

Polimorfismo no gene *IGF1* em ovinos Santa Inês

Polymorphism in the *IGF1* gene in Santa Ines sheep

Jocasta Meira Galvão¹, Ariana Nascimento Meira², Geraldo Magalhães de Melo Filho³, Adriana de Farias Jucá⁶, Bruna Carolina Rezedá dos Santos de Jesus¹, Luiz Lehman Coutinho⁴, Hymerson Costa Azevedo⁵, Luís Fernando Batista Pinto⁶

¹Graduando e Bolsista do Programa Permanecer, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador/BA, 40170-110, Brasil.

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA e Bolsista da FAPESB, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina – Salvador/BA, 40170-110, Brasil.

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

⁴Docente do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, Avenida Pádua Dias, 11, Vila Independência, Piracicaba/SP, 13418-260, Brasil.

⁵Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3.250, Bairro Jardins, Aracajú/SE, 49025-040, Brasil.

⁶Docente 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

Resumo: o objetivo deste estudo foi identificar polimorfismos do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) no gene *IGF1* (*Insulin-Like Growth Factor 1*) em ovinos Santa Inês. Foram coletados 5,0 ml de sangue de 96 animais, dos quais foram extraídas amostras de leucócitos para extração do DNA genômico. Foi realizada a amplificação da região alvo, preparo de bibliotecas e sequenciamento da região alvo (exons 1 à 2) e posterior identificação dos SNPs. Ao longo dos 4.649 pb que foram sequenciados, quatro polimorfismos foram identificados, todos localizados em região de intron.

Palavras-chave: biotecnologia, genética, marcadores moleculares, ovinocultura, sequenciamento

Abstract: this study aimed to identify single nucleotide polymorphism in *IGF1* (Insulin-Like Growth Factor 1) gene, in Santa Ines sheep. Were collected 5.0 ml of blood of 96 animals. Leukocyte samples were taken for the extraction DNA. Amplification of the target region, library preparation, and sequencing of the target region (exons 1 to 2), and SNP identification was performed. A total of 4,649 bp were sequenced and four polymorphisms were identified, all SNPs in intron region.

Keywords: biotechnology, genetics, molecular markers, sequencing, sheep production

Introdução

A carne ovina está entre as principais carnes consumidas no mundo entretanto, representa apenas 3% do mercado de carne (BARNARD, 2000). Todavia a produção de carne ovina vem mostrando aumento significativo em todo território nacional, atingindo a exigência do mercado em relação a qualidade do produto, mas a carência de ofertas de animais jovens para o abate inibe o avanço do mercado (BARCET *et al.*, 2011). Entre os ovinos criados no Brasil estão os da raça Santa Inês conhecido pela rusticidade e adaptação ao clima tropical, porém a raça necessita de um intenso trabalho de seleção, com a finalidade de melhorar a sua produção. Diante disto, as técnicas moleculares vêm contribuindo para os programas de melhoramento genético, aumentando a resposta à seleção. Assim, alguns genes de interesses econômicos vêm sendo estudados em diversas espécies. O gene *IGF1* pode ser considerado um candidato a associação com características de crescimento, como pode ser observado em HOSSNER (2005). Logo, identificar marcadores moleculares nesse gene pode ser o primeiro passo para investigar a possibilidade de utilização de suas informações no melhoramento animal. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar polimorfismos do tipo SNP no gene *IGF1* em ovinos da raça Santa Inês.

Material e Métodos

Foram estudados 96 cordeiros da raça Santa Inês, nascidos entre 2010 e 2013, todos provenientes do campo experimental Pedro Arle da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo, no estado de Sergipe. Foram coletado 5 ml de sangue, que 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 do gene, englobando a região entre os exons 1 e 2. O desenho dos *primers* para a amplificação do fragmento foi realizado com base nos dados depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o seguinte código de acesso *IGF1* ([Gene ID: 443318](#)) baseado no genoma de ovinos (*Ovis aries*). Os *primers* utilizados para a amplificação da região alvo do gene foram: *forward* 5' CAG CAG TCT TCC AAC CCA AT 3' e *reverse* 3' AGA GCA TCC ACC AAC TCA GC 5', e o produto do amplificado teve aproximadamente 4.649 pb.

Para a amplificação do fragmento do gene do *IGF1* utilizou-se um *touch down* com as seguintes condições: desnaturação inicial de 98°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos com desnaturação a 98°C por 10 segundos, temperatura de anelamento variando entre 61°C a 56°C reduzindo a temperatura em -0,5°C a cada ciclo, por 30 segundos, e extensão a 72°C por 4 minutos. Logo após os primeiros ciclos seguiu-se com mais 30 ciclos com a desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 4 minutos, finalizando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Foram utilizados 15 µL da reação contendo 0,3 µM de cada *primer*, a enzima Taq polimerase *Emerald_{amp} Max Hs* (Takara Bio, USA) e 100ng do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador Veriti® (Applied Biosystems, USA).

Após a amplificação das amostras, foi realizada a purificação dos amplicons. As amostras foram diluídas a 0,2 ng/µl e encaminhadas para o preparo da biblioteca e posterior 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 o sequenciamento realizou a filtragem dos dados, alinhamento das *reads* contra o genoma referência dos ovinos no NCBI (*Ovis aries*) e, então procedeu-se a 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 alélicas e genotípicas foram estimadas para cada locus por contagem simples dos alelos e dos genótipos, respectivamente.

Resultados e Discussão

Após a amplificação da região alvo das 96 amostras de DNA, contactou-se que 23 não amplificaram, o que pode ser devido a alguma mutação na região de alinhamento dos *primers*. Além disto, 8 amostras do mesmo foram descartadas devido à baixa qualidade do alinhamento, pois o número de *reads* alinhadas foi insuficiente para a cobertura da região estudada. Portanto, foram sequenciados 65 animais para o gene *IGF1*. Ao longo dos 4.649 pares de base sequenciadas foram identificados 4 SNPs, que tiveram os três genótipos presentes em uma frequência satisfatória para futuros estudo de associação. (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs encontrados no gene *IGF1*.

Posição do Polimorfismo	Nome	N	Genótipos	Frequência genotípica (%)	Alelos	Frequência alélica (%)
171324066	Marcador 1	42	TT	0,65	T	0,76
		15	TC	0,23	C	0,24
		8	CC	0,12		
171325232	Marcador 2	16	CC	0,25	C	0,49
		32	CT	0,49	T	0,51
		17	TT	0,26		
171326230	Marcador 3	8	GG	0,12	G	0,29
		22	GA	0,34	A	0,71
		35	AA	0,54		
171327300	Marcador 4	42	CC	0,65	C	0,76
		15	CT	0,23	T	0,24
		8	TT	0,12		

O gene *IGF1* em ovinos contém cerca de 74 kb de extensão e está dividido em 4 éxons e 3 íntrons, a maioria dos estudos realizado com este gene engloba a região do primeiro éxon. Todos os SNPs identificados no gene *IGF1* encontram-se em região de íntron e possuem entrada no banco de dados de SNP no site do NCBI (Tabela 2). Os íntrons são regiões não codificantes do gene, ou seja, que não codificam aminoácidos e não colaboram para a formação de uma proteína. Contudo, estudos vem mostrando que algumas regiões intron podem ter função bioquímica. O projeto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) vem desenvolvendo pesquisas que mostram que 80% do genoma humano tem uma função bioquímica. Algumas mutações em introns podem alterar a expressão de genes, exigindo, portanto, estudos mais aprofundados destas mutações.

Tabela 2. Anotação de gene de variantes genéticas detectadas dos SNPs do gene *IGF1*.

Posição da mutação	Nome	Região do cromossomo	Base nitrogenada trocada (SNP)	Varição existente
171324066	Marcador 1	Intron	T/C	rs421621914
171325232	Marcador 2	Intron	C/T	rs412470350
171326230	Marcador 3	Intron	G/A	rs409110739
171327300	Marcador 4	Intron	C/T	rs400113576

Conclusões

Existem pelo menos quatro SNPs no gene *IGF1*, todos com distribuição de frequência genotípica satisfatória para serem utilizados em estudos de associação com características de interesse econômico na raça Santa Inês.

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 concedido nos projetos 562551/2010-7 e 474494/2010-1; e a FAPESB pelo apoio no Projeto 5803/2009.

Literatura citada

- BARCHET, I.; MIGNON, B.A.C.; SILUK, J.C. **A dinâmica e o panorama da cadeia produtora de ovinos: uma análise para identificar novas possibilidades.** In: I Congresso De Engenharia De Produção. Ponta Grossa, PR, Brasil. 2011.
- BARNARD, P. **Perspectivas globais da carne: mercado mundial da carne ovina.** In: Congresso Mundial Da Carne, 13., 2000, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 2000.
- ENCODE; **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.** Nature, Vol. 489:57-74 (September 6, 2012).
- HOSSNER, K.L. **Hormonal Regulation of Farm Animal Growth.** Fort Collins, Colorado. Colorado State University – USA. 2005.
- 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.