Flavia Aline Bressani Donatoni

Prospecção de SNPs por eletroforese capilar e sua
identificação em genes candidatos relacionados à
resistência de caprinos a nematóides gastrintestinais

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2012

Exemplar revisado.

**O exemplar original encontra-se disponível no
Serviço de Pós-Graduação do IQSC-USP.**

Dedico este trabalho à minha família.

*João Paulo Donatoni,
Marilene Aparecida Careggi Bressani,
Flaviane Estela Bressani
João Carlos Bressani (in memoriam)*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida!

A Luciana Regitano, pela oportunidade, pelo incentivo, pela paciência, pela amizade!

A Emanuel Carrilho, pelo apoio, por nunca desistir de mim (mesmo eu lhe dando motivos), pela amizade!

A Embrapa Pecuária Sudeste, representada por Gilberto Batista de Souza e Ana Rita de Araújo Nogueira, pelo incentivo e oportunidade!

Aos amigos do Biomix: Sheila Guterres, Karina Fraige, Juliana Alberice, Maribel Funes Huacca, Regiane Travensolo, Thiago Segato, Wendell Coltro, Gabriela Duarte, Evandro Piccin, Juliane Borba.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal: Gilberto Agostinho, Wilson Malagó-Jr, Polyana Tizioto, Priscila Oliveira, Marcela Rissato, Adriana Ibelli, Marina Ibelli Rocha, Adriana Somavilla, Andressa Lima, Gisele Veneroni, Gustavo Gasparin, Suellen Mello, Rodrigo Giglioti, Ana Luisa Paçó, Renata Coutinho.

Aos professores sempre disponíveis e atenciosos: Luiz Vieira, Samuel Paiva, Lilian Zaros, Sarah Meirelles, Simone Niciura, Maurício Mudadu, Patrícia Tholon, Márcia Oliveira

Muito Obrigada!!!

RESUMO

Citocinas são pequenas moléculas de sinalização celular que desempenham um papel muito importante no sistema imunológico e atuam na comunicação intracelular. Escolheu-se cinco genes pertencentes a essa família com o objetivo de se estudar SNPs que possam estar associados com a resistência à verminose gastrointestinal em caprinos. São eles: IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α . Para isso foi estudada uma população de 229 caprinos. Estes animais foram produzidos na Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, CE) 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 $\log_{10}(n+1)$, onde n é número de ovos por grama de fezes, 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 no resultado dessa análise escolheu-se 44 animais com fenótipos extremos para resistência.

Visando a prospecção de SNPs foram sequenciadas duas regiões do gene IL2, uma região do gene IL4, duas regiões do gene IL13, três regiões do gene IFN γ e quatro regiões do gene TNF α . Foram encontrados dois SNPs no gene IL2 (*intron* 1 e *intron* 2), um SNP no gene IL4 (*intron* 3), um SNP no gene IL13 (*intron* 1), seis SNPs no gene IFN γ (dois no *exon* 1, um no *intron* 1, um no *intron* 2, um no *exon* 3 e um no *exon* 4) e dez SNPs no gene TNF α (dois deles na região promotora do gene, dois no *intron* 2 e seis no *exon* 4). Verificou-se que há alteração de aminoácido na sequência de apenas um dos SNPs encontrados em regiões codificadoras de proteínas. A troca ocorre no segundo SNP localizado no *exon* 1 do gene IFN γ (A/C), onde há alteração do aminoácido asparagina (considerando o alelo A) para treonina (alelo C).

O estudo da associação entre as amostras extremos para resistência e os marcadores tipo SNP foi realizado com o teste de *Fisher* e observou-se que, dentre os vinte SNPs encontrados, oito deles apresentaram um valor de $P \leq 0,05$, o que indica que os SNPs são potenciais marcadores moleculares para resistência à verminose gastrointestinal, ou seja, provavelmente

associados ao fenótipo estudado. Para essa associação ser validada é necessário estudar o efeito desses SNPs na população completa e em outras populações.

ABSTRACT

The cytokines are small cell-signaling proteins that play important role in immunologic system acting in intracellular communication. Five genes from cytokine family, *i.e.*, IL2, IL4, IL13, IFN γ , and TNF α were selected to search for SNPs, which may be associated with goat gastrointestinal endoparasites resistance. A population of 229 goats was produced in Embrapa Caprinos (Sobral, CE, Brazil). This population was an F2 offspring from a F1 intercross, which was in turn produced by crossing Saanen pure breed considered to be susceptible to gastrointestinal endoparasites with Anglo-nubiana pure breed considered to be resistant. Blood samples were collected for DNA extraction and fecal samples were collected for parasite egg counting. The data were transformed in $\log_{10}(n+1)$, where n is the number of eggs per gram of feces, and analyzed by using the mixed model procedure of SAS (2002/2003). The fixed effects included were sex, sampling and age at sampling. The animal variable was used as random effect. After data analyses, forty four phenotypic extremes for endoparasite resistance were selected. Two regions of the gene IL2, one region of each gene IL4 and IL13, three regions of IFN γ , and four regions of TNF α were sequenced in the search for SNPs. Two SNPs were found in the gene IL2 (*intron 1* and *intron 2*), one SNP was found in IL4 (*intron 3*) one SNP in IL13 (*intron 1*) six SNPs in IFN γ (two in the *exon 1*, one in the *intron 1*, one in the *intron 2*, one in the *exon 3*, and one in the *exon 4*) and ten SNPs were found in the gene TNF α (two in the promoter region, two in the *intron 2* and six in the *exon 4*). Among all the SNPs found within *exons* only the second SNP of the IFN γ *exon 1* changes the amino acid. This SNP replaces an asparagine (allele A) by a threonine (allele C). The association study between the extremes and SNPs was performed using the *Fisher* exact test. A number of eight of the twenty described SNPs presented significant P value ($P \leq 0.05$) indicating association with gastrointestinal endoparasite resistance and thus, the potential applicability as molecular markers for genetic improvement efforts involving this disease. To validate the associations, however, is necessary to study the effect of SNPs in a great number of animals and also in a variety of breeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caprino da raça Canindé, produzido no nordeste brasileiro. (http://www.bioclima.info/caprinos.php).	20
Figura 2 - Caprino da raça Marota, produzido no nordeste brasileiro (http://anco.cnpc.embrapa.br/noticias.php?sequencia=188).	21
Figura 3 - Caprino da raça Repartida, produzido no nordeste brasileiro (http://www.agrov.com/animais/sui_cap_ov/repartida.htm).	22
Figura 4 - Caprino da raça Moxotó, produzido no nordeste brasileiro (http://www.bioclima.info/caprinos.php).	23
Figura 5 - Caprino da raça Saanen, produzido no (http://www.caprino-ovinocultura.com.br/site/saanen.php).	24
Figura 6 - Caprino da raça Anglo-nubiana, produzido no (http://anco.cnpc.embrapa.br/racas.html).	25
Figura 7 - Espectrofotômetro para a quantificação do DNA genômico (http://www.genomecenter.ucdavis.edu/expression_analysis/nanodrop.html).	33
Figura 8 - DNA de algumas extrações pelo método <i>salting out</i> . As bandas foram obtidas por eletroforese em gel de agarose 1%, estando bem definidas e sem rastros de degradação indicando a integridade do DNA.	41
Figura 9 - Figura gerada pelo programa Multalin. Alinhamento do gene IL2 completo de bovino (Ensembl) com caprinos (NCBI).	43
Figura 10- Parte do resultado do alinhamento do programa <i>BLAST</i> .	44

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% das amostras de PCR do gene IL2. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B a E: segmento 1 com as temperaturas de hibridização de 50 °C, 52 °C, 54 °C e 55 °C respectivamente; F e K: branco; G a J: segmento 2 com as temperaturas de hibridização de 50 °C, 52 °C, 54 °C e 55 °C respectivamente. 49

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR de DNA de um segmento do gene IL4 de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 (temperatura de hibridização: 56 °C), C: amostra 2 (temperatura de hibridização: 56 °C) e D: branco. 50

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos produtos de PCR de dois segmentos do gene IL13 de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 64 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 64 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 53 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 53 °C) F: branco. 50

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR de três segmentos do gene IFN γ de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 57 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 57 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 55 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 55 °C), F: amostra 1 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 66 °C), G: amostra 2 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 66 °C), H: branco. 51

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2,0 % do produto de PCR de quatro segmentos do gene TNF α de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 60 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 60 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 60 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 60 °C), F: amostra 1 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 55 °C), G: amostra 2 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 55 °C), H: amostra 1 do segmento 4 (temperatura de hibridização: 65 °C), I: amostra 2 do segmento 4 (temperatura de hibridização: 65 °C), J: branco. 51

Figura 16 – Eletroferograma da reação de seqüenciamento do gene IL2 (DNA de caprinos) gerado pelo equipamento *ABI 3100 Avant* da *Applied Biosystems*. Cada conjunto de fita simples de DNA de um mesmo tamanho possui uma dos quatro fluoróforos possíveis na sua extremidade. 53

Figura 17 – Esquema posicionando os vinte SNPs encontrados e suas localizações nos genes estudados. Há 2 SNPs representados no gene IL2, 1 SNP no gene IL4, 1 SNP no gene IL13, 6 SNPs no gene IFN γ e 10 SNPs no gene TNF α .	54
Figura 18 – Esquema posicionando dois SNPs encontrados no gene IL2.	55
Figura 19 - Imagem gerada pelo programa <i>Consed</i> , após análise pelos programas <i>Phred</i> e <i>Phrap</i> . Visualização do SNP (T/A) do primeiro segmento sequenciado do gene IL2. A: amostra de caprino heterozigoto TA, B: caprino homozigoto TT, C: caprino heterozigoto TA.	55
Figura 20 - Localização do SNP (T/A) na sequência consenso amplificada do gene IL2 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam os <i>exons</i> 2 e 3, respectivamente.	56
Figura 21 - Imagem gerada pelo programa <i>Consed</i> , após análise pelos programas <i>Phred</i> e <i>Phrap</i> . Visualização do SNP (G/A) do segundo segmento sequenciado do gene IL2. A: caprino homozigoto GG, B: caprino heterozigoto GA, C: caprino homozigoto GG.	56
Figura 22 - Localização do SNP (G/A) na sequência consenso do gene IL2 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam o <i>exon</i> 3.	57
Figura 23 – Esquema posicionando o SNP encontrado no gene IL4.	57
Figura 24 - Imagem gerada pelo programa <i>Consed</i> , após análise pelos programas <i>Phred</i> e <i>Phrap</i> . Visualização do SNP (A/C) do segmento sequenciado do gene IL4. A: caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AC, C: caprino homozigoto CC.	58
Figura 25 - Localização do SNP (A/C) na sequência consenso do gene IL4 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam o <i>exon</i> 2.	58
Figura 26 – Esquema posicionando o SNP encontrado no gene IL13.	59
Figura 27 - Imagem gerada pelo programa <i>Consed</i> , após análise pelos programas <i>Phred</i> e <i>Phrap</i> . Visualização do SNP (C/T) do segmento sequenciado do gene IL13. A: caprino homozigoto CC, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto TT.	59

Figura 28 - Localização do SNP (T/C) na sequência consenso do gene IL13 de caprinos. As 60
letras em negrito e em itálico representam os *exons* 2 e 3, respectivamente.

Figura 29 – Esquema posicionando os seis SNPs encontrados no gene IFNg. 60

Figura 30 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e 61
Phrap. Visualização do primeiro SNP (C/T) do segmento 1 sequenciado do gene IFNg. A:
caprino heterozigoto CT, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto CC.

Figura 31 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e 61
Phrap. Visualização do segundo SNP (A/C) do segmento 1 sequenciado do gene IFNg. A:
caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AC, C: caprino homozigoto CC.

Figura 32- Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e 62
Phrap. Visualização do terceiro SNP (G/A) do segmento 1 sequenciado do gene IFNg. A:
caprino heterozigoto GA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto AA.

Figura 33 - Localização dos SNPs (C/T), (A/G) e (G/A) na sequência consenso do primeiro 62
segmento do gene IFNg de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam o *exon* 1.

Figura 34 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e 63
Phrap. Visualização do primeiro SNP (T/C) do segmento 2 sequenciado do gene IFNg. A:
caprino heterozigoto TC, B: caprino homozigoto TT, C: caprino homozigoto CC.

Figura 35 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e 64
Phrap. Visualização do segundo SNP (T/C) do segmento 2 sequenciado do gene IFNg. A:
caprino homozigoto CC, B: caprino homozigoto TT, C: caprino heterozigoto TC.

Figura 36 - Localização de ambos SNPs (T/C) na sequência consenso no segundo segmento 64
do gene IFNg de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam os *exons* 2 e 3,
respectivamente.

Figura 37 – Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (G/T) do segmento 3 sequenciado do gene IFN γ . A: caprino homozigoto GG, B: caprino heterozigoto GT, C: caprino heterozigoto GT e D: caprino homozigoto TT. 67

Figura 38 – Localização do SNP (G/T) da sequência consenso do *exon* 4 do gene IFN γ de caprinos. As letras em negrito e em *itálico* representam parte do *exon* 4. 66

Figura 39 – Esquema posicionando os dez SNPs encontrados no gene TNFa. 66

Figura 40 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (C/A) e do SNP (G/A) do segmento 1 do gene IFN γ . A: caprino homozigoto CC (SNP1) e homozigoto GG (SNP2), B: caprino homozigoto CC (SNP1) e homozigoto GG (SNP2), C: caprino homozigoto AA (SNP1) e homozigoto AA (SNP2). 67

Figura 41 - Localização dos dois SNPs encontrados com o sequenciamento do primeiro segmento do gene TNFa. O primeiro SNP (C/A) e o segundo SNP (G/A) estão localizados na região promotora do gene. As letras em negrito e em *itálico* representam o *exon* 1. 67

Figura 42 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (G/A) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG, B: caprino homozigoto GG, C: caprino heterozigoto GA e D: caprino heterozigoto GA. 68

Figura 43 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (C/G) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG, B: caprino homozigoto CC, C: caprino heterozigoto CG. 69

Figura 44 - Localização dos dois SNPs encontrados com o sequenciamento do segundo segmento do gene TNFa. O primeiro SNP (G/A) e o segundo SNP (C/G) estão localizados no *intron* 2 do gene. As letras em negrito e em *itálico* representam os *exons* 2 e 3, respectivamente. 69

Figura 45 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (G/T) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino heterozigoto GT, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto TT e D: caprino heterozigoto GT. 70

Figura 46 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (G/A) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino heterozigoto GA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto AA e D: caprino heterozigoto GA. 71

Figura 47 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do terceiro SNP (C/T) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino homozigoto CC, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto CC. 71

Figura 48 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do quarto SNP (G/A) e do quinto SNP (A/G) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG (SNP3) e homozigoto AA (SNP4), B: caprino homozigoto GG (SNP3) e homozigoto GG (SNP4), C: caprino heterozigoto GA (SNP3) e homozigoto AA (SNP4), D: caprino heterozigoto GA (SNP3) e heterozigoto AG (SNP4). 72

Figura 49 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do sexto SNP (A/G) do terceiro segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto AA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino heterozigoto AG. 73

Figura 50 - Localização dos seis SNPs encontrados com o sequenciamento do terceiro segmento do gene TNFa. A sequência consenso é parte do *exon* 4 do gene. Todos os SNPs estão localizados no *exon* 4. 74

Figura 51 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (A/G) do quarto segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AG, C: caprino homozigoto GG. 75

- Figura 52 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (A/G) do quarto segmento do gene TNFa. A: caprino heterozigoto AG, B: caprino homozigoto AA, C: caprino homozigoto AA. 75
- Figura 53 - Localização dos dois SNPs encontrados com o seqüenciamento do quarto segmento do gene TNFa. O segmento amplificado, representado na figura, é parte do *exon 4* do gene. Ambos os SNPs estão localizados no *exon 4*. 76
- Figura 54 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de ARMS-PCR de amostras com genótipos conhecidos. Amostra A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, amostra B: caprino homozigoto AA, amostras C e D: caprinos heterozigotos TA, amostras E e F: caprinos homozigotos TT, amostra G: branco. 82
- Figura 55 – Bandas alelo-específicas resultado da técnica PCR-ARMS. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2%. Amostra A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, amostras B: animais homozigotos TT, amostras C: animais heterozigotos TA, amostras D: animais homozigotos AA e amostra E: branco. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade dos reagentes utilizados para o sequenciamento de uma amostra de produto de PCR utilizando-se kit comercial (<i>Applied Biosystems</i>).	37
Tabela 2 - Parâmetros dos <i>primers</i> para amplificação de parte do DNA das interleucinas 2, 4 e 13 incluindo os <i>exons</i> de interesse.	46
Tabela 3 - Parâmetros dos <i>primers</i> para amplificação de parte do DNA do gene IFN γ incluindo os <i>exons</i> de interesse.	47
Tabela 4 - Parâmetros dos <i>primers</i> para amplificação de parte do DNA do gene TNF α incluindo os <i>exons</i> de interesse.	47
Tabela 5 - Descrição dos <i>primers</i> para sequenciamento dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α .	48
Tabela 6– Frequências alélicas e genotípicas dos dois SNPs do gene IL2 e dos SNPs dos genes IL4 e IL13 com seus respectivos valores de P do teste de <i>Fisher</i> .	77
Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene IFN γ e valores de P do teste de <i>Fisher</i> .	78
Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs dos segmentos 1 e 2 do gene TNF α e valores de P do teste de <i>Fisher</i> .	80
Tabela 9 – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do segmento 3 do gene TNF α e valores de P do teste de <i>Fisher</i> .	81
Tabela 10 – Resumo das análises de variância, incluindo o efeito do marcador para a medida de OPG	83
Tabela 11 – Frequências alélicas e genotípicas do SNP encontrado no gene IL2 dos caprinos com raças comuns no nordeste brasileiro.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ensembl – banco de dados de informações biológicas

FASTA – formato de representação da sequência de nucleotídeos. Na primeira linha inicia-se com o símbolo “>” e uma breve descrição. Na linha abaixo coloca-se a sequência de bases.

IFN γ – interferon gama

IL2 – interleucina 2

IL4 – interleucina 4

IL13 – interleucina 13

Multalin – software para alinhamento de sequências (multiple sequence alignment with hierarchical clustering)

NCBI – centro nacional de informações em biotecnologia (national Center for biotechnology information)

OPG – contagem de ovos por grama de fezes

PCR – reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

Primers – oligonucleotídeos iniciadores

RFLP – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (restriction fragment length polymorphism)

SAS – software de análise estatística (statistical analysis system)

SNP – polimorfismo de base única (single – nucleotide polymorphism)

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Caprinocultura no Brasil	19
1.1.1 A raça Canindé	20
1.1.2 A raça Marota	20
1.1.3 A raça Repartida	21
1.1.4 A raça Moxotó	22
1.1.5 A raça Saanen	23
1.1.6 A raça Anglo-nubiana	24
1.2 Verminose gastrintestinal	25
1.3 Sistema imunológico e citocinas	26
1.4 Marcadores moleculares	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Animais e avaliações fenotípicas	31
3.2. Extração de DNA	32
3.2.1. Procedimento para separação de leucócitos do sangue	32
3.2.2. Extração de DNA com o método <i>salting out</i>	32
3.2.3. Análise espectrofotométrica para quantificação de DNA no Equipamento Nanodrop ^R	33
3.2.4. Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade do DNA extraído	34
3.3 Busca da sequência dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α de caprinos em bancos de dados <i>NCBI</i> e <i>Ensembl</i>	34
3.4 Alinhamento das sequências	34
3.5 Amplificação de <i>exons</i> pela reação em cadeia da polimerase	35
3.5.1 Eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade do <i>amplicon</i> formado	36
3.6 Purificação da reação de PCR para posterior sequenciamento	36
3.7 Reação de Sequenciamento	36
3.7.1 Purificação em placa com 96 poços	37
3.7.2 Análise por eletroforese capilar com sequenciador automático <i>ABI3100</i> <i>Avant</i> da <i>Applied Biosystems</i>	38

3.8	Verificação da associação dos SNPs encontrados com a resistência à verminose gastrointestinal	38
3.9	PCR-ARMS para genotipagem da população	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1.	Extração, quantificação e avaliação da integridade do DNA de caprinos	40
4.2.	Alinhamento de sequências, desenho de <i>primers</i> para sequenciamento de <i>exons</i> dos genes IL2, IL4, IL13, IFNg e TNFa	42
4.3.	Reação em cadeia da polimerase	49
4.4.	Purificação do produto de PCR	52
4.5.	Reação de sequenciamento e purificação dos produtos da reação	52
4.6.	Prospecção de SNPs	54
4.6.1.	Gene IL2	55
4.6.2.	Gene IL4	57
4.6.3.	Gene IL13	59
4.6.4.	Gene IFNg	60
4.6.5.	Gene TNFa	66
4.7	Estudo da possível alteração de aminoácido	76
4.8	Frequências alélicas e genotípicas dos extremos de resistência	76
4.9	Genotipagem do SNP 1 do gene IL2 na população de caprinos do cruzamento das raças Anglo-nubiana e Saanen	82
4.9.1	Genotipagem do SNP 1: raças de caprinos encontradas no nordeste brasileiro	83
5	CONCLUSÕES	85
6	TRABALHOS FUTUROS	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caprinocultura no Brasil

Os caprinos são animais produtores de leite, carne, couro, pelo e esterco. Em 2009 consta 9,2 milhões de cabeças no rebanho nacional. Dos 9,2 milhões do efetivo nacional em 2009, 8,3 milhões estão na região nordeste; 340 mil no sul; 230 mil no sudeste; 180 mil na região norte e 120 mil no centro-oeste.¹

Sabe-se que a região nordestina brasileira apresenta grandes limitações para as atividades agropecuárias. Há temperaturas elevadas, irregularidades das precipitações, o solo geralmente é raso e pedregoso, o que afeta a produção vegetal e a fisiologia dos animais. Porém essa região é destaque na criação de ruminantes domésticos, como ovinos e caprinos, espécies que tem boa adaptabilidade a essas condições.²

O Brasil encontra-se numa posição privilegiada no agronegócio para caprinos de corte, apesar do baixo nível tecnológico de algumas regiões. Sabe-se que a tecnologia disponível muitas vezes não é de fácil acesso ao pequeno produtor.³ Os caprinos são bem adaptados ao clima quente e seco. Diante do cenário da agropecuária no Brasil, esta pode ser considerada uma atividade principalmente de pequenos e médios produtores e pode ser estimulada em praticamente todos os municípios brasileiros, considerando as aptidões naturais de cada região. É considerada uma atividade de geração de emprego e renda, visando à diminuição da concentração de renda no Brasil, principalmente no meio rural.⁴

A produção de caprinos e ovinos tem a vantagem de maior produção de quilos de carne por hectare em um menor espaço de tempo. Em um hectare pode-se produzir por ano 500 kg de peso vivo de cordeiro, enquanto que, se a produção nesse mesmo espaço for de bovinos, será de 150 kg de peso vivo.⁵

De maneira geral, algumas raças são principais produtoras de leite, dentre elas destacam-se as raças Saanen, Alpina, Toggenburg, Canindé (variação entre as Alpinas) e outras principais produtoras de carne, como exemplo, a raça Boher que tem origem africana; a Savanna, relativamente nova no Brasil e que tem origem na África do Sul. A Anglo-nubiana é de aptidão mista, uma raça considerada produtora de carne e leite.⁶

As raças brasileiras podem ser consideradas de baixa produção de leite, apresentam porte reduzido e pelos curtos. São perfeitamente adaptadas ao meio ambiente e quando bem manejadas e alimentadas podem se reproduzir o ano todo. Os caprinos que foram introduzidos

no nordeste do Brasil por colonizadores deram origem aos conhecidos como Canindé, Marota, Repartida e Moxotó.

1.1.1 A raça Canindé

A raça Canindé tem peso adulto entre 30 e 40 kg e altura aproximada de 55 cm. Tem chifres de coloração escura, dirigindo-se para trás, os pelos são pretos, com o ventre e o lombo listrados de cor castanho claro ou escuro. Apresenta manchas amarelas ou brancas em torno dos olhos e duas listas dessa mesma coloração (Figura 1). São criadas principalmente para a produção de leite. Os estados mais adequados para sua produção são Piauí, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Ceará.⁶

Figura 1- Caprino da raça Canindé, produzido no nordeste brasileiro. (<http://www.bioclima.info/caprinos.php>).

1.1.2 A raça Marota

Animais da raça Marota, também denominada Curaçá, são de pequeno porte, os adultos pesam aproximadamente 36 kg. Tem a pelagem branca, uniforme. Essa é uma das características principais dessa raça, porém alguns caprinos podem ser encontrados com pequenas pintas escuras na face interna das orelhas. Os chifres são amarelo-claro, divergentes, voltados pra trás e para fora, grossos na base e afinados nas pontas. Possuem um aspecto elegante, com orelhas pequenas e pescoço delgado (Figura 2). Podem ser explorados principalmente para a produção de carne e pele, em clima quente e seco, praticamente em todo o nordeste brasileiro.⁶

Figura 2 - Caprino da raça Marota, produzido no nordeste brasileiro (<http://anco.cnpc.embrapa.br/noticias.php?sequencia=188>).

1.1.3 A raça Repartida

Os caprinos da raça Repartida são também conhecidos como surrão, devido à mistura de pelos claros e pretos, apresentam peso médio adulto de 36 kg. Tem a pelagem na parte anterior do corpo de coloração prata, e coloração baia ou cinza na parte posterior do corpo, dividindo o animal ao meio, de forma irregular. Apresentam pescoço delgado, cabeça escura com manchas baias irregulares, orelhas medianas manchadas e com a parte interna preta. Os membros também apresentam manchas pretas nas extremidades, as coxas, as pernas e os quartos posteriores também são pretos. Os chifres são de tamanho médio, com as extremidades viradas, dirigidos para trás, para cima e para os lados (Figura 3). São exploradas principalmente para a produção de carne e pele em todo o nordeste brasileiro.^{6,7}

Figura 3 - Caprino da raça Repartida, produzido no nordeste brasileiro (http://www.agrov.com/animais/sui_cap_ov/repartida.htm).

1.1.4 A raça Moxotó

O nome da raça vem do Vale de Moxotó, de Pernambuco. Esses caprinos são muito encontrados no nordeste brasileiro, principalmente em Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Bahia. As fêmeas adultas tem entre 30 e 40 kg e os animais atingem 62 cm de altura, aproximadamente. Pelagem de coloração baia ou cinza, ou mais clara e os pelos são curtos, lisos e brilhantes caracterizam os animais da raça. São características ainda, lista negra que se estende do bordo superior do pescoço à base da cauda, auréola negra em torno dos olhos e duas listras negras até a ponta do focinho. Outras partes também são negras: orelhas, face ventral do corpo, extremidades dos membros, abaixo dos joelhos e garrões, mucosas, unhas, úberes. Tem chifres de comprimento médio, em curvatura regular, para fora, para cima e para trás. Geralmente os machos apresentam barba (Figura 4). São exploradas principalmente para a produção de pele, porém é considerada pelo padrão homologado da Associação Brasileira dos Criadores de Caprinos (ABCC) como raça de múltipla aptidão, produtora de leite, pele, e carne.^{6, 8}

Figura 4 - Caprino da raça Moxotó, produzido no nordeste brasileiro (<http://www.bioclima.info/caprinos.php>).

1.1.5 A raça Saanen

Os caprinos da raça Saanen tem origem Suíça e são os mais explorados para aptidão leiteira. Apresentam bom desempenho em clima temperado, as fêmeas possuem de 45 a 60 kg e machos apresentam peso de 70 a 90 kg. A altura pode variar de 70 a 83 cm para a cabra e de 80 a 95 cm para os bodes. Tem a pelagem branca, porém encontra-se também na pelagem cor creme. Os pelos são finos e curtos e podem ser longos no lombo e nas coxas. Podem ter pequenas manchas de coloração escura na pele e nos pelos. As orelhas são delicadas, pescoço fino e longo. Normalmente os caprinos dessa raça não apresentam chifres (Figura 5). São exploradas principalmente para a produção de leite e para o melhoramento genético. A região mais adequada para sua produção é Europa e Estados Unidos.⁶

Com o cruzamento de cabras brasileiras e animais de várias importações como os da Suíça, Alemanha, França, Inglaterra, Holanda, Estados Unidos, Canadá, e Nova Zelândia, o Brasil conseguiu alcançar a produção de animais de boa qualidade. Os caprinos Saanen do Brasil já são até exportados para países como Argentina e Uruguai.⁹

Figura 5 - Caprino da raça Saanen, produzido no nordeste brasileiro (<http://www.caprino-ovinocultura.com.br/site/saanen.php>).

1.1.6 A raça Anglo-nubiana

A raça Anglo-nubiana é de origem inglesa, originária do cruzamento de caprinos nubianos importados da África, Arábia e Índia e caprinos importados nativos, na Inglaterra. São animais considerados rústicos, de grande porte, tem boa adaptabilidade no Brasil, porém evita-se regiões muito úmidas. Produz animais precoces, com boa aptidão leiteira, os cabritos vão para o abate com 21 a 22 kg. São criadas para a produção de leite e carne, porém é a raça que produz mais carner.¹⁰

Tem cabeça pequena, levantada e por isso é conhecida como “a cabra de nariz romano”. Tem aspecto alerta e atraente (Figura 6), as orelhas são grandes, pesadas e caídas. Apresenta pescoço médio e fino e não possuem chifres. Possuem membros fortes, o peso da cabra é no mínimo de 55 kg e do bode 75 kg. A fêmea tem de 60 a 70 cm e o bode de 70 a 90 cm. A pelagem é muito variada, geralmente malhada com pelos curtos e de grossura regular. Os estados mais adequados para sua produção são: Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro.

Figura 6 - Caprino da raça Anglo-nubiana, produzido no nordeste brasileiro (<http://anco.cnpc.embrapa.br/racas.html>).

1.2 Verminose gastrointestinal

A verminose gastrointestinal é um dos problemas enfrentados pelo produtor que causa sérios prejuízos ao rebanho, reduzindo o retorno econômico da atividade devido à morte dos animais e perda do desempenho do rebanho.¹¹ Esses prejuízos podem ser em bovinos, ovinos ou caprinos e afeta o agricultor de modo geral, os de pequeno e grande porte.

O parasito que se destaca entre caprinos e ovinos é o *Haemonchus contortus*. Como se alimenta de sangue, em curto período de tempo os animais adquirem anemia grave e a resposta imunológica é lenta e incompleta.^{12,13}

O controle da verminose é feito através da aplicação de anti-helmínticos, porém ao longo do tempo os parasitas ficam mais resistentes ao produto, o uso indiscriminado do mesmo pode deixar resíduos no leite, na carne, no ambiente, causando prejuízos à saúde e ao meio ambiente.¹⁴⁻¹⁸ Uma alternativa para a diminuição do uso de anti-helmínticos é a seleção de animais naturalmente resistentes à verminose. O presente trabalho visa contribuir como uma ferramenta para a seleção de animais naturalmente resistentes. A identificação de marcadores genéticos associados à resistência à verminose permite a seleção destes para utilizá-los em programas de melhoramento genético animal assistido por marcadores MAS (*marker assisted selection*). Para identificação desses marcadores foram escolhidos cinco genes: interleucina 2 (IL2), interleucina 4 (IL4), interleucina 13 (IL13), fator de necrose tumoral alfa (TNFa) e interferon gama (IFNg), que pertencem à família das citocinas, moléculas atuantes no sistema imunológico.

1.3 Sistema imunológico e citocinas

O sistema imunológico é basicamente dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A resposta imune inata é muito importante para a resposta imune adaptativa. É a primeira linha de defesa do organismo. A maioria dos agentes infecciosos induz repostas inflamatórias pela atuação da imunidade inata. Essa primeira linha de defesa é conduzida por macrófagos e neutrófilos, que nem sempre conseguem eliminar o organismo infeccioso.¹⁹

Uma série de receptores codificados por genes não rearranjados, que discriminam entre uma superfície autólogas e microbianas estranhas, ou entre células normais e infectadas, são utilizados pela resposta imune inata. A resposta imune inata pode evitar o estabelecimento de uma infecção, ou se ocorrer falha, ela pode conter e evitar que o patógeno se espalhe pela corrente sanguínea enquanto o organismo desenvolve a resposta imune adaptativa.

Uma infecção inicial pode levar a uma doença perceptível seguida de uma resposta imune adaptativa do hospedeiro. É iniciada nos tecidos linfóides locais como resposta dos antígenos apresentados pelas células dendríticas, quando a resposta imune inata é ativada e passam a ser produzidas células T antígeno-específicas e células B secretoras de anticorpos por vários dias. Durante esse tempo de produção a resposta inata continua atuando. Após esse período, as células T antígeno-específicas e os anticorpos são liberados na circulação e vão para o local da infecção. Para que a cura ocorra, os anticorpos devem eliminar as partículas infecciosas extracelulares e as células T efetoras atuam para eliminar os resíduos intracelulares da infecção.

Os agentes infecciosos podem ser vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos ou vermes. Os protozoários e vermes são agrupados como parasitas. Frente à essa variedade de agentes, houve necessidade de que o hospedeiro desenvolvesse duas características notáveis da imunidade adaptativa: a primeira é o desenvolvimento de receptores de células B e T de igual ou maior diversidade, devido a necessidade de reconhecimento de uma grande variedade de patógenos diferentes; a segunda é que, como os diferentes ciclos de vida e *habitats* dos patógenos agressores precisam ser neutralizados, há vários mecanismos efetores.¹⁹

As citocinas fazem parte do grupo das proteínas ou peptídeos, algumas podem conter moléculas de açúcar ligada, são moléculas que podem atuar em diferentes tipos de células, tem vida média curta e ação extremamente potente.

Há diferentes citocinas que são enquadradas em várias categorias. São produzidas à medida que são necessárias à resposta imune, na fase de ativação e fase efetora, para mediar e

regular a resposta inflamatória. As citocinas induzidas pelo patógeno influenciam a diferenciação de células T CD4 virgens em diferentes subclasses de células T efectoras.²⁰

O que determina se a resposta imune adaptativa será dominada pela ativação de macrófagos ou pela produção de anticorpos é fundamental para a evolução do processo. Essa etapa crucial é a etapa em que a célula T CD4 virgem se torna uma célula T_H1 ou T_H2 armada e ocorre durante a resposta inicial ao antígeno, nos tecidos linfóides periféricos.

Embora os mecanismos de controle dessa etapa não sejam bem conhecidos, estudos indicaram que as células T CD4 inicialmente estimuladas na presença de IL12 e IFN γ tendem a se desenvolver em células T_H1, pois o IFN γ inibe a produção de células T_H2. As células T CD4 ativadas na presença de IL4, quando o IL6 também está presente, tendem a se diferenciar em células T_H2.

Os genes estudados nesse trabalho codificam as citocinas IL2, IL4, IL13, TNF α e IFN γ que atuam em importantes fases da evolução da resposta imune adaptativa.²¹⁻³³ A interleucina 2 (IL2) induz a maturação dos linfócitos B e maturação das células T, a interleucina 4 (IL4) é produzida pelos linfócitos T e inibe a atuação dos macrófagos. O fator de necrose tumoral (TNF) está relacionado com inflamações sistêmicas e causa a morte apoptótica de células, proliferação celular, diferenciação, combate tumores e replicação viral. A interleucina 13 (IL13) é produzida principalmente pelas células T_H2. Está associada à inflamações alérgicas e infecções parasitárias, induz a produção do muco por células epiteliais do pulmão. Atua na proliferação, diferenciação e função secretória das células epiteliais brônquicas. O gene IFN γ tem atividade imunoregulatória, antiviral e antitumoral. É um potente ativador de macrófagos.

Dada sua grande importância no sistema imunológico, os genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α foram escolhidos para a prospecção de marcadores moleculares para a verificação da possível associação com a resistência a verminose.

1.4 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares podem ser definidos como polimorfismos na molécula de DNA e são relacionados com algum fenótipo conhecido. São muito estudados como uma ferramenta na biotecnologia que, associado a ferramentas tradicionais, contribuem para o estudo do melhoramento animal.

Desde os anos 80 há estudos na tentativa de desenvolver e caracterizar marcadores moleculares de interesse zootécnico. Inicialmente foi estudado o tipo de marcador conhecido

como polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) em suínos e bovinos.^{34,35} Posteriormente estudos foram realizados para a identificação de marcadores tipo microssatélites em suínos, bovinos e eqüinos, nos anos 90.³⁶⁻⁴⁰ Com a invenção de sequenciadores automáticos iniciou-se o estudo de marcadores com a utilização de fluoróforos para a detecção de alelos, ao invés de radioisótopos. Com os avanços tecnológicos, surgiram metodologias de alto desempenho e baixo custo para a prospecção de marcadores tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*).⁴¹

O presente trabalho está focado no estudo de SNPs, um tipo de polimorfismo considerado uma mutação pontual, ou seja, variações de uma única base na mesma posição no DNA que podem ser substituições, deleções e adições de nucleotídeos.⁴²⁻⁴⁷ Em uma população, a alteração de uma base pode ser considerada um SNP se estiver presente em uma quantidade maior que 1%, caso contrário pode ser considerada uma mutação ao acaso.

Recentemente uma nova tecnologia baseada em *chip* para genotipagem de 50 mil e 770 mil SNPs é comercializada pela empresa *Illumina*. Essa tecnologia implica em um avanço considerável para prospecção de SNPs. Em um único experimento automatizado pode-se genotipar aproximadamente 50 mil SNPs ou 770 mil SNPs. Esse tipo de análise baixa o custo e acelera significativamente a velocidade na qual o trabalho é realizado. Está disponível também como serviço terceirizado, diminuindo gastos com equipamento e mão de obra para a obtenção dos dados. É encontrado comercialmente para espécies com o genoma conhecido, como humanos e bovinos. A tecnologia de *chip* para caprinos foi lançada comercialmente em julho de 2011, quando esse trabalho já se encontrava bastante avançado.

A ferramenta utilizada neste trabalho para o estudo de marcadores do tipo SNP é a técnica conhecida como eletroforese. Esta técnica baseia-se na migração diferencial de espécies carregadas quando é aplicado um potencial elétrico. Na biologia molecular a eletroforese é utilizada, como exemplo, para a verificação da integridade de DNAs e RNAs extraídos, para uma pré-confirmação da formação de produtos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) antes de um processo de sequenciamento ou genotipagem, para a estimativa de quantidades e tamanhos de proteínas, etc. A eletroforese capilar será a técnica utilizada para o sequenciamento de DNA de caprinos para a prospecção de SNPs.

Na literatura encontram-se poucos estudos sobre marcadores moleculares do tipo SNP em caprinos. Pariset *et al.* relata que, em 2006, não havia trabalhos no NCBI, na base de dados dbSNP relacionando SNPs em caprinos. Encontravam-se apenas 26 marcadores citados na literatura.^{48, 49} Atualmente o número de trabalhos aumentou, mas é pequeno quando comparado a quantidade de trabalhos publicados em bovino.⁵⁰⁻⁵⁶

Há um consórcio, denominado Econogene que estuda marcadores para caprinos. Este consórcio foi fundado pela União Européia e tem como membros pesquisadores de diversos países da Europa. Além do objetivo da conservação de pesquisas com caprinos e ovinos, também tem como objetivo o desenvolvimento rural em áreas marginais da Europa e busca a conservação sustentável de pesquisas de genética animal em áreas rurais marginais. Faz estudos em genética molecular, procedimentos sócio-econômicos e geoestatísticos. O consórcio Econogene apresenta uma lista marcadores do tipo microssatélites em caprinos e ovinos.⁵⁷

Atualmente, não se encontram na literatura trabalhos relacionando SNPs com a verminose gastrointestinal em caprinos. Há trabalhos que relacionam outros fenótipos como produção de leite e porcentagem de gordura, estudo sobre a caseína do leite, estudos com relação às características de produção e crescimento, estatura, prolificidade, características para produção de pele e fibras de cashmere.⁵⁸⁻⁶⁶

2 OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste estudo foi a prospecção de marcadores moleculares que possam estar relacionados com a verminose gastrointestinal em caprinos e dessa forma, contribuir com programas de melhoramento genético animal assistido por marcadores moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar os objetivos gerais, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Realizar cruzamento de animais resistentes e susceptíveis a verminose gastrointestinal. Analisar a característica fenotípica da suscetibilidade/resistência por meio da contagem de ovos por grama de fezes (OPG); coleta de sangue dos animais visando a obtenção de variabilidade genética.
- Analisar com ferramentas da bioinformática previamente as sequências depositadas em bancos de dados, de vários genes do sistema imunológico para verificação de similaridade e desenho de *primers* para amplificação de fragmentos contendo *exons*.
- Sequenciar por eletroforese capilar e analisar o DNA para a prospecção de SNPs.
- Verificar a possível associação dos polimorfismos encontrados com o fenótipo de interesse (resistência à verminose).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e avaliações fenotípicas

Para a realização desse projeto, contou-se com várias parcerias. A população de 229 animais foi produzida na Embrapa Caprinos, em Sobral, Ceará, sob coordenação do Dr. Luiz Vieira. Essa população foi produzida com o cruzamento de animais das raças Saanen e Anglo-nubiana. Sabe-se que a raça Anglo-nubiana é mais resistente à verminose gastrointestinal que outros animais, e que raça Saanen mostra-se menos tolerante à verminose quando comparados a outras raças.⁶⁷ Foram cruzados quatro reprodutores da raça Anglo-Nubiana e 70 matrizes da raça Saanen. A terceira geração de animais, considerada F2, continha 229 animais distribuídos em 4 lotes. Foram coletadas amostras de sangue para a posterior etapa de extração de DNA, realizada no laboratório de biotecnologia animal, Embrapa Pecuária Sudeste, coordenado pela pesquisadora Dra. Luciana Regitano.

A caracterização fenotípica estudada, a análise de ovos por grama de fezes (OPG), foi avaliada também na Embrapa Caprinos, sob coordenação do pesquisador Dr. Luis Vieira, com participação da Dra. Lilian Gioto Zaros, da UFRN. O presente trabalho tomou como base para a análise estatística as medidas de ovos por grama fezes (OPG) da população.

Após a contagem do OPG, os valores foram trabalhados com a cooperação da Dra. Sarah Laguna Meirelles, da UFLA, Lavras. Os dados foram transformados em $\log_{10}(n+1)$, onde n é número de ovos por grama de fezes, e analisados usando o procedimento dos modelos mistos do SAS 2002/2003 (*Statistical Analysis Systems*). Os efeitos fixos incluídos no modelo foram, sexo, coleta, ano. A idade do animal na data da coleta foi incluída como covariável e a variável animal foi utilizada como efeito aleatório.

Após a análise estatística determinou-se os animais localizados nos extremos da distribuição dos valores de OPG. Foram selecionados para prospecção de SNPs 22 animais considerados resistentes à verminose gastrointestinal e 22 animais susceptíveis, com base nos valores de OPG.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido de amostras de sangue. Na primeira etapa, o sangue foi tratado com solução de hemólise para o isolamento de leucócitos, para posterior lise das células e separação química do DNA, conforme descrito a seguir.

3.2.1 Procedimento para separação de leucócitos do sangue

As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacutainer contendo como anticoagulante 50 μL de EDTA potássico 15%. O sangue foi transferido a um tubo tipo Falcon de 15 mL. Adicionou-se 10 mL de solução tampão de hemólise composta por Tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,6; MgCl_2 5 mmol L^{-1} e NaCl 10 mmol L^{-1} . A solução foi homogeneizada em um agitador tipo *vortex*. Centrifugou-se por 10 min a 700 $\times g$. Descartou-se o sobrenadante. O precipitado ou *pellet* resultante foi tratado então com 5 mL de solução de hemólise, o tubo foi homogeneizado em *vortex* até sua dissolução completa. Centrifugou-se novamente por 10 min a 700 $\times g$ e descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Obteve-se um *pellet* de cor branca, sem resíduos de hemoglobina. Esse *pellet* foi ressuspendido em 500 μL da solução de hemólise descrita acima e transferido para um microtubo de 1,5 mL. Centrifugou-se novamente por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e a amostra foi devidamente rotulada com um número de laboratório, armazenada em caixa de papelão, em freezer 20 °C. Esse procedimento foi realizado para as 229 amostras de sangue.

3.2.2 Extração de DNA com o método *salting out*

Adicionou-se ao microtubo de 1,5 mL contendo o *pellet* da etapa anterior, 500 μL de solução de lise (Tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH8, NaCl 100 mmol L^{-1} , EDTA 10 mmol L^{-1} pH 8, SDS 0,5%, proteinase K 0,1 mg/mL). Dissolveu-se o *pellet* com o auxílio de um *vortex*. Incubou-se a 55 °C em um *termomixer* com agitação *overnight*. Adicionou-se 210 μL de uma solução de TE 7,6 (Tris-HCl 10 mmol L^{-1} pH 7,6 e EDTA 1 mmol L^{-1} pH 8) e 240 μL de NaCl 5 mol L^{-1} . Agitou-se por inversão e incubou-se em banho de gelo por 10 min. Centrifugou-se por 15 min a 16000 $\times g$.

Coletou-se aproximadamente 500 μL de sobrenadante em dois tubos. Adicionou-se em cada tubo 1 mL de etanol gelado e misturou-se por inversão. Centrifugou-se por 15 min a 16000 $\times g$ e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500 μL de etanol 70% gelado e centrifugou-se a 16000 $\times g$ por 5 min. Novamente descartou-se o sobrenadante e esperou-se secar com o tubo aberto e invertido sobre papel absorvente.

Adicionou-se em cada tubo contendo o DNA extraído 250 μL de uma solução contendo 249,875 μL de TE 7,6 e 0,125 μL de RNase 20 mg/mL por amostra. Os tubos ficaram incubados 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ e armazenados em caixas de papelão em freezer a -20°C .

3.2.3 Análise espectrofotométrica para quantificação de DNA no equipamento *Nanodrop*^R

Com um volume de 2 μL da solução contendo DNA determinou-se a concentração por análise espectrofotométrica. O equipamento *Nanodrop*^R (Figura 7) determina a concentração da amostra e também a razão $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$.

Figura 7 - Espectrofotômetro para a quantificação do DNA genômico (http://www.genomecenter.ucdavis.edu/expression_analysis/nanodrop.html).

3.2.4 Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade do DNA extraído

A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Inicialmente preparou-se o gel de agarose 1%, nas dimensões de 24 x 12 cm, e esperou-se sua polimerização. O gel foi levado à cuba de eletroforese e ficou imerso em aproximadamente 1 L de tampão TBE 1× (Tris base 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM). Em um microtubo de 1,5 mL preparou-se um *mix* proporcional ao número de amostras aplicadas no gel. Adicionou-se solução tampão *loading buffer* (50% de glicerol, 10% de TBE 10×, 10% de solução aquosa de azul de bromofenol 1%), corante *Gel Red* diluído (USB) e H₂O deionizada nos volumes de 1,5 µL, 1,5 µL, e 3 µL por amostra, respectivamente. Adicionou-se em 6 µL desse *mix* no mínimo 100 ng de DNA (cerca de 2 µL de solução de DNA extraído). Aplicou-se a solução preparada nos poços do gel polimerizado.

Com uma fonte de tensão (E-C modelo EC600-90) aplicou-se 100 V e esperou-se aproximadamente duas horas para a migração das moléculas de DNA ou até que o *loading buffer* se distanciasse do poço aplicado cerca de 2 cm. Após a eletroforese, o gel foi levado a um transiluminador com radiação ultravioleta e fotografado.

3.3 Busca da sequência dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α de caprinos em bancos de dados NCBI e Ensembl

Inicialmente buscou-se as sequências *fasta* dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α de caprinos nos bancos de dados de bioinformática NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) com o objetivo de se desenhar *primers* para a amplificação dos *exons* desses genes. Sabe-se que até o momento, não há sequências depositadas nos bancos de dados para a maioria dos genes de caprinos. Buscou-se então as sequências desses genes de outras espécies como ovinos e bovinos, para a verificação da similaridade entre as espécies.

3.4 Alinhamento das sequências

Com o objetivo de identificar regiões mais conservadas entre as espécies, alinhou-se a sequência completa de bovino, pois a sequência deste animal foi a única depositada para todos os genes de interesse, com a sequência de caprino ou ovino, dependendo do depósito do gene

estudado. Com exceção do gene IL2, cuja sequência do gene completo de caprino foi depositada nos bancos de dados, todos os *primers* foram desenhados a partir da sequência de bovino, nas regiões de maior conservação, que continha os *exons* do gene.

As sequências dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α foram alinhadas com os programas de livre acesso na internet utilizados em biologia molecular, o *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, e o *Multalin*, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

Os *primers* foram desenhados e analisados com o auxílio de ferramentas de bioinformática disponível na internet. Utilizou-se o programa *Primer3 plus*, disponível em <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> para o desenho dos *primers* e o programa *OligoAnalyzer*, disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/> para a análise dos mesmos.

3.5 Amplificação de *exons* pela reação em cadeia da polimerase

Observou-se similaridade entre os *exons* do bovino e o gene dos caprinos. Testou-se a PCR com condições padrão de DNA molde (80 ng), *primer* (0,165 $\mu\text{mol L}^{-1}$), dNTP (0,2 mmol L^{-1}), tampão (1 $\times$), MgCl $_2$ (1,5 mmol L^{-1}), enzima *Taq DNA polimerase* (*Ludwig ou Invitrogen*) para estabelecer a temperatura ideal de hibridização dos *primers*. Trabalhou-se com um gradiente de temperaturas de hibridização de 50, 52, 54 e 55 °C para o gene IL2. Para os demais fragmentos dos outros genes testou-se temperaturas até 65 °C.

A reação para todos os fragmentos de todos os genes foi levada a um termociclador e submetida à um programa padrão para PCR que consistia basicamente em três etapas. A primeira etapa era de desnaturação (95 °C por 5 min), a segunda etapa, de amplificação, ocorria com 35 ciclos, os quais as temperaturas variavam para que ocorressem processos de desnaturação, hibridização e extensão (94 °C por 45 segundos; etapa com a temperatura de hibridização dos *primers* por 45 segundos; e 72 °C por 45 segundos para extensão) e a terceira etapa do programa era de 72 °C por 10 min para a extensão final. Terminada a reação, o produto era resfriado a 4 °C.

Para a amplificação dos vários segmentos dos demais genes (IL4, IL13, IFN γ e TNF α) usou-se as mesmas condições descritas acima com várias temperaturas de hibridização. Testou-se também a enzima *Taq DNA polimerase* com atividade *hotstart* (*Invitrogen*).

3.5.1 Eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade do *amplicon* formado

A qualidade dos *amplicons* dos segmentos dos genes estudados foi verificada com a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2,0%. Utilizou-se o tampão TBE 1× (Tris base 90 mmol L⁻¹, ácido bórico 90 mmol L⁻¹, EDTA 2 mmol L⁻¹) diluído a partir de uma solução concentrada 10×. Aplicou-se 100 V de diferença de potencial (a distância entre os eletrodos da cuba é de 30 cm). Aplicou-se em cada poço do gel: 10 µL do produto de PCR e 2 µL de tampão de corrida (glicerol, TBE 10×, azul de bromofenol 1%, água deionizada). O gel foi corado com o reagente brometo de etídio. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta e fotografado.

3.6 Purificação da reação de PCR para posterior sequenciamento

Pipetou-se 5 µL de cada *amplicon* em cada poço da placa de PCR de 96 poços Axygen PCR-96M2-HS-C. Em cada poço adicionou-se também 2 µL da enzima *Exosap It*, Biotium. A mistura foi submetida 15 min a 37 °C e 15 min a 80 °C, conforme recomendado pelo fabricante. A placa contendo o produto de PCR purificado foi armazenada no freezer a -20 °C.

3.7 Reação de Sequenciamento

Retirou-se a placa contendo o produto de PCR purificado do freezer e esperou-se descongelar. Preparou-se a mistura necessária para o sequenciamento de acordo com o kit *BigDye^R Terminator v 3.1 Cycle Sequencing* comercializado pela até então *Applied Biosystems* (hoje *Life Technologies*). Nesta mistura foi adicionada água deionizada, tampão do kit *BigDye^R*, *primer* F ou R na concentração de 2 pmol/µL e o fluoróforo *Big Dye^R*. Fez-se o cálculo da quantidade de reagente necessária para cada preparo multiplicando-se os valores da Tabela 1 .

Tabela 1 - Quantidade dos reagentes utilizados para o seqüenciamento de uma amostra de produto de PCR utilizando-se kit comercial (*Applied Biosystems*).

Reagentes	1 amostra
H ₂ O (μL)	5,0
Tampão (μL)	1
<i>Primer F ou R</i> (2 pmol μL ⁻¹)	2
<i>Big Dye^R</i> (μL)	1
Produto de PCR - DNA (μL)	1
Mistura total (μL)	10

Em cada poço da placa distribuiu-se 9 μL desse *mix* e 1 μL do produto de PCR purificado. A placa foi levada a um termociclador (modelo *Master cycler Gradiente, Eppendorf*) com o programa contendo três etapas, previamente montado e salvo no equipamento. A primeira etapa é a de pré-incubação, o produto de PCR é submetido a 94 °C por 2 min. Na segunda etapa, de amplificação, há 25 ciclos com três temperaturas: primeira temperatura do ciclo é 96 °C por 20 s; a segunda temperatura do ciclo é a temperatura de hibridização do *primer* utilizado por 10 s e a terceira temperatura é a de 60 °C por 4 min. A terceira etapa do programa de sequenciamento é a etapa de resfriamento, a qual os produtos de sequenciamento são finalmente levados a 4 °C até serem processados.

3.7.1 Purificação em placa com 96 poços

Adicionou-se em cada poço da placa de 96 poços *MicroAmp Optical*, comercializada pela *Applied Biosystems*, 26 μL de uma solução alcoólica de isopropanol e H₂O 65% v/v contendo 3,8% de acetato de sódio pH 5. Com o auxílio de uma pipeta multicanal de 100 μL, agitou-se cada coluna da placa cerca de 5 vezes. Esperou-se cerca de por 15 min, com a placa no escuro, a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 2250 ×g (3700 rpm) por 45 min.

A placa foi invertida para a eliminação da solução alcoólica. Foi então levada a centrífuga para um rápido *spin* (placa invertida por 20 s a 182 ×g ou 300 rpm) para total desidratação. Adicionou-se então 150 μL da solução de etanol 70% e agitou-se. A placa foi centrifugada por 10 min a 2250 ×g (3700 rpm). Novamente a placa foi invertida para a eliminação do etanol e submetida a um *spin* com placa invertida por 20 s a 182 ×g (300 rpm).

Deixou-se secar no escuro por no mínimo 2 h ou *overnight*. A placa foi armazenada no freezer (-20°C) até ser utilizada no equipamento *ABI 3100 Avant*.

3.7.2 Análise por eletroforese capilar com sequenciador automático *ABI 3100 Avant* da *Applied Biosystems*

Após a reação de seqüenciamento, ou seja, após os fragmentos de DNA apresentarem os fluoróforos do *kit BigDye^R Terminator v 3.1 Cycle Sequencing* na molécula, o produto da reação foi ressuspensionado em formamida. Foi então desnaturado, a 95°C por 5 min, e resfriado a 4°C por 5 min. Posteriormente a placa foi submetida à eletroforese capilar com o auxílio do equipamento *ABI 3100 Avant* da *Applied Biosystems*. Utiliza-se o polímero POP6, capilar de 50 cm e tampão de corrida comercializado pela *Applied Biosystem*. Aplica-se uma voltagem de 15 kV. O eletroferograma é gerado pelo software *GenScan* também da *Applied Biosystems* e analisado com os programas de bioinformática *Phred Phrap* e *Consed*.

3.8 Verificação da associação dos SNPs encontrados com a resistência à verminose gastrointestinal

Para a verificação da associação entre fenótipos e genótipos utilizou-se o teste de *Fisher* por se tratar de 44 amostras dos extremos de resistência, nas quais não seria adequado utilizar testes que pressupõem normalidade dos dados. Foi anotado o genótipo de cada animal para cada SNP encontrado. O teste de *Fisher* foi realizado com o auxílio do programa SAS considerando os genótipos dos SNPs e a característica fenotípica do animal, ou seja, se ele pertence ao grupo de animais resistentes ou susceptíveis à verminose gastrointestinal. Foram consideradas associação significativa aquelas com valores de $P \leq 0,05$.

3.9 PCR-ARMS para genotipagem da população

Considerando-se o indicativo de associação para o SNP 1 do gene IL2, SNP T/A, optou-se por investigar a associação na população completa de caprinos. Para isso utilizou-se a técnica de PCR-ARMS (*polimerase chain reaction – amplification refractory mutation system*). Inicialmente, com o auxílio do programa apresentado por Ye *et al.*, 2001, (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html) desenhou-se *primers* alelo específicos.^{68,69}

A reação de PCR foi realizada com os quatro *primers* desenhados, um par de *primers* internos e um par de *primers* externos. A reação continha 40 ng de DNA molde, 10 pmol de *primers* internos, 1 pmol de *primers* externos, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1,5 µL do tampão 10× comercializado no kit com a enzima *Taq DNA polymerase (Platinum, Invitrogen)* e 0,65 U da enzima¹⁵, em volume final de µL.

Os reagentes foram submetidos ao programa de temperatura padrão para PCR, similar ao descrito na seção 3.5. Variou-se a temperatura de hibridização dos *primers* e escolheu-se a temperatura de 60 °C para essa etapa.

Finalmente, o produto da reação foi aplicado em gel de agarose a 2%, a uma diferença de potencial de 100 V. O gel foi corado com brometo de etídio, visualizado num transiluminador UV e fotografado. As amostras PCR-ARMS dos animais que apresentaram apenas uma banda em 210 bp foram genotipadas como sendo pertencentes a um animal homozigoto TT, as que apresentaram apenas uma banda em 297 bp foram genotipadas como pertencentes a um animal homozigoto AA e as que apresentaram as duas bandas (210 e 297 bp) foram genotipadas como pertencentes a animais heterozigotos TA. Observou-se também a presença da banda controle em 447 bp, formada pelos *primers* externos. Com essa técnica genotipou-se a população de caprinos para esse SNP.

Com a finalidade de conhecer a distribuição desse polimorfismo, genotipou-se também, com a mesma técnica, 4 populações de 30 animais cada, das raças de caprinos muito encontradas no nordeste brasileiro: Canindé, Marota, Moxotó e Repartida. Como não há fenótipo para esses animais, neste caso, não foi realizado o estudo da associação.

Foi investigada a associação entre os genótipos do SNP T/A do gene IL2 na população de caprinos de animais cruzados das raças Anglo-nubiana e Saanen, e a característica fenotípica. Utilizou-se novamente o procedimento dos modelos mistos do SAS (2002/2003). Os efeitos fixos incluídos no modelo foram, sexo, coleta, ano e o genótipo do marcador. A idade do animal na data da coleta foi incluída como covariável e as variáveis animal e progenitor foram utilizadas como efeito aleatório.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração, quantificação e avaliação da integridade do DNA de caprinos.

Os leucócitos foram as células escolhidas para a extração de DNA do sangue por apresentarem núcleo. Para isolamento dos leucócitos do sangue por hemólise, adiciona-se uma solução hipotônica em relação às hemácias sanguíneas, as moléculas de água passam para o interior das células por osmose e a membrana plasmática é rompida. O conteúdo celular, inclusive a hemoglobina, fica em solução. Com a centrifugação, os glóbulos brancos precipitam e a hemoglobina vai para o sobrenadante, sendo responsável pela sua coloração avermelhada. O sobrenadante é descartado. Após algumas repetições do processo o sedimento fica branco e o sobrenadante claro, os leucócitos são então recuperados e estão prontos para a extração do DNA.

Sabe-se que o DNA pode ser isolado das proteínas por *salting out*, extração orgânica ou pela ligação do DNA em uma fase sólida como uma coluna de troca aniônica. Foi utilizado o protocolo *salting out* por ser um método menos oneroso e apresentar a vantagem de não se trabalhar com compostos tóxicos, como fenol e compostos aromáticos, que podem, além disso, interferir nos valores de absorbância medidos na etapa de verificação da pureza da extração, bem como na ação de enzimas em reações de PCR e restrição.

A extração de DNA dos leucócitos ocorreu basicamente em três etapas:

- 1) rompimento da membrana celular e consequente liberação do DNA para a solução ou seja, lise do sedimento formado por leucócitos.
- 2) adição de sal e centrifugação para a separação do sobrenadante que contém o DNA. Nessa etapa ocorre a remoção das proteínas e dos contaminantes que ficam precipitados após a etapa de centrifugação.
- 3) precipitação do DNA em meio hidrofóbico (etanol absoluto gelado).

Como as bases nitrogenadas encontradas no DNA e no RNA absorvem entre 250 e 270 nm, é comum a observação de um pico em torno de 260 nm para o DNA ou RNA. As proteínas apresentam um padrão de absorção típico em 280 nm, então um teste de pureza simples foi a verificação da razão das absorbâncias em 260 nm e 280 nm, ou seja A_{260}/A_{280} . Se a razão encontrada para o DNA estiver entre 1,8-1,9 ou para o RNA entre 1,9-2,0 pode-se considerar que a extração está pura⁷⁰.

Observou-se, para a extração das 229 amostras, valores da razão das absorbâncias de aproximadamente 1,8, logo os resultados de espectrofotometria na região do ultravioleta

confirmam que a extração pode ser considerada pura e que o DNA extraído pode ser utilizado na maioria dos experimentos de biologia molecular.

Após os estudos com relação à pureza da extração avaliou-se a integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose. Os géis apresentaram apenas uma banda bem definida para cada amostra, o que indica que o DNA estava íntegro e pode ser usado nos experimentos seguintes (Figura 8).

Figura 8 - DNA de algumas extrações pelo método *salting out*. As bandas foram obtidas por eletroforese em gel de agarose 1%, estando bem definidas e sem rastros de degradação indicando a integridade do DNA.

Observou-se nesta etapa que o DNA foi extraído com êxito pelo protocolo padrão, *salting out*, pois a análise por eletroforese em gel de agarose confirmou que os DNAs estavam íntegros e a análise espectrofotométrica confirmou a pureza da extração. Com base na rotina dos projetos do laboratório de biotecnologia animal da Embrapa Pecuária Sudeste pode-se dizer que o protocolo padrão gera uma quantidade de DNA suficiente para os estudos de genes candidatos (cerca de 150 µg de DNA genômico) e que, mais importante, geram amostras aptas a serem usadas em estudos de sequenciamento.

4.2 Alinhamento de sequências, desenho de *primers* para sequenciamento de *exons* dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α

Como os *exons* são regiões mais conservadas entre as espécies e, principalmente devido ao fato da grande maioria dos genes dos caprinos até o momento não estar descrita no banco de dados, buscou-se a sequência destes genes em outras espécies, como ovinos e bovinos.

Buscou-se a sequência *fasta* do gene IL2 para a procura de *exons* em dois bancos de dados: *NCBI* e *Ensembl* (banco que indica na sequência os *exons* no gene). Como a sequência do gene completo para caprinos foi encontrada apenas no *NCBI* (AF535145.1) e não no *Ensembl* e havia *primers* do estoque do laboratório desenhados para bovinos, foi verificada a similaridade da sequência *NCBI* de caprinos com a sequência completa do gene IL2 de bovinos do *Ensembl* (ENSBTAG00000020883). Com a figura gerada pelo programa *Multalin* (Figura 9) pode-se visualizar a sequência consenso e a similaridade dos *exons* do gene IL2 de bovino e de caprinos. Observou-se grande similaridade, ou seja, grande correspondência entre as bases do gene IL2 de bovino e caprino, o que era de se esperar, pois esse gene é bem conservado entre as espécies, provavelmente em função do seu importante papel no sistema imunológico. O resultado do *Blast* (Figura 10) confirma a grande similaridade do gene, tendo sido observada 93% de identidade entre as sequências.

Para os demais genes, após definição da sequência de bases de trabalho, selecionou-se um fragmento de DNA que continha os *exons* de interesse. Com o auxílio de ferramentas da bioinformática (programas *Primer 3 Plus* e *Oligoanalyser*) desenhou-se os *primers* para a amplificação de genes por PCR.

O procedimento foi realizado para os demais genes envolvidos nas respostas do sistema imunológico, sempre visando a obtenção da sequência para o desenho de *primers* e amplificação de *exons*. Encontrou-se para o gene IL4 as sequências do gene completo de bovino do *Ensembl* (ENSBTAG00000015957), as sequências do mRNA de caprino no *NCBI* (U3473.1) e a do mRNA de bovino (NM_173921.2). As sequências dos mRNA foram alinhadas, encontrou-se 94% de identidade.


```

>lcl|22521
Length=4806

Score = 6001 bits (6654), Expect = 0.0
Identities = 3753/4034 (93%), Gaps = 122/4034 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query  417  AAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATAAGGTAATGCTTTTGGCCACACAGGTAGAATCTTT 476
      |||
Sbjct  1     AAGAGTCATCAGAAGAGGAAAAATAAGGTAATGCTTTTGGCCACACAGGTAGAATCTTT 60

Query  477  GAAAGTATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCATCATATTTTCCAGAATTAAA 536
      |||
Sbjct  61     GAAAGTATGTGTAATATGTAAAACATTTTGACACCCCATCATATTTTCCAGAATTAAA 120

Query  537  AGTATAAATTGCTTCTCTTGTCTAGAACTTCTATCTGCTTCTTAATCACTACTCACA 596
      |||
Sbjct  121  AGTATAAATTGCTTCTCTTGTCTAGAGCTTCTATCTGCTTCTTAATCACTACTCACA 180

Query  597  GTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAGATACAACCTCTTGTCTTGCACTGCACTAACT 656
      |||
Sbjct  181  GTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAGATACAACCTCTTGTCTTGCACTGCACTAACT 240

Query  657  CTTGCACTCGTTGCAAACGGTGACCTACTTCAAGCTCTACGGGGAACACAATGAAAGAA 716
      |||
Sbjct  241  CTTGCACTCGTTGCAAACGGTGACCTACTTCAAGCTCTACGGGGAACACAATGAAAGAA 300

Query  717  GTGAAGTCATTGCTGCTGGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAAGTTAAAGTAAGTTTATTT 776
      |||
Sbjct  301  GTGAAGTCATTGCTGCTGGATTTACAGTTGCTTTTGGAGAAAGTTAAAGTAAGTTTATTC 360

```

Figura 10- Parte do resultado do alinhamento do programa *BLAST*.

Considerando o gene IL13, encontrou-se a sequência de bovino no *Ensembl* (ENSBTAG00000015953), a sequência do mRNA de ovino no *NCBI* (NM_001082594.1) e a sequência de mRNA de bovino (NM_000174089.1). Como não foi encontrado o RNAm para o caprino, optou-se pelo alinhamento do mRNA de ovino com o mRNA de bovino, já que ovino e caprino são espécies com genomas similares. Observou-se 95% de identidade. Optou-se então pelo desenho dos *primers* considerando a sequência de bovino encontrada.

Encontrou-se para o IFNg a sequência completa de bovino no *Ensembl* (ENSBTAG00000012529) e as sequências do mRNA de bovino (NM_174086.1) e de caprino (EF375708.1) no *NCBI*. Alinhando-se as sequências dos mRNA observou-se 96% de identidade. Também nesse caso foi utilizada a sequência de bovino para o desenho dos *primers*.

Para o gene TNFa encontrou-se a sequência de bovino no *Ensembl* (ENSBTAG00000025471), do mRNA de bovino no *NCBI* (NM_173966.2), uma sequência parcial de ovino (AF165795.1) e outra parcial de caprino (AF165803.1) também no *NCBI*. Alinhando-se as sequências parciais destas duas espécies observa-se 97% de identidade. Quando a sequência parcial de caprino é alinhada com o gene completo de bovino observa-se

que a sequência parcial está na região do *intron 1* de bovino e que há 94% de identidade, logo, também nesse caso a sequência de bovino foi considerada para os estudos.

O estudo da similaridade entre as espécies foi de grande importância para o início do trabalho, uma vez que há poucas sequências de genes de caprinos depositadas em bancos de dados. Os valores de similaridade ofereceram maior segurança para o desenho dos *primers* a partir das sequências de bovino, pois observou-se grande similaridade entre as espécies para todos os genes estudados.

O *primer* ideal deve ser específico, ou seja, amplificar apenas o segmento de DNA de interesse, e deve ser eficiente, ou seja, contribuir para a reação de PCR, duplicando o número de cópias da região de interesse em cada ciclo da reação. Para a escolha dos *primers*, alguns parâmetros das sequências sugeridas pelo programa *Primer 3Plus* foram analisados. Os parâmetros para os genes IL 2, 4 e 13, para o gene IFN γ e para o gene TNF α estão listados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Sabe-se que o tamanho do *primer* e a temperatura de hibridização (temperatura em que o par de *primers* hibridiza no DNA molde na reação de PCR) afetam a especificidade da reação. *Primers* curtos podem amplificar mais de uma região do genoma e gerar produtos não específicos, enquanto que *primers* longos tendem a ser específicos. *Primers* longos, em geral apresentam temperatura de hibridização maior ou igual a 60 °C, e tendem a ser mais robustos na reação de PCR. Além de serem mais específicos apresentam, em geral, temperaturas de hibridização próximas a temperatura de *melting* (temperatura em que metade do DNA está na forma de fita simples e outra metade está na forma de dupla-hélice). Escolheu-se *primers* para regiões dos genes candidatos com 18 a 22 bases pois, quando se leva em conta a rotina do laboratório, de maneira geral, observa-se que essa quantidade de bases atende os critérios de qualidade adotados e gera resultados satisfatórios.⁷⁰

Outro fator importante para a escolha de *primers* é a composição das bases. Elas afetam a estabilidade interna, a especificidade da reação, a temperatura de *melting* e hibridização. As ligações GC, por apresentarem três ligações de hidrogênio, precisam de mais energia para serem quebradas do que as ligações AT, que apresentam duas pontes de hidrogênio. Aumento nas concentrações de GC causa aumento na temperatura de *melting* e na temperatura de hibridização de cada *primer*. Sabe-se que a temperatura de hibridização pode ser cerca de 5 °C mais baixa do que a temperatura de *melting*. Com baixas temperaturas de hibridização o *primer* pode favorecer a formação de produtos inespecíficos, com temperaturas muito altas o *primer* pode não se parear na fita molde de DNA e a reação de PCR não se

inicia. Esse é o conceito de estringência da reação de PCR. A estringência está relacionada à especificidade do produto formado, temperaturas de hibridização baixas apresentam menor estringência e o *primer* pode formar produtos inespecíficos, pois pode se parear em vários lugares. Temperaturas altas provocam maior estringência. Observou-se que, para os *primers* em estudo, as temperaturas de *melting* variaram entre 59 e 64 °C.

Tabela 2 - Parâmetros dos *primers* para amplificação de parte do DNA das interleucinas 2, 4 e 13 incluindo os *exons* de interesse.

gene e tamanho amplificado (bp)	parte do segmento amplificado		<i>primer forward</i>	<i>primer reverse</i>
IL2 - 468	<i>exons</i> 1 e 2	bases	23	23
		GC%	39,1	34,8
		Tm (°C)	59,1	57,4
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	11,3	41,4
IL2 - 406	<i>exon</i> 3	bases	23	22
		GC%	39,1	36,4
		Tm (°C)	61,3	59,6
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	21,5	16,8
IL4 - 393	<i>exon</i> 3	bases	20	20
		GC%	50,0	55,0
		Tm (°C)	63,0	67,4
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	50,9	22,7
IL13 – 467	<i>exon</i> 2 e 3	bases	20	19
		GC%	55,0	52,6
		Tm (°C)	63,8	63,7
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	42,7	27,0
IL13 – 595	<i>exon</i> 4	bases	20	20
		GC%	55,0	55,0
		Tm (°C)	63,8	61,7
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	24,6	-4,7

Sabe-se que o *primer* ideal não deve formar estruturas como grampos ou dímeros, por isso o programa sugere o *primer* ideal e mostra o valor da energia de *Gibbs* da formação da estrutura. O *primer* sugerido pelo programa é aquele que tem a energia de *Gibbs* mais positiva, ou seja, cujos dímeros são menos prováveis de ocorrer. A temperatura de *melting* do *hairpin* também é avaliada pelo programa. Em geral, o programa sugere o *primer* cujo *hairpin* tem menor possibilidade de se formar, logo, as temperaturas de *melting* do *primer* sugerido são superiores a temperatura de *melting* da formação do *hairpin* mais provável.

Tabela 3 - Parâmetros dos *primers* para amplificação de parte do DNA do gene IFN γ incluindo os *exons* de interesse.

tamanho amplificado (bp)	parte do segmento amplificado		<i>primer foward</i>	<i>primer reverse</i>
segmento 1: 483	<i>exon 1</i>	bases	20	22
		GC%	45,0	45,5
		Tm (°C)	60,4	61,6
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	-5,8	45,0
Segmento 2: 486	<i>exons 2 e 3</i>	bases	22	22
		GC%	40,9	36,4
		Tm (°C)	62,5	60,9
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	16,4	30,2
Segmento 3: 651	<i>exon 4 (parcial)</i>	bases	20	20
		GC%	50	45
		Tm (°C)	63,1	61,8
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	47,0	-3,9

Tabela 4 - Parâmetros dos *primers* para amplificação de parte do DNA do gene TNF α incluindo os *exons* de interesse.

tamanho amplificado (bp)	parte do segmento amplificado		<i>primer foward</i>	<i>primer reverse</i>
segmento 1: 549	<i>exon 1</i>	bases	20	20
		GC%	45,0	55,0
		Tm (°C)	62,1	62,4
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	45,4	-
segmento 2: 541	<i>exons 2 e 3</i>	bases	20	20
		GC%	50,0	55,0
		Tm (°C)	63,5	62,3
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	16,0	-1,5
segmento 3: 471	<i>exon 4</i>	bases	20	20
		GC%	55,0	55,0
		Tm (°C)	62,6	62,6
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	43,9	34,4
segmento 4: 663	<i>exon 4 (602bp)</i>	bases	20	20
		GC%	55,0	50,0
		Tm (°C)	61,9	63,4
		Tm <i>hairpin</i> (°C)	54,5	30,5

Observa-se nas sequências dos *primers* delineadas, de forma geral, quantidade de GC e temperatura de *melting* dentro de uma faixa adequada. Como a amplificação visa o posterior sequenciamento, escolheu-se *primers* que delimitasse regiões de aproximadamente 600 bp.

As sequências dos *primers* desenhados para os genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Descrição dos *primers* para sequenciamento dos genes IL2, IL4, IL13, IFN γ e TNF α .

Gene	Primers	Sequência	
IL2	1F	5'-GAACTTCCTATCTGCTTCTCTAA-3'	<i>exons</i>
	1R	5'-TGAAGTTACTATTTCTTCTCCTC-3'	1 e 2
	2F	5'-CGGGCAGCTAAACTCTAATTTTT-3'	<i>exon</i>
	2R	5'-CAATGTTAAAATGCCCTTCCAT-3'	3
IL4	1F	5'-CCCCCTGGAAAGAAGAAATC-3'	<i>exon</i>
	1R	5'-TCCCCAGTGCCTAGAACAGT-3'	3
IL13	1F	5'-CACTCAGCTCGCTGTCCTTT-3'	<i>exons</i>
	1R	5'-AAGTGGGTGCCAGGTCAAA-3'	2 e 3
	2F	5'-TGCACTCTGTCCTCACAAGC-3'	<i>exon</i>
	2R	5'-CCCTCCCTAACCCTCCTTTA-3'	4
IFN γ	1F	5'-CACCAAAATGCCACAAAACC-3'	<i>exon</i>
	1R	5'-AGAGATGAGAGCCCATCATAGA-3'	1
	2F	5'-AAATAGTGCCAGCATCCAAGTT-3'	<i>exons</i>
	2R	5'-TGCAATGATACCAAAGAAAGCA-3'	2 e 3
	3F	5'-TGTGATGTGCTCCATCCTGT-3'	<i>exon</i>
	3R	5'-TGCACAACCCACAGATTCTT-3'	4 (434 bp)
TNF α	1F	5'-AAGGAAGTTTTCCGCTGGTT-3'	<i>exon</i>
	1R	5'-TTCTCCACCCCATCTCTCAC-3'	1
	2F	5'-AGTGTGTCTGGCATGTGGAA-3'	<i>exons</i>
	2R	5'-TTCAGCCCCCTAATCCTACC-3'	2 e 3
	3F	5'-GAGATCAACCTGCCGGACTA-3'	<i>exon 4</i>
	3R	5'-CTCAGGGGAGTCTGGAAACA-3'	parte 2
	4F	5'-CCACCATCAAGGACTGGAAC-3'	<i>exon 4</i>
	4R	5'-ACTTCACTTCACCCGCAAGA-3'	parte 3

4.3 Reação em cadeia da polimerase

Testou-se a PCR com condições padrão de DNA molde (80 ng), *primer* (0,165 $\mu\text{mol L}^{-1}$), dNTP (0,2 mmol L^{-1}), tampão, MgCl_2 (1,5 mmol L^{-1}) e trabalhou-se com um gradiente de temperaturas de hibridização para estabelecimento da temperatura ideal. Para o gene IL2 trabalhou-se com a enzima *Taq DNA polimerase* convencional, para os genes IL4, IL13, IFN γ e TNF α testou-se também uma enzima com atividade *hotstart*, ou seja, enzima que favorece o início da amplificação em temperaturas elevadas.

Segundo o resultado da eletroforese em gel de agarose, os produtos de PCR do gene IL2 apresentaram bandas específicas e bem definidas no gel em todas as temperaturas de hibridização testadas (Figura 11).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% das amostras de PCR do gene IL2. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B a E: segmento 1 com as temperaturas de hibridização de 50 °C, 52 °C, 54 °C e 55 °C respectivamente; F e K: branco; G a J: segmento 2 com as temperaturas de hibridização de 50 °C, 52 °C, 54 °C e 55 °C respectivamente.

Para os demais segmentos dos genes estudados, as temperaturas de hibridização utilizadas para amplificação e posterior sequenciamento foram de 56 °C para o gene IL4 (Figura 12); 64 °C para o IL13 segmento 1 e 53 °C para o IL13 segmento 2 (Figura 13); 57 °C para o gene IFN γ segmento 1; 55 °C para o IFN γ segmento 2; 66 °C para o IFN γ segmento 3 (Figura 14); 60 °C para o gene TNF α segmentos 1 e 2; 55 °C para o gene TNF α segmentos 3 e 65 °C para o gene TNF α segmentos 4 (Figura 15).

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR de DNA de um segmento do gene IL4 de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 (temperatura de hibridização: 56 °C), C: amostra 2 (temperatura de hibridização: 56 °C) e D: branco.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% dos produtos de PCR de dois segmentos do gene IL13 de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 64 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 64 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 53 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 53 °C) F: branco.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de PCR de três segmentos do gene IFN γ de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 57 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 57 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 55 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 55 °C), F: amostra 1 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 66 °C), G: amostra 2 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 66 °C), H: branco.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 2,0 % do produto de PCR de quatro segmentos do gene TNF α de caprinos. A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, B: amostra 1 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 60 °C), C: amostra 2 do segmento 1 (temperatura de hibridização: 60 °C), D: amostra 1 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 60 °C), E: amostra 2 do segmento 2 (temperatura de hibridização: 60 °C), F: amostra 1 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 55 °C), G: amostra 2 do segmento 3 (temperatura de hibridização: 55 °C), H: amostra 1 do segmento 4 (temperatura de hibridização: 65 °C), I: amostra 2 do segmento 4 (temperatura de hibridização: 65 °C), J: branco.

Observou-se após eletroforese em gel de agarose 2%, bandas escuras e bem definidas coradas com brometo de etídio. A reação em cadeia da polimerase foi realizada para amplificar os segmentos dos cinco genes de 44 animais selecionados pela análise da distribuição da resistência dos caprinos à verminose gastrointestinal. Após esta etapa o produto de cada reação foi purificado antes de ser sequenciado.

4.4 Purificação do produto de PCR

Após a reação de PCR, pode haver no meio reacional sobras de reagentes, como *primers*, dNTPs, DNA molde. O ideal é que o produto seja purificado para a continuidade do trabalho. Purificou-se o produto de PCR com a enzima de nome comercial *ExoSAP-IT^R*, utilizou-se esse protocolo por ser um método rápido e de fácil execução. Além disso, esse tipo de purificação já foi muito utilizada no laboratório de biotecnologia animal, Embrapa Pecuária Sudeste e observou-se sequenciamentos de boa qualidade.

4.5 Reação de sequenciamento e purificação dos produtos da reação

Realizou-se a reação de sequenciamento para cada produto de PCR levando-se em consideração as devidas temperaturas de hibridização de cada segmento amplificado. O protocolo para a reação de sequenciamento é bastante comum e tem como princípio básico o método de Sanger ou método de terminação de cadeia, da década 1970. Inicialmente, o produto de PCR é desnaturado (94 °C por 2 min). A amplificação se dá com 25 ciclos de três etapas cada ciclo. A primeira etapa consiste na temperatura de 96 °C por 20 s (desnaturação), na segunda etapa ocorre a hibridização do primer na fita de DNA, logo, é a etapa em que se programa a temperatura de hibridização por 10 s e a terceira etapa é de 60 °C por 4 min (etapa de extensão). Após os ciclos de amplificação o produto da reação é resfriado a 4 °C.

Neste trabalho utilizou-se a eletroforese capilar para separação e identificação dos fragmentos da reação. Trabalhou-se com o *kit BigDye^R* da *Applied Biosystems*. Esse kit contém os reagentes necessários para a reação de sequenciamento: dNTP's que são os nucleotídeos livres; MgCl₂, que é o cofator enzimático da reação; Taq polimerase, a enzima para a extensão dos fragmentos e os ddNTP's que são dideoxynucleotídeos que terminam a reação, além de serem marcados com fluoróforos. São utilizados quatro tipos de ddNTP's (ddATP, ddTTP, ddGTP e ddCTP), cada um possui um espectro de fluorescência distinta. Acrescenta-se apenas o tampão, que é parte do kit, o *primer* de interesse e H₂O.

Nesta pesquisa, após a purificação da reação de sequenciamento, o produto foi analisado por eletroforese capilar. Os produtos da reação (centenas de fragmentos de DNA de vários tamanhos) foram identificados por fluorescência induzida a laser. O equipamento gera um eletroferograma onde é possível a visualização de picos de fluorescência correspondentes a cada base. O resultado é a leitura direta da sequência de cada amostra.

Observou-se no eletroferograma picos bem definidos (Figura 16). Os arquivos gerados pelo sequenciador, referente a cada animal, foram utilizados para análise posterior e prospecção de SNPs.

Figura 16 – Eletroferograma da reação de sequenciamento do gene IL2 (DNA de caprinos) gerado pelo equipamento *ABI 3100 Avant* da *Applied Biosystems*. Cada conjunto de fita simples de DNA de um mesmo tamanho possui uma dos quatro fluoróforos possíveis na sua extremidade.

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados pelos programas *Phred Phrap* e *Consed*. O programa *Phred*⁷¹, avalia a sequência atribuindo um valor de qualidade a cada nucleotídeo. Quanto maior o valor atribuído, menor a probabilidade de ter ocorrido erro na identificação do nucleotídeo. Em seguida, o programa *Phrap*⁷², agrupa as sequências e as organiza em *contigs*. Esses *contigs* e as sequências geradas são visualizadas através do programa *Consed*⁷³. Esse programa permite a visualização dos SNPs⁷³. Alguns animais podem ser caracterizados como heterozigotos por apresentarem, na imagem do

programa *Consed*, dois picos de fluorescência numa mesma posição na sequência, referentes a duas bases, e será melhor ilustrado na sequência.

4.6 Prospecção de SNPs

Foram prospectados SNPs em cinco genes envolvidos no sistema imunológico. Foram observados 20 SNPs, sendo dois no gene IL2, um no gene IL4, um no gene IL13, seis no gene IFN γ e dez no gene TNF α . Na Figura 17 ilustra-se a localização destes SNPs na região promotora, *introns* ou *exons*, dos genes estudados. Nas Figuras 18, 23, 26, 29 e 39 a localização dos SNPs também pode ser visualizada para cada gene, separadamente.

Figura 17 – Esquema posicionando os vinte SNPs encontrados e suas localizações nos genes estudados. Há 2 SNPs representados no gene IL2, 1 SNP no gene IL4, 1 SNP no gene IL13, 6 SNPs no gene IFN γ e 10 SNPs no gene TNF α .

4.6.1 Gene IL2

Figura 18 – Esquema posicionando dois SNPs encontrados no gene IL2.

O SNP encontrado no primeiro segmento de DNA amplificado do gene IL2 pode ser visualizado na Figura 19. Observa-se que, numa mesma posição da sequência de três animais distintos, há um pico com área menor e cores referentes a bases timina e adenina. Os animais A e C são heterozigotos e esse é o SNP (T/A).

A posição do SNP (T/A) na sequência de caprinos pode ser visualizada na Figura 20 e encontra-se sublinhado no *intron 1*.

Figura 19 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (T/A) do primeiro segmento sequenciado do gene IL2. A: amostra de caprino heterozigoto TA, B: caprino homozigoto TT, C: caprino heterozigoto TA.

SNP T/A

```

GCTTCTCTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACAATGTACAAGATACAACCTC
TTGTCTTGCAATTGCACCTAACTCTTGCACTCGTTGCAAACGGTGCACCTACTTCAAGCTCT
ACGGGGAACACAATGAAAGAAGTGAAGTCATTGCTGCTGGATTACAGTTGCTTTTGG
AGAAAGTTAAAGTAAGTTTATTCTCTTCTACTCAAATTATTACATTTAATTTTCTAACTG
GAGTCTGCTTTT IAAATAACAATCTGTTATGCTTTCTCAGAATCCCGAGAACCTCAAGCT
CTCCAGGATGCATACATTTAACTTCTACATGCCCAAGGTTAACGTAAGTACAACCTTCTAT
GTTCAATTTAATTTAATAAACTGAAAGTAATGTGAAAATTTACACACTAACTGGATTAAT
AGCACCTCATCTGAGGAGAAGAA

```

Figura 20 - Localização do SNP (T/A) na sequência consenso amplificada do gene IL2 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam os *exons* 2 e 3, respectivamente.

No segundo segmento de DNA do gene IL2 sequenciado foi encontrado um SNP (G/A) visualizado na Figura 21. Observa-se que, numa mesma posição da sequência de três animais, há um pico com área menor e cores referentes as bases guanina e adenina. O animal B é heterozigoto GA e os animais A e C são homozigotos GG. Esse segundo SNP está localizado e sublinhado no *intron* 2, da Figura 22.

Figura 21 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (G/A) do segundo segmento sequenciado do gene IL2. A: caprino homozigoto GG, B: caprino heterozigoto GA, C: caprino homozigoto GG.

Figura 22 - Localização do SNP (G/A) na sequência consenso do gene IL2 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam o *exon* 3.

4.6.2 Gene IL4

Figura 23 – Esquema posicionando o SNP encontrado no gene IL4.

Com o sequenciamento do segmento de DNA do gene IL4 foi encontrado o SNP (A/C) visualizado na Figura 24. Observa-se aqui também a presença de um pico com área menor, as cores são referentes as bases adenina e citosina. O animal B é heterozigoto AC, o animal A é homozigoto AA e o animal C é homozigoto CC.

Figura 24 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (A/C) do segmento sequenciado do gene *IL4*. A: caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AC, C: caprino homozigoto CC.

O SNP encontrado com o sequenciamento do segmento do gene *IL4* está localizado e sublinhado no *intron 3* da Figura 25.

Figura 25 - Localização do SNP (A/C) na sequência consenso do gene *IL4* de caprinos. As letras em negrito e em *itálico* representam o *exon 2*.

4.6.3 Gene IL13

Figura 26 – Esquema posicionando o SNP encontrado no gene IL13.

Foram sequenciadas duas regiões do gene IL13. Encontrou-se apenas um SNP C/T. Observa-se na Figura 27 um animal homozigoto CC, um heterozigoto CT e um homozigoto TT.

Figura 27 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (C/T) do segmento sequenciado do gene IL13. A: caprino homozigoto CC, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto TT.

O SNP encontrado é referente a alteração da base citosina para timina e encontra-se sublinhado no *intron 1* da Figura 28.

Figura 28 - Localização do SNP (T/C) na sequência consenso do gene IL13 de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam os *exons* 2 e 3, respectivamente.

4.6.4 Gene IFN γ

Figura 29 – Esquema posicionando os seis SNPs encontrados no gene IFN γ .

Foram sequenciados três segmentos do gene IFN γ . O segmento 1 (S1) contém o *exon* 1 completo, o segmento 2 (S2) os *exons* 2 e 3 completos e o segmento 3 (S3) continha parte do *exon* 4.

Foram encontrados três SNPs no segmento 1, que podem ser visualizados nas Figuras 30, 31 e 32. O primeiro SNP do segmento é referente à alteração de uma citosina por uma timina. Na Figura 30 há dois animais heterozigotos CT (animais A e B) e um animal homozigoto CC (animal C). O segundo SNP do segmento é referente à alteração de uma adenina por uma citosina. Na Figura 31 observa-se que o animal B é um heterozigoto AC e observa-se também dois animais homozigotos: o animal A é um homozigoto AA e o animal C é um homozigoto CC. O terceiro SNP do segmento pode ser visualizado na Figura 32 e é referente a alteração de uma guanina por uma adenina. Nesta Figura encontra-se um animal heterozigoto GA (animal A), um animal homozigoto GG (animal B) e um animal homozigoto AA (animal C).

Figura 30 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (C/T) do segmento 1 sequenciado do gene IFN γ . A: caprino heterozigoto CT, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto CC.

Figura 31 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (A/C) do segmento 1 sequenciado do gene IFN γ . A: caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AC, C: caprino homozigoto CC.

Figura 32- Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do terceiro SNP (G/A) do segmento 1 sequenciado do gene IFNg. A: caprino heterozigoto GA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto AA.

Os três SNPs encontrados no segmento 1 do gene IFNg podem ser localizados na sequência consenso de caprinos da Figura 33. Observa-se que há dois SNPs localizados no *exon 1* (os SNPs C/T e A/C) e 1 SNP localizado no *intron 1* (SNP G/A) do gene.

Figura 33 - Localização dos SNPs (C/T), (A/G) e (G/A) na sequência consenso do primeiro segmento do gene IFNg de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam o *exon 1*.

Foram encontrados dois SNPs no segmento 2, que podem ser visualizados nas Figuras 34 e 35. O primeiro SNP do segmento é referente à alteração de uma timina por uma citosina.

Na Figura 34 há um animal heterozigoto TC (animal A), um animal homozigoto TT (animal B) e um animal homozigoto CC (animal C). O segundo SNP do segmento também é referente à alteração de uma timina por uma citosina. Na Figura 35 observa-se que o animal C é um heterozigoto TC, o animal A é homozigoto CC e o animal B é homozigoto TT.

Figura 34 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (T/C) do segmento 2 sequenciado do gene IFNg. A: caprino heterozigoto TC, B: caprino homozigoto TT, C: caprino homozigoto CC.

Figura 35 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (T/C) do segmento 2 sequenciado do gene IFNg. A: caprino homozigoto CC, B: caprino homozigoto TT, C: caprino heterozigoto TC.

Ambos os SNPs encontrados no segmento 2 do gene IFNg podem ser localizados na sequência consenso de caprinos da Figura 36. Observa-se que há um SNP T/C localizado no *intron 2* e um SNP T/C localizado no *exon 3* do gene.

Figura 36 - Localização de ambos SNPs (T/C) na sequência consenso no segundo segmento do gene IFNg de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam os exons 2 e 3, respectivamente.

Com a prospecção no terceiro segmento do IFNg encontrou-se apenas um SNP G/T que pode ser visualizado na Figura 37. Este SNP é referente à alteração de uma guanina por

uma timina. Observa-se também que há na Figura 37 dois animais heterozigotos GT (animais B e C), um animal homozigoto GG (animal A) e um animal homozigoto TT (animal D).

Figura 37 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (G/T) do segmento 3 sequenciado do gene IFNg. A: caprino homozigoto GG, B: caprino heterozigoto GT, C: caprino heterozigoto GT e D: caprino homozigoto TT.

O SNPs G/T encontrado no segmento 3 do gene IFNg pode ser localizado na sequência consenso de caprinos da Figura 38. Observa-se que o SNP está localizado no *exon* 4 do gene.

SNP G/T

```

CCTGTTACAGCACAACTATCAATTGAATTGTTATAATTTTAGTCTTTTACTGAAGAAACCAA
CATTACATATTAAAGTTCATTACTGCTAGTGAAAATAATTTGTTTTAAAGAATACTTTGATTTTC
TTGGGCCTAGACAGAAGAATATCCTAATGACTCATATGCCTGAAATTAATTTTGCTGTTTTCTT
TCCTAATAGGTGGATGATCTGCAGATCCAGCGCAAAGCCATAAATGAACTCATCAAGGTGAT
GAATGACCTGTCGCCAAAATCTAACCTCAGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGAATCTCTTTCG
AGGCCGGAGAGCATCAATGTAATGGTTCTCCTGCCTGCAATATTTGAATTTTAAAATCTAAA
TCTATTTATTAATATTTAATATTTTACATTATTATATAGGGAATATATATTTAGACTTATCAAAG
TATTTATAATAGTAACTTTTATGTCATGAAAATGAGTATCTATTAATATATGTGTTATTTATAAT
TCCTAAGACTAACTAGGCAAGTCTATGGGATTTCAAGGTTTATCTCAGGGTCCAACTAGGC
AGCTAAACTAAGCAAG
  
```

Figura 38 - Localização do SNP (G/T) da sequência consenso do *exon 4* do gene IFNg de caprinos. As letras em negrito e em itálico representam parte do *exon 4*.

4.6.5 Gene TNFa

Figura 39 – Esquema posicionando os dez SNPs encontrados no gene TNFa.

Foram sequenciados quatro segmentos do gene TNFa. O segmento 1 (S1) contém o *exon 1* completo, o segmento 2 (S2) os *exons 2* e *3* completos, o segmento 3 (S3) e 4 (S4) contém parte do *exon 4*. Nestas regiões foram encontrados dois SNPs no segmento 1, que podem ser visualizados na Figura 40. O primeiro SNP do segmento é referente à alteração de uma citosina por uma adenina e o segundo SNP é referente a alteração de uma guanina por uma adenina. Na Figura 40 observa-se, para o primeiro SNP encontrado, dois animais homozigotos CC (animais A e B) e um animal homozigoto AA (animal C). O segundo SNP do segmento é referente à alteração de uma guanina por uma adenina. Os animais A e B são homozigotos GG para o segundo SNP do segmento e o animal C é um homozigoto AA.

Ambos os SNPs encontrados no segmento 1 do gene TNFa podem ser localizados na sequência consenso de caprinos da Figura 41. Observa-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 foi encontrado SNPs no *exon 1*.

Figura 40 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (C/A) e do SNP (G/A) do segmento 1 do gene IFNg. A: caprino homozigoto CC (SNP1) e homozigoto GG (SNP2), B: caprino homozigoto CC (SNP1) e homozigoto GG (SNP2), C: caprino homozigoto AA (SNP1) e homozigoto AA (SNP2).

Figura 41 - Localização dos dois SNPs encontrados com o sequenciamento do primeiro segmento do gene TNFa. O primeiro SNP (C/A) e o segundo SNP (G/A) estão localizados na região promotora do gene. As letras em negrito e em itálico representam o *exon* 1.

Observou-se a presença de dois SNPs no segmento 2 do gene TNFa. Eles podem ser visualizados nas Figuras 42 e 43, respectivamente. Na Figura 42, para o primeiro SNP, encontra-se dois animais heterozigotos GA (animais C e D) e dois animais homozigotos GG (animais A e B). Observa-se na Figura 43, para o segundo SNP, um animal heterozigoto CG (animal C), um animal homozigoto GG (animal A) e outro homozigoto CC (animal B).

Figura 42 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (G/A) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG, B: caprino homozigoto GG, C: caprino heterozigoto GA e D: caprino heterozigoto GA.

Figura 43 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (C/G) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG, B: caprino homozigoto CC, C: caprino heterozigoto CG.

Os SNPs G/A e C/G encontrados no segmento 2 do gene TNFa podem ser localizados na sequência consenso de caprinos da Figura 44. Observa-se ambos estão localizados no *intron 2* do gene.

Figura 44 - Localização dos dois SNPs encontrados com o sequenciamento do segundo segmento do gene TNFa. O primeiro SNP (G/A) e o segundo SNP (C/G) estão localizados no *intron 2* do gene. As letras em negrito e em itálico representam os *exons 2* e *3*, respectivamente.

Com a prospecção do terceiro segmento do gene TNFa foram encontrados seis SNPs. O primeiro deles pode ser visualizado na Figura 45, trata-se da alteração de uma guanina por uma timina. Esta figura apresenta também exemplos de animais heterozigotos e homozigotos para este SNP. Os animais A e D são heterozigotos GT, o animal B é homozigoto GG e o animal C é homozigoto TT.

Figura 45 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (G/T) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino heterozigoto GT, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto TT e D: caprino heterozigoto GT.

O segundo SNP pode ser visualizado na Figura 46. Observa-se uma alteração de uma guanina por uma adenina. Os animais A e D são heterozigotos para este SNP, o animal B é homozigoto GG e o animal C é homozigoto AA.

O terceiro SNP está apresentado na Figura 47. É a alteração de uma citosina por uma timina. O animal A é um heterozigoto CT para este SNP e os animais B e C são homozigotos.

Figura 46 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do SNP (G/A) do segundo segmento do gene TNFa. A: caprino heterozigoto GA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino homozigoto AA e D: caprino heterozigoto GA.

Figura 47 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do terceiro SNP (C/T) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino homozigoto CC, B: caprino heterozigoto CT, C: caprino homozigoto CC.

O quarto e o quinto SNP podem ser visualizado na Figura 48. Os SNPs estão bem próximos distanciando-se apenas por duas bases. O quarto SNP é uma alteração de uma guanina por uma adenina. Há dois animais heterozigotos GA, representados pela letra C e D. Os animais representados por A e B são homozigotos GG para este SNP. Logo na sequência, há o quinto SNP que também é um SNP A/G. Para o quinto SNP, o animal representado por D é um heterozigoto GA, o representado por B um homozigoto GG e os animais representados por A e C são homozigotos AA.

Figura 48 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do quarto SNP (G/A) e do quinto SNP (A/G) do terceiro segmento sequenciado do gene TNFa. A: caprino homozigoto GG (SNP3) e homozigoto AA (SNP4), B: caprino homozigoto GG (SNP3) e homozigoto GG (SNP4), C: caprino heterozigoto GA (SNP3) e homozigoto AA (SNP4), D: caprino heterozigoto GA (SNP3) e heterozigoto AG (SNP4).

O sexto e último SNP do terceiro segmento sequenciado pode ser visualizado na Figura 49. Também é uma alteração de uma adenina por uma guanina. A Figura 49 mostra também um animal homozigoto AA (A), um homozigoto GG (B) e um heterozigoto AG (C).

Figura 49 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do sexto SNP (A/G) do terceiro segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto AA, B: caprino homozigoto GG, C: caprino heterozigoto AG.

Os seis SNPs encontrados no terceiro segmento do gene TNFa podem ser localizados na sequência consenso de caprinos da Figura 50. Observa-se que todos os SNP encontram-se no *exon 4* do gene.

Figura 50 - Localização dos seis SNPs encontrados com o sequenciamento do terceiro segmento do gene TNFa. A sequência consenso é parte do *exon 4* do gene. Todos os SNPs estão localizados no *exon 4*.

Com o sequenciamento do quarto segmento do gene TNFa observou-se dois SNPs que estão demonstrados nas Figuras 51 e 52. Observa-se que eles se localizam no início do quarto segmento (Figura 53), no *exon 4*. Após uma análise mais detalhada do SNP observa-se que ambos são os mesmos encontrados no final do sequenciamento do terceiro segmento. As figuras e a sequência consenso foram também incluídas no trabalho pois indicam que, dando continuidade ao sequenciamento do *exon 4* não foi observado mais SNPs. Além disso, o segmento sequenciado, mesmo não contendo polimorfismo de DNA, é complementar à sequência inédita de caprinos, que será depositada em bancos de dados.

Figura 51 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do primeiro SNP (A/G) do quarto segmento do gene TNFa. A: caprino homozigoto AA, B: caprino heterozigoto AG, C: caprino homozigoto GG.

Figura 52 - Imagem gerada pelo programa *Consed*, após análise pelos programas *Phred* e *Phrap*. Visualização do segundo SNP (A/G) do quarto segmento do gene TNFa. A: caprino heterozigoto AG, B: caprino homozigoto AA, C: caprino homozigoto AA.

Figura 53 - Localização dos dois SNPs encontrados com o sequenciamento do quarto segmento do gene TNFa. O segmento amplificado, representado na figura, é parte do *exon 4* do gene. Ambos os SNPs estão localizados no *exon 4*.

4.7 Estudo da possível alteração de aminoácido

Com o auxílio do programa *GeneRunner* verificou-se que há alteração de aminoácido apenas na sequência de um dos dois SNPs encontrados nas fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* - ORFs). Essa mutação foi provocada pelo segundo SNP do *exon 1* do gene IFN γ (SNP A/C). Este SNP provoca a mudança dos aminoácidos asparagina (considerando o alelo A) e treonina (alelo C). Para os demais SNPs, as mutações encontradas são silenciosas.

4.8 Frequências alélicas e genotípicas dos extremos de resistência

Buscou-se os genótipos, com o auxílio da imagem do programa *Consed*, para cada SNP de todos os segmentos dos genes sequenciados. Considerou-se os dados genotípicos dos 44 caprinos representantes dos extremos de resistência e calculou-se a frequência alélica e genotípica de cada SNP prospectado (Tabelas 6 – 9).

Com base nos genótipos aplicou-se o teste de *Fisher* para verificar a possível associação dos mesmos com a resistência à verminose gastrointestinal. Observou-se que as frequências genotípicas de oito SNPs podem estar associadas com a resistência: ambos SNPs do gene IL2, apenas um SNP do gene IFN γ e cinco SNPs do gene TNFa.

Para o gene IL2, SNP T/A, há predominância do alelo T. O genótipo TT é mais frequente para ambos os extremos, porém o genótipo TA é encontrado em maior quantidade para os animais susceptíveis e o genótipo AA foi encontrado apenas para os animais susceptíveis (Tabela 6). Para o segundo SNP do gene IL2 (G/A) observa-se uma maior

frequência do alelo G e uma maior frequência do genótipo GG para animais resistentes e susceptíveis. Quando se compara o genótipo TA entre os animais observa-se que há uma maior frequência para os animais susceptíveis. O genótipo AA não foi observado nos animais extremos estudados.

Na tabela 6, observa-se também os valores de P para os SNPs dos genes IL4 e IL13. Esses valores não foram significativos ($P > 0,05$), portanto não considera-se associação significativa para esses casos.

Tabela 6– Frequências alélicas e genotípicas dos dois SNPs do gene IL2 e dos SNPs dos genes IL4 e IL13 com seus respectivos valores de P do teste de *Fisher*.

SNP (gene, segmento, posição)	Genótipo ou alelo	Todos os animais dos extremos (%)	Animais resistentes (%)	Animais susceptíveis (%)	Valor de P
SNP1 (T/A) IL2, S1, intron 1	TT	70,45	86,4	54,5	0,0385
	TA	27,27	13,6	40,9	
	AA	2,27	0	4,5	
	T	84,09	93,2	75	
	A	15,91	6,8	25	
SNP2 (G/A) IL2, S2 intron 2	GG	84,09	95,5	72,7	0,0489
	GA	15,91	4,5	27,3	
	AA	0	0	0	
	G	92,05	97,7	86,4	
	A	7,95	2,3	13,6	
SNP1 (A/C) IL4 S1 intron 3	AA	65,91	59,1		0,1011
	AC	29,54	31,8	27,3	
	CC	4,55	9,1	0	
	A	80,68	75	86,4	
	C	19,32	25	13,6	
SNP1 (T/C) IL13 S1 intron 1	CC	58,14	68,12	47,62	0,1039
	CT	18,60	9,09	28,57	
	TT	23,26	22,72	23,81	
	C	67,44	72,73	61,90	
	T	32,56	27,27	38,10	

A Tabela 7 apresenta as frequências alélicas e genotípicas para os seis SNPs encontrados no gene IFNg com os respectivos valores de P.

Foi verificada a associação apenas do SNP T/C localizado no *exon 3* ($P < 0,05$). Para este SNP, observa-se maior quantidade do alelo C para os animais resistentes e susceptíveis, porém o genótipo TT foi encontrado apenas para animais resistentes, há uma maior frequência do genótipo TC para animais resistentes e uma maior frequência do genótipo CC para os animais susceptíveis.

Tabela 7 – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene IFN γ e valores de P do teste de *Fisher*.

SNP (gene, segmento, posição)	Genótipo ou alelo	Todos os animais dos extremos (%)	Animais resistentes (%)	Animais susceptíveis (%)	Valor de P
SNP1 (C/T) IFN γ S1 <i>exon 1</i>	CC	90,91	95,45	86,36	0,2499
	CT	9,09	4,54	13,64	
	TT	0	0	0	
	C	95,45	97,73	93,18	
	T	4,54	2,27	6,82	
SNP2 (A/C) IFN γ S1 <i>exon 1</i>	AA	22,50	28,57	15,79	0,0732
	AC	22,00	57,14	52,63	
	CC	22,50	14,29	31,58	
	A	50,00	57,14	42,11	
	C	50,00	42,86	57,89	
SNP3 (G/A) IFN γ S1 <i>intron 1</i>	AA	60,00	50,00	70,00	0,0604
	AG	35,00	40,00	30,00	
	GG	5,00	10,00	0	
	A	77,50	70,00	85,00	
	G	22,50	30,00	15,00	
SNP1 (T/C) IFN γ S2 <i>intron 2</i>	TT	18,18	50,00	40,91	0,1194
	TC	36,36	36,36	36,36	
	CC	45,45	13,64	22,73	
	T	36,36	68,18	59,09	
	C	63,64	31,82	40,91	
SNP2 (T/C) IFN γ S2 <i>exon 3</i>	TT	6,98	13,64	0	0,0396
	TC	41,86	45,45	38,10	
	CC	51,16	40,91	61,90	
	T	27,91	36,36	19,05	
	C	72,09	63,64	80,95	
SNP1 (G/T) IFN γ S3 <i>exon 4</i>	GG	44,19	50,00	38,10	0,1029
	GT	41,86	40,91	42,86	
	TT	13,95	9,09	19,05	
	G	65,12	70,45	59,52	
	T	34,88	29,54	40,88	

Para o gene IFN γ observa-se que, dos seis SNPs encontrados, há apenas 1 SNP que pode estar associado, porém há dois SNPs com uma associação sugestiva considerando-se $P \leq 0,10$.

Observou-se que para o gene TNF α cinco SNPs podem estar associados ($P \leq 0,05$) e há uma associação sugestiva para um deles ($P \leq 0,10$). Dos dez SNPs encontrados, segundo o teste de *Fisher*, estes são os cinco deles que podem estar associados: SNP C/A e G/A localizados na região promotora do gene e os SNPs G/T, G/A e C/T, localizados no *exon* 4. Há uma associação sugestiva para um sexto SNP C/G ($P \leq 0,10$), localizado no *intron* 2.

As frequências alélicas, genotípicas e o valor de P do teste de *Fisher*, para os dez SNPs do gene TNF α estão nas Tabelas 8 e 9.

O SNP C/A apresenta maior frequência do alelo C e o genótipo AA é observado em maior quantidade para os animais resistentes. Observa-se uma distribuição similar para o segundo SNP da região promotora. O SNP G/A apresenta maior frequência do alelo G e o genótipo AA é observado em maior quantidade para os animais resistentes.

Os três SNPs associados do *exon* são apresentados na Tabela 9. Há uma maior frequência do alelo A tanto para os animais resistentes como susceptíveis, e uma maior quantidade do genótipo AA para os animais susceptíveis. Para o segundo SNP T/G observa-se uma maior frequência do alelo T para ambos os casos, uma maior frequência do genótipo TT para os animais susceptíveis e uma maior frequência do genótipo TG para os animais resistentes. Considerando o terceiro SNP do *exon* 4, observa-se que há uma maior frequência do genótipo CT para animais resistentes.

Para que as associações ($P \leq 0,05$) dos oito SNPs encontradas sejam validadas é necessário estudar o efeito desses SNPs na população completa de caprinos e em outras populações. Neste trabalho foi estudado o primeiro SNP do gene IL2 na população completa.

Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs dos segmentos 1 e 2 do gene TNFa e valores de P do teste de *Fisher*.

SNP (gene, segmento, posição)	Genótipo ou alelo	Todos os animais dos extremos (%)	Animais resistentes (%)	Animais susceptíveis (%)	Valor de P
SNP1 (C/A)	CC	75,76	65,00	92,31	0,0088
TNFa S1	CA	0	0	0	
Promotor	AA	24,24	35,00	7,69	
	C	75,75	65,00	92,31	
	A	24,24	35,00	7,69	
SNP2 (G/A)	GG	75,76	65,00	92,31	0,0088
TNFa S1	GA	0	0	0	
Promotor	AA	24,24	35,00	7,69	
	G	75,76	65,00	92,31	
	A	24,25	35,00	7,69	
SNP1 (A/G)	GG	79,55	72,73	86,36	0,1639
TNFa S2	GA	20,45	27,27	13,64	
<i>intron 2</i>	AA	0	0	0	
	G	89,77	86,38	93,18	
	A	10,23	13,64	6,82	
SNP2 (C/G)	GG	68,18	59,09	77,27	0,0575
TNFa S2	GC	27,27	31,82	22,73	
<i>intron 2</i>	CC	4,55	9,09	0	
	G	81,92	75,00	88,64	
	C	18,18	25,00	11,36	

Tabela 9 – Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs do segmento 3 do gene TNFa e valores de P do teste de *Fisher*.

SNP (gene, segmento, posição)	Genótipo ou alelo	Todos os animais dos extremos (%)	Animais resistentes (%)	Animais susceptíveis (%)	Valor de P
SNP1 (G/T)	TT	38,64	22,73	54,55	0,0231
TNFa S3	TG	56,82	68,18	45,45	
exon 4	GG	4,55	9,09	0	
	T	67,05	56,82	77,27	
	G	32,95	43,18	22,73	
SNP2 (G/A)	GG	11,36	18,18	4,55	0,0090
TNFa S3	GA	50,00	59,09	40,91	
exon 4	AA	38,64	27,73	54,55	
	G	36,26	47,73	25,00	
	A	63,64	52,27	75,00	
SNP3 (C/T)	CC	81,82	68,18	95,45	0,0262
TNFa S3	CT	18,18	31,82	4,55	
exon 4	TT	0	0	0	
	C	90,91	84,09	97,73	
	T	9,09	15,91	2,27	
SNP4 (G/A)	GG	79,55	72,73	86,36	0,1636
TNFa S3	GA	20,45	27,27	13,64	
exon 4	AA	0	0	0	
	G	89,77	86,36	93,18	
	A	10,23	13,64	6,82	
SNP5 (A/G)	AA	54,55	59,09	50,00	0,1214
TNFa S3	AG	40,91	40,91	40,91	
exon 4	GG	4,55	0	9,09	
	A	75,00	79,55	70,45	
	G	25,00	20,45	29,55	
SNP6 (A/G)	AA	55,81	47,62	63,64	0,1847
TNFa S3	AG	39,53	52,28	27,27	
exon 4	GG	4,65	0	9,09	
	A	75,58	73,81	77,27	
	G	24,42	26,19	22,73	

4.9 Genotipagem do SNP 1 do gene IL2 na população de caprinos do cruzamento das raças Anglo-nubiana e Saanen

O SNP encontrado no gene IL2 foi genotipado pela técnica PCR-ARMS para os demais animais da população de caprinos. Os produtos da reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose e observaram-se bandas bem definidas alelo-específicas (Figura 54). As bandas com 210 bp são específicas para o alelo T, as bandas com 297 bp são específicas para o alelo A e as bandas com 447 bp são consideradas como controle da reação. Os animais da Figura 54 possuíam genótipos conhecidos, pois eram animais dos extremos de resistência, que foram sequenciados e foram usados para validar o método. O caprino B é uma animal homozigoto AA para o SNP1, os caprinos C e D são animais heterozigotos TA e os caprinos E e F são animais homozigotos TT. Como esses animais possuem as bandas de tamanho específico para o alelo de interesse pode-se dizer que a reação de PCR-ARMS pode ser usada para genotipar esse SNP em outras amostras com genótipo desconhecido.

Figura 54 - Eletroforese em gel de agarose 2,0% do produto de ARMS-PCR de amostras com genótipos conhecidos. Amostra A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, amostra B: caprino homozigoto AA, amostras C e D: caprinos heterozigotos TA, amostras E e F: caprinos homozigotos TT, amostra G: branco.

Com os dados da genotipagem da população completa, foi realizada análise estatística (Tabela 10) para verificação de uma possível associação do SNP com a resistência à verminose gastrointestinal.

Tabela 10 – Resumo das análises de variância, incluindo o efeito do marcador para a medida de OPG

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Valor de P
	gl	ss	
Sexo	1	2,56	0.0364**
Coleta	13	37,8	<0.0001***
Ano	2	2,31	0.0219**
Pai	3	9,03	<0.0001***
ID	1	0,09	0.7381
SNP 1 - IL2	2	1,39	0.1959

ID = Idade do animal na data da medida; **P<0,05; ***P<0,01

As variáveis sexo, coleta e ano influenciaram significativamente a variação de OPG ($P \leq 0,05$), porém verificou-se que o SNP e a idade do animal na coleta não estão associadas significativamente com a variável OPG. Embora a análise dos extremos tenha indicado que o SNP 1 poderia ter efeito sobre a característica fenotípica, essa associação não foi validada na população quando utilizou-se a amostra representando toda a variação da população.

Esse resultado pode refletir a baixa capacidade do modelo matemático utilizado na ANOVA de explicar a variação das medidas de OPG, uma vez que o coeficiente de determinação do modelo foi considerado baixo ($R^2 = 0,1960$). Assim, apenas fontes de variação muito importantes teriam probabilidade de se mostrarem significativas.

4.9.1 Genotipagem do SNP 1: raças de caprinos encontradas no nordeste brasileiro

A técnica PCR-ARMS foi utilizada para a genotipagem das 30 amostras de DNA das raças encontradas no nordeste brasileiro: Canindé, Marota, Moxotó e Repartida (Figura 55), comprovando a ocorrência desses SNPs em outras populações. As bandas do gel de agarose são escuras e bem definidas para cada alelo.

Figura 55 – Bandas alelo-específicas resultado da técnica PCR-ARMS. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2%. Amostra A: padrão de tamanho 100 bp Norgen, amostras B: animais homozigotos TT, amostras C: animais heterozigotos TA, amostras D: animais homozigotos AA e amostra E: branco.

Observa-se, na Tabela 11, para o SNP encontrado no gene IL2 dos caprinos de raças comuns no nordeste brasileiro, uma maior frequência do alelo T nas quatro raças estudadas. Há maior quantidade do alelo A para os caprinos da Raça Marota, seguindo pela Repartida e praticamente uma mesma frequência alélica é observada para as raças Canindé e Marota. O genótipo TT é encontrado com maior frequência e o genótipo AA com menor frequência para as quatro raças estudadas. Há uma maior diferença entre os genótipos TT e TA para as raças Canindé ($\Delta = 40,0$) e Marota ($\Delta = 43,3$) e uma menor diferença entre os genótipos das raças Moxotó ($\Delta = 10$) e Repartida ($\Delta = 6,7$).

Tabela 11 – Frequências alélicas e genotípicas do SNP encontrado no gene IL2 dos caprinos com raças comuns no nordeste brasileiro.

	Moxotó	Canindé	Marota	Repartida
TT (%)	40,0	70,0	70,0	43,3
TA (%)	50,0	30,0	26,7	50,0
AA (%)	10,0	0	3,3	6,7
T (%)	65,0	85,0	83,3	68,3
A (%)	35,0	15,0	16,7	31,7

Esses animais fazem parte do banco de DNA de pequenos ruminantes cujo responsável é o Dr. Samuel Paiva (Cenargen - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Infelizmente, não há medidas de OPG para esses animais logo, o teste de associação não foi realizado.

5 CONCLUSÕES

A similaridade entre as sequências de caprinos e bovinos foi muito importante para o início do trabalho pois foi o ponto de partida, devido a escassez de sequências de caprinos depositadas em bancos de dados atualmente. As condições testadas da reação em cadeia da polimerase, com os *primers* desenhados para a sequência de bovinos, foram ideais para a amplificação dos segmentos dos genes IL2, IL4, IL13, IFNg e TNFa. A técnica PCR-ARMs foi adequada para a genotipagem de um dos SNPs encontrados no gene IL2, bem como para a verificação do mesmo SNP em raças comuns no nordeste brasileiro.

Com base em procedimentos analíticos e a valiosa contribuição da bioinformática encontrou-se vinte polimorfismos de base única, dois deles no gene IL2, um no gene IL4, um no IL13, seis no IFNg e dez no TNFa. Após teste estatístico, oito polimorfismos foram associados à verminose gastrointestinal, considerando-se 44 animais extremos para resistência ($P \leq 0,05$). Como a área de marcadores moleculares para caprinos é pouco avançada quando comparada a de bovinos, essa contribuição à genética da espécie é inédita e de grande relevância.

6 TRABALHOS FUTUROS

Próximos trabalhos podem ser realizados visando a genotipagem de todos esses SNPs na população, não só nos extremos selecionados, procurando-se construir um modelo mais robusto de análise de variância. Outros genes envolvidos no sistema imunológico podem ser prospectados, considerando os extremos de resistência já estudados para essa população.

Esses SNPs podem também ser um ponto inicial para o estudo de outras populações de caprinos, outros cruzamentos de raças diferentes, visando a associação com a resistência à verminose gastrointestinal. Os SNPs encontrados, não associados com a resistência, podem ser estudados visando à associação com outros fenótipos de interesse econômico, como a produção de leite, produção de carne, maciez de carne, produção de pelo, couro, etc. Além disso, esses SNPs também podem ser estudados em ovinos, devido à similaridade entre as espécies.

Espera-se que esse trabalho contribua significativamente com as pesquisas dessa espécie tão importante para a agropecuária brasileira, em especial para a do nordeste brasileiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE 2011. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm>>. Acesso em abril/2011.
- ² GOULARD, D. F.; FAVERO, L. A.; ALVES, R. S.; LIMA, T. A. S.; CAMPOS FILHO, V. M.B. A cadeia produtiva da ovinocaprinocultura nas regiões central e oeste do estado do Rio Grande do Norte: estrutura, gargalos e vantagens competitivas., In: **SOBER 47: Sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**, Porto Alegre, p.1-15, 2009.
- ³ SOUZA, W. H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Technologia & ciência agropecuária**, João Pessoa, v.1, p.51-58, 2007.
- ⁴ Caprinocultura no Brasil: estatísticas e evidências, por Martins E. C. Disponível em: <<http://ovinosecaprinos.iepec.com/noticia/caprinocultura-no-brasil-algumas-estatisticas-e-evidencias>> Acesso em dezembro/2011. Disponível em <http://www.paginarural.com.br/artigo/2124/caprinocultura-no-brasil-estatisticas-e-evidencias>. Acesso em maio/2012.
- ⁵ Brasil é o 8º. Maior criador de caprinos e ovinos do mundo. Disponível em <http://www.apta.sp.gov.br/print.php?id=2219>. Acesso em maio/2012.
- ⁶ Raças caprino (SEBRAE). Disponível em <http://www.sebrae.com.br/setor/ovino-e-caprino/o-setor/racas-caprino/>. Acesso em dezembro/2011.
- ⁷ Catálogo Rural (enciclopédia). Disponível em: < http://www.agrov.com/animais/sui_cap_ovi/repartida.htm > Acesso em dezembro/2011.
- ⁸ Manual de Criação de Caprinos e Ovinos, Brasília, 2011. Disponível em: < <http://www.codevasf.gov.br> > Acesso em janeiro/2010.
- ⁹ CAPRIL SERRA DE ANDRADAS (CAPRITEC). Tradição e progresso genético em Saanen desde 1879. Disponível em <<http://www.capritec.com.br/csa/Rebanho/Saanen/Reb-Saa.htm>>. Acesso em abril/2011.
- ¹⁰ Anglo-nubiana. Disponível em <http://www.fazendasnoca.com.br/Anglo-Nubiana.html>. Acesso em maio/2012.

- ¹¹ ZAROS, L. G.; BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N. J.; DE VRIES, E.; COUTINHO, L. L. Cytokine gene expression in response to *Haemonchus placei* infections in Nelore cattle. **Veterinary parasitology**, v.171, p. 68-73, 2010.
- ¹² NEVES, M. R. M.; VIEIRA, L. S.; ANDRIOLI, A. **Controle do parasitismo em cabras leiteiras criadas a pasto**. Sobral: EMBRAPA, 2008. 6p. (Boletim de pesquisa, 38).
- ¹³ VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. Sobral: EMBRAPA, 2003. 10p. (Boletim de pesquisa, 29).
- ¹⁴ 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.
- ¹⁵ AHID, S. M. M.; CAVALCANTE, M. D. A.; BEZERRA, A. C. D.S.; SOARES, H. S.; PEREIRA, R. H. M. A. Eficácia anti-helmíntica em rebanho caprino no estado de Alagoas, Brasil. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.1, p.56-59, 2007.
- ¹⁶ CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S. Ação da azadirachta indica (Neem) em nematódeos gastrintestinais em caprinos. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v.44, p.49-55, 2007.
- ¹⁷ AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; MAIA, M. B.; COSTA, V. M. M. C.; SOARES, H. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p. 212-218, 2008.
- ¹⁸ COSTA - JR, G. S.; MENDONÇA, I. L.; CAMPELO, J. E.; CAVALCANTE, R. R.; DANTAS - FILHO, L. A.; NASCIMENTO, I. M. R.; ALMEIDA, E. C. S. CHAVES, R. M. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p. 279-286, 2005.
- ¹⁹ JANEWAY - JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: o sistema immune na saúde e na doença**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ²⁰ BEAMAN, M. H.; WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Cytokines, toxoplasma and intracellular parasitism. **Immunological Reviews**, v.127, p.97, 1992.
- ²¹ TERKAWI, M. A.; ABOGE, G.; JIA, H.; GOO, Y. K.; OOKA, H.; YAMAGISHI, J.; NISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I.; KAWAZU, S. I.; FUJISAKI, K.; XUAN, X. Molecular and immunological characterization of Babesia gibsoni and Babesia microti heat shock protein – 70. **Parasite Immunology**, v.31, p.328-340, 2009.
- ²² CERRETTI, D. P.; MCKEREGHAN, K.; LARSEN, A.; CANTRELL, M. A.; ANDRESON, D.; GILLIS, S.; COSMAN, D.; BAKER, P. E. Cloning, sequence, and expression of bovine interleukin 2. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.83, p.3223-3337, 1986.

- ²³ ABERLE, J.; STIASNY, K.; KUNDI, M. Mechanistic insights into the impairment of memory B cells and antibody production in the elderly. **Age**, 2012.
- ²⁴ GRUNFELD, C.; SOUED, M.; ADI, S.; MOSER, A. H.; FIER, W.; DINARELLO, C. A.; FEINGOLD, K. R. Interleukin 4 inhibits stimulation of hepatic lipogenesis by tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6 but not by interferon -alfa. **Cancer Research**, v.51, p.2803-2807, 1991.
- ²⁵ TAZAWA, T.; SUGIURA, H.; SUGIURA, Y.; UEHARA, M. Relative importance of IL-4 and IL13 in lesional skin of atopic dermatitis. **Archives of dermatological Research**, v.295, p.459-464, 2004.
- ²⁶ JACSON, S. E.; HOLLOWAY, J. W.; WARNER, J. A.; SAMPSON, P. Interleukin – 13 not indimethacin, increases cysteinyl-leukotriene synthesis in human lungmacrophages. **Journal of allergy**, v.295, p.459-464, 2012.
- ²⁷ BARLOW, J. L.; BELLOSI, A.; HARDMAN, C. S.; DRYNAN, F.; WONG, S. H.; CRUICKSHANK, J. P.; MCKENZIE, A. N. J. Innate IL-13 producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 129, p.191-198, 2012.
- ²⁸ GENECARDS. Disponível em <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG>. Acesso em janeiro/2012.
- ²⁹ HUANG, S. W.; LEE, Y. P.; HUNG, Y. T.; LIN, C. H.; CHUANG, J. I.; LEI, H. Y.; SU, I. J.; YU, C. K. Exogenous interleukin-13 and interferon-gamma provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71 – infected mice. **Respiratory Research**, v. 12, p.147, 2011.
- ³⁰ AWAD, M. R.; WEBBER, S.; BOYLE, G.; STURCHIO, C.; AHMED, M.; MARTELL, J.; LAW, Y.; MILLER, S. A.; BOWMAN, P.; GRIBAR, S.; PIGULA, F.; MAZARIEGOS, G.; GRIFFITH, B. P.; ZEEVI, A. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. **The journal of heart and lung transplantation**, v. 20, p.625-630, 2001.
- ³¹ HENAO, M. I.; MONTES, C.; PARIS, S.; GARCIA, L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 86, p.11-19, 2006.
- ³² KAUL, D. Molecular link between cholesterol, cytokines and atherosclerosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 219, p.65-71, 2001.
- ³³ LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor review superfamilies integrating mammalian biology . **Cell**, v. 104, p.487-501, 2001.
- ³⁴ CHARDON, P.; VAIMAN, M.; KIRSZENBAUM, M.; GEFFROTEN, C.; RENARD, C.; COHEN, D. Restriction fragment length polymorphism of the major histocompatibility complex of the pig. **Immunogenetics**, v. 21, p.161-171, 1985.

- ³⁵ BECKMANN, J. S.; KASHI, Y.; HALERMAN, R. M.; NAVE, A.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein-Friesian dairy bulls. **Animal Genetics**, v. 17, p.25-38, 1986.
- ³⁶ FRIES, R.; EGGEN, A.; ATRANZINGER, G. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. **Genomics**, v. 8, p.403-406, 1990.
- ³⁷ COPPIETERS, W.; WEGHE, A.; PEELMAN, L.; ZEVEREN, A. A.; BOUQUET, Y.; DEPICKER, A. Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. **Animal Genetics**, v. 24, p.163-170, 1993.
- ³⁸ MARKLUND, S.; ELLEGREN, H.; ERIKSSON, S.; SANDBERG, K.; ANDERSSON, L. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. **Animal Genetics**, v. 25, p.19-23, 1994.
- ³⁹ MILLER, J. R.; DIXON, S. C.; MILLER, N. G.; TUCKER, E. M.; HINDKJAER, J.; THOMSEN, P.D. A chromosome 1-specific DNA library from domestic pig (*Sus Scrofa domestica*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 61, p.128-131, 1994.
- ⁴⁰ MOORE, S. S.; BYRNE, K.; BERGER, K. T.; BARENDSE, W.; MACCARTHY, F.; WOMACK, J.E.; HETZEL, D. J. S. Characterization of 65 bovine microsatellites. **Mammalian Genome**, v.5, p.84-90, 1994.
- ⁴¹ CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações e no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71, 2009.
- ⁴² REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. J. **Biologia molecular aplicada a produção animal**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.36, 2001.
- ⁴³ VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.275, 2002.
- ⁴⁴ SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **TREE**, v.15, p.199, 2000.
- ⁴⁵ SOBRINO, B.; BRION, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Science International**, v.154, p.181, 2005.
- ⁴⁶ SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews**, v.5, p.63, 2004.
- ⁴⁷ LUIKART, G.; ENGLAND, P. R.; TALLMON, D.; JORDAN, S.; TABERLET, P. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews**, v.4, p.981, 2003.
- ⁴⁸ PARISET, L.; CAPPUCIO, I.; MARSAN, P. A.; DUNNER, S.; LUIKART, G.; ENGLAND, P. R. Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds. **Journal of Chromatography B**, v.833, p.117, 2006.

- ⁴⁹ SHERRY, S. T.; WARD, M. H.; KHOLODOV, M.; BAKER, J.; PHAN, L.; SMIGIELSKI, E. M.; SIROTKIN, K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.308, 2001.
- ⁵⁰ COSENZA, G.; PAUCIULLO, A.; COLIMORO, L.; MANCUSI, A.; RANDO, A.; BERARDINO, D. D.; RAMUNNO, L. An SNP in the goat CSN2 promoter region is associated with the absence of B-casein in milk. **Animal Genetics**, v.38, p.655, 2007.
- ⁵¹ JAIN, A.; GOUR, D. S.; BISEN, P. S.; PRASHANT; DUBEY, PP.; SHAMA, D. K.; JOSHI, B. K.; KUMAR, D. Single Nucleotide polymorphism (SNP) in alpha-lactalbumin gene of Indian Jamunapari breed of *Capra hircus*. **Small Ruminant Research**, v.82, p.156, 2009.
- ⁵² JORDAN, S.; MIQUEL, C.; TABERLET, P.; LUIKART, G. Sequencing primers and SNPs for rapidly evolving reproductive loci in endangered ibex and their kin (Bovidae, *Capra* spp.). **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.776, 2006.
- ⁵³ PAUCIULLO, A.; COSENZA, G.; NICODEMO, D.; GALO, D.; MANCUSI, A.; CREPALDI, P.; BERARDINO D. D.; RAMMUNO, L. Molecular cloning, promoter analysis and SNP identification of Italian Nicastrina and Saanen lactoferrin gene. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v.134, p.279, 2010.
- ⁵⁴ GUO, B. L.; JIAO, Y.; HE, C.; WEI, L. X.; CHANG, Z. W.; YUE, X. P.; LAN X. Y.; CHEN, H.; LEI C. Z. A novel polymorphism of the lactoferrin gene and its association with milk composition and body traits in dairy goats. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.2199, 2010.
- ⁵⁵ FENG, T.; GENG, X. C.; LANG, X. Z.; CHU, M. X.; CAO, G. L.; DI, R.; FANG L.; CHEN, H. Q.; LIU X. L.; LI, N. Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. **Molecular Biology Reports**, on line, Springer, 2010.
- ⁵⁶ FENG, F. J. ; LI, X. L.; ZHOU, R. Y.; ZENG, G. R.; LI, L. H.; LI, D. F. Characterization and SNP Identification of Part of the Goat Melanophilin Gene. **Biochemical Genetics**, v.47, p.198, 2009.
- ⁵⁷ ECONOGENE. Sustainable conservation of animal genetic resources in marginal rural areas: integrating molecular genetics, socio-economic and geo-statistical approaches. Disponível em <http://www.econogene.eu/>. Acesso em maio/2011.
- ⁵⁸ FENG, T.; GENG, C. X.; LANG, X. Z.; CHU, M. X.; CAO, G. L.; DI, R.; FANG, L.; CHEN, H. Q.; LIU, X. L.; LI, N. Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.5189-5197, 2011.
- ⁵⁹ AN, X. P.; SONG, S. G.; HOU, J. X.; ZHU, C. M.; PENG, J. X.; LIU, X. Q.; XIAO, W. P.; ZHAO, H. P.; BAI, L.; WANG, J. G.; SONG, Y. X.; CAO, B. Y. Polymorphism identification in goat DGAT2 gene and association analysis with milk yield and fat percentage. **Small Ruminant Research**, v.100, p.107-112, 2011.

- ⁶⁰ DAGNACHEW, B. S.; THALLER, G.; LIEN, S.; ADNOY, T. Casein SNP in Norwegian goats additive and dominance effects on milk composition and quality. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.1-12, 2011.
- ⁶¹ AN, X.; WANG, L.; HOU, J.; LI, G.; SONG, Y.; WANG, J.; YANG, M.; CUI, Y.; CAO, B. Novel polymorphisms of goat growth hormone and growth hormone receptor genes and their effects on growth traits. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.4037-4043, 2011.
- ⁶² QIONG, W.; CHAO, F.; JUN, L. W.; YI, F.; GANG, Y. S. A novel mutation at exon 4 on IGF-1 gene in three Indigenous goat breeds in China. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, p.627-635, 2011.
- ⁶³ CHE, Z.; SUN, J.; LI, Z.; LAN, X.; ZHANG, C.; QU, Y.; LIU, Y.; FANG, X.; LEI, C.; CHEN, H. Novel SNPs in the caprine stearoyl-CoA desaturase (SCD) and decorin (DCN) genes that are associated with growth traits in Chinese goat breeds. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.3121-3127, 2011.
- ⁶⁴ JIN, Q. J.; FANG, X. T.; ZHANG, C. L.; YANG, L.; SUN, J. J.; CHEN, D. X.; DU, Y.; LAN, X. Y.; CHEN, H. Polymorphism of the VEGF gene and its association with growth traits in four goat breeds. **South African Journal of Animal Science**, v.40, p.33-40, 2010.
- ⁶⁵ WANG, P. Q.; DENG, L. M.; ZHANG, B. Y.; CHU, M. X.; TAN, Y.; FAN, Q.; LIU, C. X. Identification of polymorphism on leptin receptor gene of goats in southwest China. **Small Ruminant Research**, v.96, p.120-125, 2011.
- ⁶⁶ LI, X. L.; ZHAO, J.; TANG, C.; ZHOU, R.; ZHENG, G.; LI, L.; GUO, X. Sequencing of Part of the Goat agouti Gene and SNP Identification. **Biochemical Genetics**, v.48, p.152-156, 2010.
- ⁶⁷ COSTA, C. A.F.; VIEIRA, L.S.; BERNE, M. E. A.; SILVA, M. U. D.; GUIDONI, A. L.; FIGUEIREDO, E. A.P. Variability of resistance in goats infected with *Haemonchus contortus* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.88, p.153-158, 2000.
- ⁶⁸ YE, S.; DHILLON, S.; KE, X.; COLLINS, A. R.; DAY, I. N. M. J. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, v.29, p.1-8, 2001.
- ⁶⁹ DUTA-CORNESCU, G.; SIMON-GRUITA, A.; CONSTANTIN, N.; STANCIU, F.; DOBRE, M.; BANICA, D.; TUDUCE, R.; CRISTEA, P.; STOIAN, V. A comparative study of ARMS – PCR and RFLP – PCR as method for rapid SNP identification. **Romanian Biotechnological Letters**, v.14, p.4845-4850, 2009.
- ⁷⁰ AZEVEDO, L. O. M. **Técnicas básicas de biologia molecular**. 1.ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p.38, 2003.
- ⁷¹ EWING, B.; HILLIER, L.; WENDI, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, p.175, 1998.
- ⁷² PROSDOCIMI, F. et al., **Bioinformática: Manual do usuário**. Ano 5. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.29, 2002.

⁷³ GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.198, 1998.