

XI Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Santa Maria, RS – 07 e 08 de setembro de 2015

Polimorfismos no gene CAST em ovinos Santa Inês

Luís Fernando Batista Pinto¹, Alessandro Lima Machado², Ariana Nascimento Meira², Luiz Lehmann Coutinho³, Evandro Neves Muniz⁴, Hymerson Costa Azevedo⁴, Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt¹

¹Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, Salvador/Bahia, Brasil. E-mail: luisfbp@gmail.com

²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFBA, Salvador/Bahia, Brasil. Bolsista FAPESB.

³Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba/São Paulo, Brasil.

⁴Embrapa Tabuleiros Costeiros – Aracaju/Sergipe, Brasil.

Resumo: O objetivo deste trabalho foi identificar polimorfismo no gene da calpastatina na raça Santa Inês. Para tanto, 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, o preparo da biblioteca e o sequenciamento do gene e posterior identificação dos polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Na região estudada do gene *CAST*, do exon 20-23, cerca de 4108pb (pares de base) foram sequenciados e um total de 7 SNPs identificados, todos em íntron e com registro no banco de dados de SNP do NCBI. As menores frequência genotípicas e alélicas dos sete SNPs foram iguais a 0,13 e 0,39, respectivamente. Assim, os SNPs aqui identificados são boas opções para realização de estudos de associação, mesmo estando localizados em íntron.

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

Polymorphisms in the CAST gene in Santa Ines sheep

Abstract: this study aimed to identify polymorphism in the Calpastatin gene in Santa Ines sheep. For this purpose, 5.0 ml of blood were collected from 96 animals and leukocyte samples were taken for the extraction of genomic DNA. Amplification of the target region, preparation of the library, sequencing of the gene, and identification of single nucleotide polymorphism was performed. In the studied region of CAST gene, exon 20-23, about 4108pb (base pairs) were sequencing and 7 SNPs found, all in intron and registered in the SNP database at NCBI. Smaller genotypic and allelic frequencies of the seven SNPs were equal to 0.13 and 0.39, respectively. Thus, SNPs are good choices for performing association studies, even located in intron.

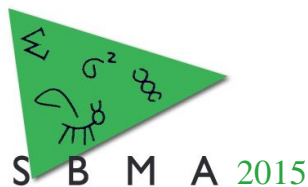
Keywords: biotechnology, genetics, molecular markers, sequencing, sheep breeding,

Introdução

A raça Santa Inês tem grande potencial de produção em regiões semiáridas, como pode ser visto em Jucá et al. (2014), contudo é necessário investir esforços na contínua melhoria de seus atributos. No contexto da qualidade de carne, alguns genes vêm sendo largamente estudados em animais de produção, a exemplo do gene *CAST* que é responsável pela formação da Calpastatina. A Calpastatina é uma enzima que inibe a atividade proteolítica da μ -Calpaína (Lee et al. 1992), o que pode reduzir a maciez da carne. Alguns estudos em bovinos de corte, a exemplo de Pinto et al. (2010), já demonstraram esse efeito sobre a maciez de carne. Portanto, o gene *CAST* é um bom candidato para estudos de associação em animais de produção, sobretudo para características ligadas a qualidade da carne, e o presente estudo teve por objetivo identificar polimorfismos no gene *CAST* em ovinos da raça Santa Inês.

Material e Métodos

Foram avaliados 96 animais da raça Santa Inês, provenientes do campo experimental Pedro Arle, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Frei Paulo, estado de Sergipe, nascidos no período de



2010 e 2012. Coletou-se 5 ml de sangue em tubos *vacutainer* contendo EDTA, 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). Foi escolhido um fragmento do gene estudado, do exon 20-23, com um comprimento de 4108pb. O desenho dos *primers* para a amplificação dos fragmentos do gene da Calpastatina (*CAST*) foi realizado com base nos dados depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com o código de acesso: *CAST* (Gene ID: 443364). Foram utilizados os primers forward 5’ AAAAGCCAAAGAAGAGGATCG 3’ e reverse 3’ GGGAAACCACTTCAGAGACG 5’. Após a amplificação das amostras, foi realizada a purificação dos amplicons. As amostras foram diluídas para 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, observou-se a qualidade e os tamanhos das *reads*, seguindo com a filtragem em função da qualidade das bases sequenciadas e tamanho final dos fragmentos. Foi feito o alinhamento das *reads* contra o genoma referência dos ovinos no NCBI (*Ovis aries*) e logo em seguida a verificação dos SNPs. Por fim, realizou-se a anotação funcional dos SNPs usando o programa VEP (*Variant Effect Predictor*) do *Ensembl*, para identificar as localizações das mutações no genoma e prováveis efeitos funcionais em região codificadora do gene. Foram considerados polimorfismos aquelas mutações que apareceram em mais de dois animais comparados ao genoma referência.

Resultados e Discussão

Foi realizada à amplificação da região alvo do gene da calpastatina das 96 amostras, mas 12 não amplificaram, provavelmente devido a ocorrência de mutação no sítio de alinhamento dos *primers*. Considerando os valores de *Phred* acima de 20, para a filtragem dos SNPs após o sequenciamento, foram identificados 7 SNPs (Tabela 1). Todos os 7 SNPs encontram-se em região de íntron e já possuem registro no banco de dados de SNP do NCBI. Os íntrons são regiões não codificantes do DNA, que participam apenas da transcrição inicial do mRNA, não sendo codificadores de aminoácidos, logo não alteram a sequência de aminoácidos da Calpastatina.

Ressalta-se que para os sete SNPs identificados existe uma boa distribuição de frequência genotípica, com o genótipo menos frequente sendo observado em pelo menos 11 das 84 amostras que amplificaram. Consequentemente, a frequência dos alelos também pode ser considerada boa, onde o alelo menos frequente tem 39% de frequência. Assim, todos os sete SNPs podem ser utilizados em análises de associação com as características de interesse econômico.

Conclusões

Existem pelo menos 7 SNPs no gene *CAST* em ovinos Santa Inês, todos em regiões de íntron e com boa distribuição de frequências genotípicas e alélicas para realização de estudos de associação.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Tabuleiros Costeiros por disponibilizar a infraestrutura e os animais experimentais; Ao Dr. Luiz Lehmann Coutinho por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP; ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido nos projetos 562551/2010-7 e 474494/2010-1; e a FAPESB pelo apoio financeiro concedido via Projeto APP0116/2009.

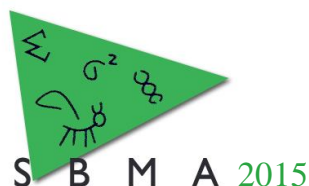


Tabela 1. Frequência alélica e genotípica dos SNPs relacionados ao gene *CAST*, bem como os dados da anotação funcional.

Posição	Região	Variação existente	Base nitrogenada trocada (SNP)	N	Genótipos	Frequência genotípica	Alelos	Frequência alélica
93465792	Intron	<u>rs414639908</u>	G/A	16	GG	0,19	G	0,48
				49	GA	0,58	A	0,52
				19	AA	0,23		
93466082	Intron	<u>rs409851241</u>	A/G	15	AA	0,18	A	0,41
				39	AG	0,46	G	0,59
				30	GG	0,36		
93466576	Intron	<u>rs399204438</u>	A/G	19	AA	0,23	A	0,52
				50	AG	0,59	G	0,48
				15	GG	0,18		
93467136	Intron	<u>rs160120795</u>	G/A	16	GG	0,19	p	0,42
				39	GA	0,46	q	0,58
				29	AA	0,35		
93467152	Intron	<u>rs409258492</u>	C/G	11	CC	0,13	p	0,39
				44	CG	0,52	q	0,61
				29	GG	0,35		
93468722	Intron	<u>rs418818682</u>	C/T	13	CC	0,15	p	0,39
				40	CT	0,48	q	0,61
				31	TT	0,37		
93469260	Intron	<u>rs423886098</u>	A/G	11	AA	0,13	p	0,41
				47	AG	0,56	q	0,59
				26	GG	0,31		

Literatura citada

- Jucá, A. F.; Faveri, J. C.; Melo-Filho, G. M.; Ribeiro-Filho, A. L.; Azevedo, H. C.; Muniz, E. N.; Pinto, L. F. B. 2014. Performance of the Santa Ines breed raised on pasture in semiarid tropical regions and factors that explain trait variation. *Tropical Animal Health and Production*, 46:1249-1256.
- Lee, W. J.; Ma, H.; Takano, E.; Yang, H. Q.; Hatanaka, M.; e Maki, M. 1992. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *Journal Biology Chemistry*, 267: 8437-8442.
- Oliveira, M. C. S.; Regitano, L. C. A.; Roesse, A. D.; Anthonisen, D. G.; Patrocínio, E.; Parma, M. M.; Scagliuse, S. M. M.; Timóteo, W. H. B.; e Jardim, S. N. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste.
- Pinto, L. F. B.; Ferraz, J. B. S.; Meirelles, F. V.; Eler, J. P.; Rezende, F. M.; Carvalho, M. E.; Almeida H. B.; e Silva, R. C. G. 2010. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 9:1431-1442.