



X Congresso Nordestino de Produção Animal
17 a 19 de novembro
Teresina - Piauí

Polimorfismos nos genes *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN- γ* e a resposta a nematoides gastrintestinais em caprinos¹

Lilian Giotto Zaros^{2*}, Larissa Magna Sousa Seabra³, Luiz Lehmann Coutinho⁴, Fernanda Cavalcante Silva⁵, Henrique Rocha de Medeiros⁶, Luiz da Silva Vieira⁷

¹Parte da dissertação do segundo autor, financiado pelo Programa Casadinho/PROCAD CAPES/CNPq.

^{2*}Professora Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia – DMP/UFRN, Natal, RN, Brasil. lgzaros@gmail.com

³Zootecnista, Mestre em Produção Animal – UFRN, Macaíba, RN, Brasil. Bolsista CAPES.

⁴Professor Titular do Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

⁵Zootecnista, Mestranda em Produção Animal – UFRN, Macaíba, RN, Brasil. Bolsista CAPES.

⁶Professor Adjunto da Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias – UAECIA/UFRN, Natal, RN, Brasil.

⁷Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

*Autor apresentador.

Resumo: Cinco genes candidatos foram selecionados para identificar polimorfismos de nucleotídeo único e sua associação com a resposta de caprinos a nematoides gastrintestinais. Para isso, o DNA genômico dos animais mais resistentes e mais susceptíveis foi extraído e submetido ao sequenciamento de nova geração. Foram observados 71 SNPs, sendo 4 associados à resistência, o que os tornam alvos de estudos em toda a população de caprinos a fim de se confirmar essa associação.

Palavras-chave: genes de resistência, população de caprinos F2, sequenciamento de nova geração, SNPs

Polymorphisms in *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN- γ* genes and the response to gastrointestinal nematode in goats

Abstract: Five candidate genes were selected to identify single nucleotide polymorphisms and its association with goat response to gastrointestinal nematodes. Genomic DNA from resistant and susceptible animals was extracted and submitted to new generation sequencing. It was observed 71 SNPs with 4 associated with resistance, which make them targets for studies on the entire population goats in order to confirm this association.

Keywords: F2 crossbreeding goat, next generation sequencing, resistance genes, SNPs

Introdução

Vários são os entraves para a produção de caprinos com qualidade e de maneira sustentável, dentre eles a sanidade dos rebanhos, principalmente no que se refere às infecções por nematoides gastrintestinais, que podem causar anemia, perda de peso, diminuição do potencial reprodutivo e produtivo e até mesmo o óbito dos animais acometidos (VIEIRA, 2008). O controle das endoparasitoses gastrintestinais é feito rotineiramente pela administração de anti-helmínticos. Entretanto, o uso indiscriminado desses produtos pode levar ao desenvolvimento da resistência parasitária, e também deixar resíduos na carne e no leite, comprometendo a saúde de quem os consome, bem como o ambiente. Dessa forma, novas estratégias de controle vêm sendo utilizadas, tais como a seleção de animais geneticamente superiores, uma vez que a característica de resistência é herdável e varia substancialmente entre raças, bem como entre indivíduos de uma mesma raça (ZAROS et al., 2010).

Para isso tornar-se real, faz-se necessário identificar os genes associados à resistência e/ou susceptibilidade animal, identificar os possíveis polimorfismos que poderão estar associados com essa característica, testá-los na população e utilizá-los como marcadores moleculares para a seleção de animais mais resistentes aos nematoides gastrintestinais.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes candidatos *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN- γ* , associados à resposta a nematoides gastrintestinais em caprinos F2 mestiços ½ Anglo Nubiano x ½ Saanen através de sequenciamento de nova geração (NGS) e associá-los à resistência e/ou susceptibilidade animal.

Material e Métodos

Os animais foram provenientes da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE, onde, a partir do cruzamento de cinco machos da raça Anglo-Nubiano com 100 fêmeas da raça Sannen, foi obtida uma população F1, composta por 150 animais ½ Anglo-Nubiano x ½ Saanen, de ambos os sexos. Estes animais F1 não aparentados foram acasalados entre si e geraram uma população F2, composta de 229 animais, distribuídos em 4 lotes.

Os animais foram mantidos em pastagem cultivada e irrigada de capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia), naturalmente contaminada por larvas de nematoides gastrintestinais e vermifugados antes do início do experimento. Semanalmente, por um período de 93 dias, foram coletadas amostras de fezes para realização de exames parasitológicos de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura, bem como amostras de sangue para exames hematológicos de determinação da porcentagem de volume globular e número de eosinófilos sanguíneos que serviram de marcadores fenotípicos para classificar os animais em resistentes e susceptíveis.

O DNA genômico dos 10 animais mais resistentes e dos 10 animais mais susceptíveis classificados de acordo com os marcadores fenotípicos foi obtido a partir de amostras de sangue utilizando a metodologia de Tizioto et al. (2012). Os genes escolhidos para serem estudados foram *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN-γ* e os iniciadores foram delineados com base no genoma caprino disponível no GenBank. Os iniciadores, as regiões amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) e o tamanho dos fragmentos são visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na PCR e sequenciamento dos genes *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN-γ*.

Gene	Cromossomo	Sequência (5' para 3')	Produto amplificado (pares de bases)	Temperatura de anelamento
<i>IL-2</i>	17 (NC_022309.1)	F: AACCTCAACTCCTGCCACAA R: AAAGTGCATTGGTAGGGGCT	3.385	61°C
<i>IL-5</i>	7 (NC_022299.1)	F: GGGGGAAATAGGGATTTTGTG R: ATGCACTTTCCTGTGTGTG	2.656	59°C
<i>IL-8</i>	7 (NC_022299.1)	F: AACGAAAGCAGAAAGAACG R: AGACTAGGCCAGGCATCTCA	3.669	59°C
<i>IL-12</i>	6 (NC_022298.1)	F: TTTCAGCCCACCAGAACTCT R: TGGTGCTGGGCTACTCTCTT	1.672	62°C
<i>IFN-γ</i>	5 (NC_022297.1)	F: CTCCGGCCTAACTCTCTCTCT R: ATTTTGGCGACAGGTCATTC	4.097	62°C

Os genes amplificados por PCR foram purificados e utilizados para a construção das bibliotecas utilizando-se o kit Nextera XT Illumina®. O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma da Illumina MiSeq e as sequências obtidas foram analisadas pelo software CLC Genomics Workbench v. 4.6 e submetidas ao Teste de Fisher ($P < 0,03$) para comparação das frequências dos polimorfismos.

Resultados e Discussão

Foram identificados 71 SNPs nos cinco genes estudados com frequência $\geq 3\%$ estando distribuídos em: 17 SNPs no gene *IL-2*, 8 SNPs no *IL-5*, 19 SNPs no *IL-8*, 6 SNPs no *IL-12* e 21 SNPs no *IFN-γ*. A tabela 2 apresenta os principais SNPs encontrados com frequência superior a 50% em todos os animais.

Tabela 2. Frequência observada dos SNPs identificados nos genes *IL-2*, *IL-5*, *IL-8*, *IL-12* e *IFN-γ*.

Gene	SNP	Posição no gene	Polimorfismo	Frequência (%)
<i>IL-2</i>	1	34982423	A/T	100,00
	4	34982941	G/T	52,60
	8	34984041	G/A	57,80
	13	34984738	G/A	100,00
	14	34984895	A/C	57,80
<i>IL-5</i>	4	18327551	A/G	82,46
<i>IL-8</i>	1	86040422	G/A	56,10
	2	66990309	C/T	98,20
	6	66991320	G/C	64,90
<i>IL-12</i>	1	44133610	A/C	68,40
	2	44133664	G/A	92,90
	5	44133960	A/G	77,10
	6	44134096	G/A	68,40

Gene	SNP	Posição no gene	Polimorfismo	Frequência (%)
<i>IFN-γ</i>	7	44134255	T/C	56,10
	8	44134359	C/T	56,10
	9	44134445	T/G	56,10
	12	44134868	T/C	57,80
	13	44134978	T/C	89,40
	17	44135382	T/C	68,40
	18	44135868	C/T	89,40
	20	44137099	A/G	89,40
	21	44137113	A/G	89,40

Desses, somente 4 SNPs foram associados à resistência, sendo significativos para o teste de Fisher (Tabela 3).

Tabela 3. SNPs significativos associados aos animais resistentes e susceptíveis.

Gene	Posição	Polimorfismo	Frequência nos animais resistentes (%)	Frequência nos animais susceptíveis (%)	Valor de P<
<i>IL-8</i>	86040524	T/G	33,30	0,00	0,02
	66990162	G/A	66,67	25,00	0,03
<i>IL-12</i>	66991041	A/G	66,67	25,00	0,02
	44134446	T/G	50,00	8,33	0,03

Os SNPs apresentados na Tabela 3 podem ser potenciais marcadores para resistência às infecções por nematoides gastrintestinais, uma vez que apresentaram associação com essa característica no grupo de animais previamente classificados como resistentes às endoparasitoses gastrintestinais. Embora esses genes tenham sido estudados e identificados em outras espécies, ainda são poucos os estudos considerando caprinos como modelo animal. Bressani et al., 2004, também estudando caprinos F2 identificaram 2 SNPs no gene *IL-2*, 1 no gene *IL-4*, 1 no *IL-13* e 6 no *IFN- γ* e associaram 3 dos 10 SNPs identificados com as características de resistência. A identificação de genes que influenciam a resposta aos nematoides gastrintestinais e conseqüentemente as suas variantes alélicas, contribuem para o entendimento das variações nas respostas dos hospedeiros e podem ser potenciais alvos em programas de seleção como marcadores moleculares. Porém, antes de serem eficientemente usadas, as informações aqui apresentadas devem ser estendidas a toda população e a outras raças de caprinos, para que a sua aplicação seja eficiente, associando corretamente aos marcadores e seus efeitos aditivos.

Conclusões

Dos 71 SNPs identificados nos genes estudados, quatro foram associados à característica de resistência nos genes *IL-8*, *IL-12* e *IFN- γ* , o que os tornam alvos de estudos em toda a população de caprinos a fim de se confirmar essa associação.

Agradecimentos

A Embrapa Caprinos e Ovinos pela formação das populações de caprinos e ao Programa Casadinho/PROCAD da CAPES/CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- BRESSANI, F.A.; TIZIOTO, P.C.; GIGLIOTTI, R.; MEIRELLES, S.L.C.; COUTINHO, L.L.; BENVENUTI, C.L.; MALAGÓ JR, M.; MUDADU, M.A.; VIEIRA, L.S.; ZAROS, L.G.; CARRILHO, E.; REGITANO, R.C.A. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with gastrointestinal nematode infection in goats. *Genetics and Molecular Research*, v.13, n.4, p.8530-8533, 2014.
- TIZIOTO, P.C.; MEIRELLES, S.L.; VENERONI, G.B.; TULLIO, R.R., et al. A SNP in *ASAP1* gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. *Meat Science*, v.92, p.855-857. 2012.
- VIEIRA L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Rev. Ciênc. Tecnol. Agropecuária*: 2:28-31, 2008.
- ZAROS, L.G.; BRICARELLO, P.A.; AMARANTE, A.F.T.; ROCHA, R.A.; KOOYMAN, F.N.J.; VRIES, E. DE.; COUTINHO, L.L. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. *Veterinary Parasitology*, v.171, p. 68-73, 2010.