

Polimorfismos no gene MyoD1 em ovinos Santa Inês

Polymorphisms in MyoD1 gene in Santa Ines sheep

Tatiana Cortez de Souza¹, Geraldo Magalhães Melo Filho², Taiana Cortez de Souza¹, Ariana Nascimento Meira³, Adriana de Farias Jucá⁴, Luiz Lehman Coutinho⁵, Evandro Neves Muniz⁶, Luís Fernando Batista Pinto⁴

¹Graduando e Bolsista no Programa de Iniciação Científica - PIBIC, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador/BA, 40170-110, Brasil.

²Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFBA, e-mail: gmagalhaesf@gmail.com

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador/BA, 40170-110, Brasil.

⁴Docente do Departamento de Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador/BA, 40170-110, Brasil. luisfbp@gmail.com

⁵Docente do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Avenida Pádua Dias, 11, Vila Independência, Piracicaba/SP, 13418-260, Brasil.

⁶Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3.250, Bairro Jardins, Aracaju/SE, 49025-040, Brasil.

Resumo: O objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos no gene MyoD1, através do sequenciamento de amplicons desse gene em 96 ovinos da raça Santa Inês. Foram amplificados 2.428 pb, dos quais 1.085 pb foram alinhados a partir de informações do gene referência depositadas no NCBI. Neste segmento foram identificadas 19 mutações, das quais cinco se mostraram potenciais marcadores genéticos para este gene por terem boa distribuição genotípica e alélica. Dentre estas cinco mutações, três estão em éxons e duas em íntrons.

Palavras-chave: Miogênese, Marcadores moleculares, Ovelhas, SNPs

Abstract: this study aimed to identify polymorphisms in the MyoD1 gene through amplicon sequencing of this gene in 96 sheep Santa Ines. An total of 2,428 bp were amplified, of which 1,085 bp were aligned based on information from reference gene deposited in the NCBI. In this segment were identified 19 mutations, of which five are potential genetic markers for this gene to have great distribution genotypic and allelic. Among these five mutations, three are in exons and two in introns.

Keywords: Myogenesis, Molecular markers, Sheep, SNPs

Introdução

Segundo o IBGE (2011), a Região Nordeste é o principal centro de produção de ovinos no Brasil, sendo o Estado da Bahia o detentor do maior rebanho dessa região. Contudo, os animais deslanados produzidos nesta região necessitam ainda de rigoroso processo de seleção para que atinjam maiores taxas de crescimento e carcaças de melhor qualidade e maior rendimento. Essas características são difíceis de melhorar via métodos clássicos de seleção. Contudo, avanços da genética molecular têm proporcionado novos avanços no ato de selecionar animais e neste contexto estão os estudos de genes candidatos, cujo conhecimento da ação biológica pode indicar previamente seu potencial uso na seleção. O gene MyoD1 é um bom gene candidato para estudos que envolvam crescimento ou desenvolvimento muscular, pois atua nos processos metabólicos de formação do tecido muscular. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos no gene MyoD1 em ovinos da raça Santa Inês, que sejam potenciais marcadores para estudos de associação com características de interesse econômico na ovinocultura.

Material e Métodos

Foram analisados 96 ovinos da raça Santa Inês criados em sistema semi-intensivo. Os animais nasceram nas safras de 2010 a 2013, na fazenda experimental da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Frei Paulo - Sergipe. Foram coletados 5 ml de sangue de cada animal, os quais foram estocados e refrigerados para posterior extração de leucócitos, seguindo protocolo descrito pela Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007). Os

leucócitos foram encaminhados à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, onde foi realizada a extração do DNA genômico, amplificação da região alvo, preparação da biblioteca e o sequenciamento. A extração do DNA foi realizada utilizando método de precipitação com soluções salina e proteinase K seguindo protocolo da Embrapa (Oliveira *et al.*, 2007).

Para a amplificação do fragmento do gene do MyoD1 foram utilizados 15 µL da reação contendo 0,3 µM de cada primer, taq polimerase e 100ng do DNA. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, USA) e consistiu numa etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 98°C, seguida por 45 ciclos de amplificação (desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 3 minutos), e extensão final a 72°C por 5 minutos. Foram utilizados os primers forward 5’ CAGACCCTCAGTGCTTTGCT 3’ e reverse 3’ CCTGCCTGCCGTATAAACAT 5’. Após a amplificação das amostras, foi realizada a purificação dos amplicons. As amostras foram diluídas a 0,2 ng/µl e encaminhado para o preparo da biblioteca e em seguida o sequenciamento. Para o preparo da biblioteca utilizou-se o kit Nextera® XT DNA *Sample Preparation* e Nextera® XT Index (Illumina, San Diego, USA). O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA) usando o kit MiSeq Reagent v2 (500 cycle). Após sequenciamento realizou-se a filtragem dos dados, alinhamento das *reads* contra o genoma referência dos ovinos no NCBI (*Ovis aries*) e detecção dos polimorfismos. Por fim, realizou-se a anotação funcional dos SNPs usando o programa VEP (*Variant Effect Predictor*) do *Ensembl* (software que realiza a anotação funcional online), para identificar as localizações das mutações no genoma e prováveis efeitos funcionais em região codificadoras do gene. As frequências alélica e genotípica foram estimadas para cada locus por contagem simples dos alelos e dos genótipos, respectivamente.

Resultados e Discussão

Das 96 amostras em sequenciamento, 20 não amplificaram. Isso pode decorrer de alguma mutação na região de anelamento dos primers. Ainda, 18 amostras foram descartadas após constatação que havia baixa qualidade do alinhamento. Portanto, 58 amostras amplificaram e mantiveram qualidade do alinhamento satisfatória para análise, ou seja, um grande número de reads foram alinhadas na mesma posição. Seis animais eram progenitores dos demais 90 animais sequenciados e não foram considerados na determinação das frequências. Assim, dados de 52 animais foram considerados na determinação das frequências genotípicas e alélicas.

Foram amplificados 2.428 pb, dos quais 1.085 pb foram alinhados a partir de informações do gene referência depositadas no NCBI. A grande diferença da quantidade de pares de bases entre o que foi amplificado e o que foi alinhado deve-se a uma lacuna de informações no gene referência, onde se sabe do número de nucleotídeos pertencentes à região, porém não se conhece os nucleotídeos. Dos 1.085 pb alinhados com o genoma referência, 19 pb se mostraram diferentes do gene referência. Três mutações estão em regiões do intron, enquanto 16 pb estão em exons. Das 16 mutações que estão em regiões codificadoras, sete foram consideradas sinônimas, quando a troca das bases não modificaram o aminoácido que codificou a proteína, e nove foram consideradas não-sinônimas, quando o polimorfismo altera o aminoácido que codifica a proteína, podendo alterar ou não sua função. Os cinco SNPs que apresentaram distribuição de frequências alélica e genotípica mais equilibradas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. SNPs identificados no gene MyoD1, suas localizações no cromossomo e respectivas trocas de bases e aminoácidos alterados

Marcador	Posição da mutação	Região do cromossomo	Base nitrogenada trocada (SNP)	Aminoácido Alterado	Escore SIFT
1	34368999	Intron	T/G	-	-
2	34369043	Intron	G/A	-	-
5	34370797	Exon	A/G	Leucina	-
7	34370841	Exon	G/T	Treonina/Asparagina	0,84
8	34370843	Exon	G/A	Prolina	-

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) – Escore que prediz se a mutação é tolerável (> 0,05) ou deletéria (≤ 0,05).

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas de cinco marcadores SNP identificados no gene MyoD1

Posição do Polimorfismo	Nome	N	Genótipos	Frequência genotípica (%)	Alelos	Frequência alélica (%)
34368999	Marcador 1	25	GG	48,08	G	59,62
		12	TG	23,08	T	40,38
		15	TT	28,85		
34369043	Marcador 2	5	AA	9,62	A	14,42
		5	GA	9,62	G	85,58
		42	GG	80,77		
34370797	Marcador 5	31	AA	59,62	A	75,96
		17	AG	32,69	G	24,04
		4	GG	7,69		
34370841	Marcador 7	3	GG	5,77	G	15,38
		10	GT	19,23	T	84,62
		39	TT	75		
34370843	Marcador 8	28	AA	53,85	A	71,15
		18	GA	34,62	G	28,85
		6	GG	11,54		

Para os demais tem-se um dos alelos praticamente fixado na população. Percebe-se na Tabela 2 que para todos os cinco marcadores o genótipo menos frequente foi encontrado em pelo menos três animais (Marcador 7), sendo a frequência alélica mais baixa igual a 14,42% no alelo A do marcador 2. Na Tabela 1 é possível observar que os marcadores 5, 6 e 7 estão localizados em exons, mas apenas o polimorfismo do marcador 7 causa alteração de aminoácido na cadeia da proteína formada a partir deste gene.

Conclusões

A sequência de bases do gene MyoD1 em ovinos Santa Inês difere da sequência deste gene no genoma referência para ovinos, em pelo menos em 19 bases, das quais 16 estão em regiões de exon. Dentre os SNPs encontrados, pelos menos cinco são boas opções para estudos de associação com características de interesse econômico, por apresentarem boa distribuição de frequências alélicas e genotípicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar a infraestrutura e os animais experimentais; Ao Dr. Luiz Lehman Coutinho por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular da ESALQ/USp; ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido aos projetos 562551/2010-7 e 474494/2010-1; e a FAPESB pelo apoio financeiro ao Projeto 5803/2009.

Literatura citada

IBGE – **Pecuária** 2008 <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=pecuaria2008>. Acessado em 25/02/2014.
OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSE, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase** [Recurso Eletrônico]. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste, 2007, 38p.