 2* e seis no *exon 4*. Através da aplicação do teste de Fisher foi encontrada uma associação de cinco dos SNPs prospectados ($P \leq 0,05$), o que indica que esses SNPs são potenciais marcadores moleculares para resistência à verminose gastrointestinal.

Palavras-chave: marcador molecular, gene candidato, OPG, caprinos.

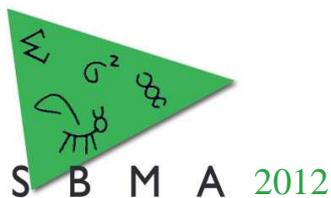
Prospection of SNPs in *TNF α* gene and possible association with gastrointestinal endoparasites resistance

Abstract: The aim of this study was to investigate the association between prospecting molecular markers, SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) in the *TNF α* gene and resistance to gastrointestinal nematode parasites in goats. For this, 229 goats were produced from animals of Saanen, breed considered susceptible to gastrointestinal endoparasites and Anglo-Nubian breed considered resistant. For SNP prospecting, 44 extreme animals for fecal egg counting (FEC) chosen residues of a statistical model that corrected the phenotype for environmental variations and, from four regions of the gene *TNF α* were sequenced. Ten SNPs were found: two are located in the promoter region, two in the *intron 2* and six in the *exon 4*. By applying the Fisher test association of five of the SNPs prospecting ($P \leq 0.05$) were found indicating that these SNPs are potential molecular markers for resistance to gastrointestinal nematode parasites.

Keywords: Molecular marker, candidate gene, OPG, goat.

Introdução

A verminose gastrointestinal é um grande problema enfrentado pela produção animal, inclusive a de caprinos, pois causa sérios prejuízos ao rebanho, reduzindo o retorno econômico da atividade devido à morte de animais e perda no desempenho. O controle da verminose é feito através da aplicação de anti-helmínticos, porém ao longo do tempo os parasitas ficam mais resistentes ao produto. Além disso, o uso indiscriminado do mesmo pode deixar resíduos no leite, na carne e no ambiente, causando sérios



IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

prejuízos à saúde e ao meio ambiente (VIEIRA & CAVALCANTI, 1999). Sabe-se que a seleção de animais resistentes baseada em marcadores moleculares é uma alternativa promissora (REGITANO & COUTINHO, 2001). Buscou-se, então, a prospecção de marcadores tipo SNP em quatro segmentos do gene *TNFA* (fator de necrose tumoral alfa) para a verificação da sua possível associação com a resistência à verminose gastrointestinal.

O *TNFA* foi o gene escolhido pois codifica uma citocina, que tem fundamental importância no sistema imunológico, pois, participa de diversas etapas da resposta imune, está relacionada com inflamações sistêmicas, causa morte apoptótica de células, proliferação celular, diferenciação, combate tumores e replicação viral (JANEWAY-JR et al.).

Como atualmente não se encontram na literatura trabalhos relacionando SNPs com a verminose gastrointestinal em caprinos, espera-se que o presente estudo possa contribuir com a seleção assistida por marcadores de caprinos resistentes, espécie importante em especial para a agropecuária do nordeste brasileiro.

Material e Métodos

Foram produzidos caprinos a partir de animais das Raças Saanen, raça considerada susceptível a endoparasitas gastrointestinais e Anglo-nubiana, raça considerada resistente aos mesmos endoparasitas. Após dois cruzamentos a terceira geração de animais, considerada F2, possuía 229 animais. Foram coletadas amostras de sangue para posteriores etapas de extração de DNA e quantificação; foram coletadas também amostras de fezes para contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Os dados foram transformados em $\log_{10}(OPG+1)$ e analisados usando o procedimento dos modelos mistos do SAS (2002/2003). Os efeitos fixos incluídos no modelo foram sexo, coleta e idade a coleta e a variável animal foi utilizada como efeito aleatório. Com base nos resíduos obtidos dessa análise, escolheu-se 44 animais extremos para resistência.

Visando a prospecção de SNPs foram sequenciadas quatro regiões do gene *TNFA* incluindo os *exons* 1, 2 e 3 e parte do *exon* 4. A reação de sequenciamento dessas regiões foi realizada com o kit *BigDye^R Terminator* e analisada no sequenciador automático *ABI 3100 Avant*, da *Applied Biosystems*.

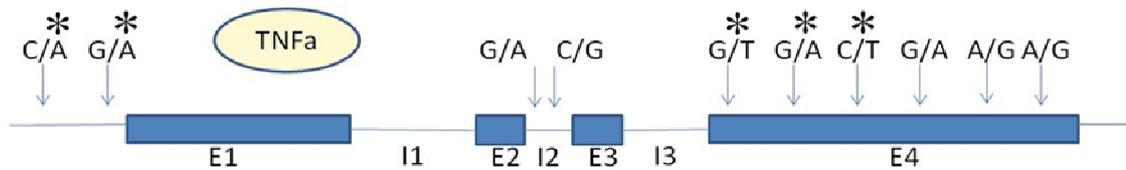
O teste de Fisher foi aplicado para verificar diferenças de frequência alélica nos dois grupos de extremos para resistência a parasitas gastrointestinais. Foram consideradas associações significativas aquelas com valores de $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Foram sequenciados quatro segmentos do gene *TNFA*. O segmento 1 contém o *exon* 1 completo, o segmento 2, os *exons* 2 e 3 completos, os segmentos 3 e 4 contém parte do *exon* 4. Nestas regiões foram encontrados dois SNPs no segmento 1. O primeiro SNP é referente à alteração de uma citosina por uma adenina (C/A) e o segundo SNP é referente à alteração de uma guanina por uma adenina (G/A). Observou-se que os SNPs estão bem próximos um do outro, com apenas uma base de diferença e que ambos estão localizados na região promotora do gene. Não foram encontrados SNPs no *exon* 1 e sim na região promotora do gene.

No segundo segmento foram encontrados dois SNPs, ambos localizados no *intron* 2. O primeiro é referente a alteração de uma guanina por adenina (G/A) e o segundo referente a alteração de uma citosina por guanina (C/G). No terceiro segmento, *exon* 4, foram encontrados seis SNPs, G/T, G/A, C/T, A/G, A/G localizados na região 3'UTR. Ambos SNPs A/G localizados no final do terceiro segmento foram também encontrados no início do quarto segmento. Os dez SNPs encontrados podem ser visualizados na Figura 1. Aplicando-se o teste de Fisher, verificou-se que cinco deles apresentaram um valor de $P \leq 0,05$, o que indica que esses SNPs são potenciais marcadores moleculares. São eles: C/A e G/A da região promotora e G/T, G/A, e C/T do *exon* 4.

Figura 1. Esquema posicionando os dez SNPs encontrados e suas localizações no gene *TNFa*. SNPs potencialmente associados (*).



Conclusões

Dentre os dez SNPs encontrados no gene *TNFa*, cinco deles podem estar associados com a resistência à verminose gastrointestinal. Para essa associação ser validada é necessário estudar o efeito desses SNPs na população completa e em outras populações de caprinos.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e ao CNPq.

Literatura citada

JANEWAY - JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.19, p.99-103, 1999.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. J. **Biologia molecular aplicada a produção animal**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.36, 2001.