

FLORA SUZANE PARENTE MAIA

**POLIMORFISMOS NO GENE DA  $\beta$ -DEFENSINA 1 E ASSOCIAÇÕES COM  
CARACTERÍSTICAS DE SANIDADE EM CAPRINOS**

TERESINA, PI

2017

FLORA SUZANE PARENTE MAIA

**POLIMORFISMOS NO GENE DA  $\beta$ -DEFENSINA 1 E ASSOCIAÇÕES COM  
CARACTERÍSTICAS DE SANIDADE EM CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo

TERESINA, PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**M217p** Maia, Flora Suzane Parente

Polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade em caprinos / Flora Suzane Parente Maia - 2017.

61 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo

1. Produção animal 2. SNP 3. Imunogenética 4. GBD-1  
5. Gene candidato I.Título

**CDD 636**

**POLIMORFISMOS NO GENE DA B-DEFENSINA 1 E ASSOCIAÇÕES COM  
CARACTERÍSTICAS DE SANIDADE EM CAPRINOS**

**FLORA SUZANE PARENTE MAIA**

**Dissertação Aprovada em: 08/03/2017**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo (Presidente) / DZO/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento (Interno) / DZO/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Fábio Barros Britto (Interno) / CCN/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho (Externo) / UFRA**

*À minha querida mãezinha, pois como ela mesmo diz: “Não existe nada melhor nessa vida do que mãe”. Obrigada por toda dedicação. Te amo muito!!!*

*Ao meu marido, por todo carinho, compreensão e amor!!!*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira e imensamente à Deus por ter me permitido chegar até aqui. Grandes desafios, lutas e vitórias foram superados e sem a Sua proteção eu nada teria alcançado.

Aos meus pais, *Carleide Parente* e *Pedro Maia* que acompanharam cada dia dessa trajetória, sempre muito preocupados e dispostos a ajudar. Obrigada por todo carinho e amor incondicional.

Agradeço ao meu querido e único irmão, *Pedro Junior* e minha cunhada, que se tornou irmã, *Fernanda Moura*, por sempre terem sido dois anjos em minha vida.

Às minhas queridas tias *Silvani*, *Marciane* e *Orlane Maia* que sempre me incentivaram, inspiraram e apoiaram em toda a minha formação acadêmica.

A todos os meus tios (as), primos (as) e avós (*in memorian*) por todo amor dedicado e pelo seu apoio e compreensão de minhas não-poucas ausências.

Agradeço ao meu esposo, *Junior Coelho*, por ser tão compreensivo e carinhoso. Obrigada pela força nos bons e maus momentos e por estar sempre me incentivando a nunca parar de estudar.

Aos amigos *Kelline Emanuelle*, *Janielly Coelho*, *Jéssica Mara*, *Sâmya Catarina*, *Manuella Beatriz*, *Ildneé Rios*, *Gustavo Henrique* e *Rodrigo Bonfim*, por toda amizade, união, apoio mútuo, carinho e por todos os bons momentos de riso fácil.

Aos professores do curso de Mestrado em Ciência Animal por todos os valiosos ensinamentos transmitidos, aulas inspiradoras e por dedicarem seu tempo e sua sabedoria para que a formação dos alunos seja também um aprendizado de vida. Em especial, ao professor e orientador *José Elivalto Guimarães Campelo*, um grande exemplo de profissional, ao qual só tenho a agradecer por todas as sugestões, ensinamentos, paciência e compreensão.

Ao Professor Doutor *José Lindenberg Rocha Sarmiento* por suas sugestões e auxílio nas extrações de DNA e por sua valiosa contribuição nas análises estatísticas e ao Doutor *Fábio Barros Britto* por tão gentilmente aceitar participar da banca examinadora.

As pessoas incríveis que tive o imenso prazer de conhecer em Bélem-PA. Serei eternamente grata ao Professor Doutor *Ednaldo da Silva Filho* pela oportunidade que me foi dada, com certeza os conhecimentos adquiridos levarei por toda a vida. Obrigada por toda contribuição e dicas repassadas durante minha estadia em Bélem. Agradeço ainda à *Taianara Tocantins*, por me tratar tão bem e por fazer da sua casa, a minha. Obrigada em especial a *Leonária Silva*, por ser tão solícita e me ajudar sempre que necessário. A *Rafaelle Casseb*, por toda sua simpatia e contribuição nas partes laboratoriais. A *Caio Silva*; ao Doutor *José*

*Ribamar Marques e a Francisco Arimatéia* por tornarem possível a realização das PCR's e o sequenciamento de DNA.

Aos colegas de mestrado e laboratório, em especial *Vanessa Neri, Laylson Borges, Ivamara Soares, Aurino Araújo, Bruna Lima, Tatiana Torres, Cicero Pereira e Diego Helcias* por contribuírem imensamente em partes importantes do trabalho, tanto nas coletas à campo como nas trocas de experiências no laboratório e nas aulas.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudo, o que me permitiu dedicar mais tempo ao curso de Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

*Muito Obrigada!*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

(Martin Luther King)

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Caprinocultura e sua importância para o Nordeste.....	17
2.2 Raça Anglonubiana.....	18
2.3 Características de sanidade que afetam a produção animal.....	19
2.4 Marcadores SNPs e o sequenciamento genético .....	24
2.5 Gene da defensina e seu potencial de uso como marcador genético .....	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
4 CAPÍTULO I: Polimorfismos no gene da $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade em caprinos.....	37
4.1 Resumo .....	39
4.2 Introdução.....	39
4.3 Material e Métodos.....	41
4.4 Resultados e Discussão.....	45
4.5 Agradecimentos.....	57
4.6 Referências.....	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu$	Microlitro
A	Base Nitrogenada Adenina
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
BAC	Cromossomo Artificial de Bactéria
C	Base Nitrogenada Citosina
CCA	Centro de Ciências Agrárias
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DZO	Departamento de Zootecnia
EDTA	Éter Dietil Tetrahydroacético
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
Freq	Frequência
g	Grama
G	Base Nitrogenada Guanina
GBD-1	Gene <i>Goat <math>\beta</math>-Defensin-1</i>
GBD-2	Gene <i>Goat <math>\beta</math>-Defensin-2</i>
HW	Hardy-Weinberg
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	Interferon Gama
<i>IL2</i>	Interleucina 2
<i>IL4</i>	Interleucina 4
<i>IL13</i>	Interleucina 13
KDa	Unidade de Medida de Massa Atômica
Kg	Quilograma
<i>Log</i>	Logaritmo natural
$\text{Log}_{10}$	Logaritmo na base 10
$\text{MgCl}_2$	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar

OOPG	Oocisto de Protozoário por Grama de Fezes
OPG	Ovos por Grama de Fezes
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos Iniciadores
QTL	Loci de Característica Quantitativa
SAS	Software de Análise Estatística (Statistical Analysis System)
SNP	Polimorfismo de Base Única (Single Nucleotide Polymorphism)
SRD	Sem Padrão Racial Definido
T	Base Nitrogenada Timina
U	Unidade de Medida de Massa Atômica
UFPI	Universidade Federal do Piauí

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Análise de predição do efeito das mudanças de aminoácidos na função da proteína <i>GBD-1</i> em caprinos da raça Anglonubiana.....	49
Tabela 2. Resultados das análises alélicas, genotípicas, heterozigosidades, consanguinidade e desvios de Hardy-Weinberg.....	50
Tabela 3. Probabilidades do desequilíbrio de ligação entre pares de SNPs encontrados no gene <i>GBD-1</i> em cabras da raça Anglonubiana.....	52
Tabela 4. Médias de características relacionadas a sanidade em caprino da raça Anglonubiana e probabilidade de significância dos genótipos de quatro SNPs localizados em diferentes posições no gene da Defensina.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de caprinos da raça Anglonubiana do rebanho experimental do DZO/CCA/UFPI.....	19
--	----

## CAPÍTULO 1

Figura 1. Sequência de 402 pb amplificada e sequenciada do <i>GBD-1</i> com indicação das posições das bases na referência GU480078.1 e as respectivas mutações observadas em um rebanho experimental de caprinos da raça Anglonubiana.....	46
Figura 2. Sequência do éxon 2 do gene <i>GBD-1</i> e a representação dos códons e seus respectivos aminoácidos. Estão em destaque os SNPs que resultaram em mutações não sinonímicas e seus aminoácidos.....	47

MAIA, F. S. P. **Polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade em caprinos**. 2017. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

## RESUMO

A região Nordeste Brasileira é responsável por grande parte da produção de caprinos do país e o estado do Piauí aparece como o 3º maior produtor desses animais. Entretanto, a caprinocultura nessa região é afetada por uma grande variedade de agentes patogênicos, com destaque para as verminoses gastrintestinais e coccidioses que causam perdas econômicas relevantes. As defensinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por leucócitos e células epiteliais e atuam na resposta imune inata, agindo contra diferentes microrganismos. O objetivo com o estudo foi identificar polimorfismos em parte do íntron 1, todo éxon 2 e na região terminal 3' do gene *Goat  $\beta$ -Defensin-1* e associa-los com características relacionadas a ocorrência de nematodeoses e protozooses em cabras da raça Anglonubiana, de um rebanho experimental localizado na região Nordeste do Brasil. O gene foi amplificado por PCR a partir do DNA extraído de amostras de sangue de 187 animais. Os seguimentos do gene foram sequenciados, alinhados, analisados e determinados os genótipos para cada polimorfismo encontrado. As análises de associação incluíram no modelo os efeitos fixos de idade do animal, grau de sangue e genótipo do marcador SNP. Como efeito aleatório, considerou-se o reprodutor e o erro aleatório associado a cada observação. Quando significativa, as médias entre genótipos foram comparadas usando a diferença mínima significativa de Fisher ( $P \leq 0,05$ ). Foram encontrados doze polimorfismos: dois no íntron 1; sete no éxon 2 e três na região terminal 3'. As alterações foram em sua maioria do tipo transição (67%). Os SNPs do éxon 2 foram responsáveis por mudanças de aminoácidos em seis códigos genéticos. No 40º códon, o códon selvagem (ACC) que codifica o aminoácido treonina, foi encontrado sob variadas formas que codificam três diferentes aminoácidos (aspartato, alanina e asparagina). Dos seis códigos genéticos alterados, as mudanças nos códons 25 e 33 afetaram a função proteica. Os valores de  $F_{is}$  foram elevados e positivos (entre 0,152 e 0,867) e 16,6% das possibilidades de pareamento entre os SNPs apresentaram desequilíbrio de ligação significativo ( $p < 0,05$ ). O SNP 1937 no gene da  *$\beta$ -Defensina 1* estava associado a quantidade de oocistos de protozoários; o SNP 2001 ao grau de anemia indicado pelo Famacha®; o 2046 estava afetando o grau Famacha® e a quantidade de oocistos de protozoários e o SNP 2140 estava associado ao Valor máximo de OPG do animal. Neste estudo há evidências que o gene da  *$\beta$ -Defensina 1* pode ser usado como marcador para a identificação de caprinos mais sensíveis à incidência de endoparasitas e protozoários.

**Palavras-chave:** SNP, Imunogenética, Produção Animal, GBD-1, Gene candidato.

MAIA, F. S. P. **Polymorphism in the  $\beta$ -defensin 1 gene and associations with health-related traits in goats.** 2017. 61p. Dissertation (Masters in Animal Science) – University Federal of Piauí, Teresina, 2017.

### ABSTRACT

The Northeast region of Brazil is responsible for a large part of the country's goat production and the state of Piauí appears as the third largest producer of these animals. However, goat breeding in this region is affected by a wide variety of pathogens, with emphasis on gastrointestinal verminoses and coccidiosis that cause relevant economic losses. The defensins are antimicrobial peptides produced by leukocytes and epithelial cells and act on the innate immune response, acting against different microorganisms. The aim of the study was to identify polymorphisms in part of the intron 1, all of the exon 2 and in the 3' terminal region of the *Goat  $\beta$ -Defensin-1* gene and associated them with characteristics related to the occurrence of nematodeoses and protozooses in Anglo- Of an experimental flock located in the Northeast region of Brazil. The gene was amplified by PCR from DNA extracted from blood samples from 187 animals. The gene sequences were sequenced, aligned, analyzed and determined the genotypes for each polymorphism found. The association analyzes included in the model the fixed effects of age of the animal, blood level and genotype of the SNP marker. As a random effect, we considered the breeder and the random error associated with each observation. When significant, the means between genotypes were compared using Fisher's minimal difference ( $P \leq 0.05$ ). Twelve polymorphisms were found: two in intron 1; Seven in exon 2 and three in the 3' terminal region. The changes were mostly of the transition type (67%). Exon 2 SNPs were responsible for amino acid changes in six genetic codes. In the 40th codon, the wild codon (ACC) encoding the amino acid threonine has been found in various forms that encode three different amino acids (aspartate, alanine and asparagine). Of the six altered genetic codes, changes in codons 25 and 33 affected protein function. The Fis values were high and positive (between 0.152 and 0.867) and 16.6% of the possibilities of pairing between the SNPs showed significant linkage disequilibrium ( $p < 0.05$ ). The 1937 SNP in the  *$\beta$ -Defensin 1* gene was associated with the amount of protozoan oocysts; The 2001 SNP to the degree of anemia indicated by Famacha ©; 2046 was affecting the Famacha® grade and the amount of protozoan oocysts and the SNP 2140 was associated with the maximum OPG value of the animal. With this study there is evidence that the  *$\beta$ -Defensin 1* gene can be used as a marker for selection of goats more susceptible or more resistant to diseases caused by endoparasites.

**Keywords:** SNP, Immunogenetics, Livestock, GBD-1, Gene candidate.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2015), o rebanho mundial de caprinos é de aproximadamente 1 bilhão de animais e o Brasil é o 22º no ranque internacional com um rebanho em torno de 8,8 milhões de caprinos. A região Nordeste, por sua vez, possui 90% do rebanho Nacional e o Estado do Piauí é o terceiro maior produtor, com um efetivo de 14,5% desta região. Ainda segundo a FAO (2015), a caprinocultura no Brasil tem papel importante no contexto sócio-econômico para a região Nordeste, por oferecer uma fonte de proteína (carne, leite e pele), tanto para o consumo familiar, como para o comércio da região.

Entretanto, a caprinocultura nessa região é afetada por uma grande variedade de doenças e agentes patogênicos como nematódeos, protozoários, bactérias, vírus, entre outros. Dentre estas alterações, as verminoses gastrintestinais e as coccidioses se destacam como um relevante problema sanitário. Tais doenças são as mais comuns na região (LIRA et al., 2013) e, em geral, estão associadas as práticas de manejo, ocorrendo em muitos casos, situações de superlotação e contaminação de água e alimentos. O baixo nível tecnológico adotado na maioria dos sistemas de produção da região contribui muito para agravar os casos de nematodeoses e protozooses. Sem a adequação das condições sanitárias, estas patologias podem influenciar na produtividade, acarretando em perdas econômicas devido à diminuição da produção, aumento na taxa de mortalidade dos animais e nos custos de profilaxia (SALGADO; SANTOS, 2016).

Neste sentido, as defensinas são peptídeos antimicrobianos (AMPs) que têm um papel importante na resposta imune inata, atuando contra bactérias, vírus e fungos. Os AMPs são considerados como a “nova geração de antibióticos” por sua potencial utilização na medicina preventiva e terapêutica. Neste grupo, as defensinas apresentam-se como a família mais numerosa de peptídeos catiônicos (BAGNICKA et al., 2010).

Dependendo do tamanho e do emparelhamento de seus resíduos de cisteína, as defensinas podem ser classificadas em  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\theta$ -defensinas (ZHAO et al., 1999). Duas beta-defensinas foram identificadas em caprinos, as *Goat  $\beta$ -Defensin (GBD) -1 e -2*. Os genes de seus precursores: preproGBD-1 e preproGBD-2 compartilham 96,8% de identidade na sequência nucleotídica e 88,2% na sequência de aminoácidos. Relata-se a expressão de GBD-1 transcrito na língua, traqueia, brônquios e pulmões. Já GBD-2 foi encontrado no estômago, intestino grosso e reto (ZHAO et al., 1999).

Nos mamíferos os genes alfa e beta-defensina possuem dois éxons (HUTTNER et al., 1998). O primeiro éxon codifica a região 5' não traduzida (5'UTR) além do domínio do pré-pro-peptídeo. O segundo éxon, por sua vez, contém a informação necessária para codificar o peptídeo maduro (SOMAN et al., 2009).

A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas sequências dos genes da defensina pode ajudar a elucidar o papel que este gene exerce sobre doenças que afetam a produção animal. Os marcadores moleculares, em especial os SNPs, tornaram-se uma importante ferramenta que permite impulsionar estudos genéticos em diferentes espécies e podem estar associados ainda a características de interesse econômico como doenças genéticas, desempenho e resistência a patologias (AMARANTE; WOMACK, 2004).

Existem poucos estudos sobre polimorfismos no gene da defensina em animais de produção e do seu efeito sobre a susceptibilidade a doenças e nas características produtivas. Em caprinos, não foram encontrados estudos associando polimorfismos nos genes da  $\beta$ -defensina com fenótipos indicadores da resposta dos animais a doenças causadas por endoparasitas. Apesar das defensinas agirem principalmente contra bactérias e microrganismos, essa pesquisa deseja verificar se há atuação também contra organismos superiores, como os nematódeos. Assim, o objetivo com o estudo foi analisar a sequência de nucleotídeos em parte do íntron 1, todo éxon 2 e na região terminal 3' do gene GBD-1 em um rebanho experimental de caprinos da raça Anglonubiana, a fim de identificar e associar SNPs com características relacionadas a ocorrência de nematodeoses e protozooses em fêmeas.

Esta Dissertação está organizada em um capítulo, de acordo com as exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para o nível de Mestrado. Inicialmente, tem-se uma revisão de literatura com os principais tópicos a serem abordados no capítulo e que servirão de base teórica à dissertação. Segue com o capítulo I, que estuda polimorfismos genéticos em diferentes regiões do gene *Goat  $\beta$ -Defensin 1* em caprinos Anglonubianos da cidade de Teresina-PI. O capítulo, intitulado “**Polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade em caprinos**” obedece às normas da revista **Animal Genetics** (ISSN Online: 1365-2052), à qual será submetido à análise para publicação. A dissertação é finalizada com as Considerações Finais, bem como as Referências Bibliográficas utilizadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Caprinocultura e sua importância para o Nordeste

Não há registros históricos precisos sobre os primórdios da domesticação da cabra pelo homem. Estimativas mais conservadoras apontam que o convívio começou há cerca de seis mil anos (CONAB, 2006). No Brasil, a cabra doméstica (*Capra hircus*) foi introduzida com a chegada dos portugueses. Acredita-se que essa introdução tenha acontecido em 1534, simultaneamente com os bovinos, quando Dona Ana Pimentel, esposa de Martim Afonso de Sousa, solicitou a importação destes últimos na Capitania de São Vicente (PIRES, 1990). Desde então a cabra se consolidou na porção setentrional do país.

Além da variedade de produtos oferecidos pelos caprinos, esses animais são valorizados pela capacidade de adaptação a diferentes regiões. De acordo com Castro (1984), as cabras habitam regiões com grande variedade de clima, topografia e fertilidade, como as zonas altas e frias do Himalaia, as planícies quentes do continente africano, além de regiões montanhosas do Hemisfério Sul e o próprio semiárido do Nordeste brasileiro. Outro motivo para o sucesso da caprinocultura é que a produção se disseminou principalmente entre os países pobres, representando fonte de renda e alternativa alimentar para milhões de famílias. Uma estimativa indica que 94,2% dos animais estão em países pobres (CONAB, 2006).

Entretanto, nas condições predominantes nesses países e em especial no Nordeste brasileiro, a caprinocultura de subsistência geralmente falha no aspecto sanitário. Assim, o animal é submetido a pressão de seleção natural por ação de microrganismos, forçando a adaptação às condições adversas. Os animais mais adaptados ao ambiente hostil do semiárido brasileiro, ou seja, aqueles que respondem de forma mais eficiente às doenças causadas pelos microorganismos patogênicos da região, podem se caracterizar como importante recurso genético, aptos a atender a futuros programas de melhoramento animal.

É fato que muitos produtores procuram melhorar o seu rebanho por meio de seleção dentro da raça ou utilizando mais de uma raça através de cruzamentos. O cruzamento entre raças especializadas e locais tem sido incentivado por proporcionar genótipos com melhor rendimento e qualidade de carcaça, motivo pelo qual nos últimos anos algumas raças exóticas têm sido introduzidas no país, principalmente com a perspectiva de melhorar geneticamente a produção de carne e leite das raças locais (OLIVEIRA, 2006). O uso desses animais mestiços, aproveitando o “vigor híbrido”, permite o nascimento de cabritos mais resistentes e com

maior velocidade de crescimento, favorecendo a combinação das características desejáveis das raças parentais nas condições semiáridas (SILVA; ARAÚJO, 2000).

Numa região em que as oportunidades econômicas são poucas em função de diversas limitações (escassez de água e ausência de alimento para o rebanho em períodos de estiagens), a caprinocultura coloca-se como uma alternativa para a geração de emprego e renda capaz de estimular o desenvolvimento local. Porém, é necessário que a atividade se profissionalize, modificando o caráter de subsistência que a caracteriza (POMPONET, 2009). Em unidades produtivas que usam algum nível de tecnologia, é notável a melhoria na produção e reprodução, criando assim perspectivas de organização empresarial da atividade (COSTA; MEDEIROS; CARVALHO, 2003).

## **2.2 Raça Anglonubiana**

A raça de caprinos Anglonubiana, originária da Inglaterra, é a mais usada no território brasileiro para a produção de carne, embora seja considerada de aptidão mista, carne e leite. Sua formação se deu a partir de cruzamentos entre caprinos ingleses comuns e reprodutores importados do norte da África (região da Núbia no Egito) (MASON, 1988).

Foi introduzida no Nordeste brasileiro a partir do século XIX, apresentada como raça exótica com potencial para aumento dos índices de produtividade dos rebanhos locais. Esses animais são bem aceitos pelos criadores de caprinos da região Nordeste, devido principalmente às suas qualidades de rusticidade e elevada produção. São ainda animais bem adaptados a regiões semiáridas por possuírem na sua formação a presença de raça originária de país de clima quente (SILVA et al., 2006).

Em adequadas condições de manejo, trata-se de uma raça rústica, prolífera, com boa habilidade materna e bom desempenho produtivo e reprodutivo. Os machos apresentam altura de 90 a 100 cm e pesam em média entre 75 e 95 kg. Já a altura das fêmeas está entre 70 a 90 cm e seu peso entre 41 e 65 kg. São animais de grande porte, com corpo longo se apresentando como raça para criação a pasto (ACCOBA, 2002). De acordo com Borges e Gonçalves (2002), a produção de leite pode chegar a 2-4 kg/dia. Os cabritos aos três meses pesam em torno de 21 a 22 kg, se manejados com suplementação alimentar. São animais que possuem grande variedade de pelagens (Figura 1). Seus pelos tendem para uma cor escura, porém com certa frequência de pelagem malhada ou tartaruga. Apresentam ainda pelos curtos e brilhantes e pele solta, o que dá qualidade ao couro (ACCOBA, 2002).



Figura 1. Exemplos de caprinos da raça Anglonubiana do rebanho experimental do DZO/CCA/UFPI (Fonte: Marcelo Oliveira)

No Piauí, assim como nos demais estados do Nordeste, há um número significativo de caprinos da raça Anglonubiana, entretanto, em maior quantidade na forma de mestiços. Levantamentos populacionais feitos com caprinos no estado do Piauí evidenciaram que a raça tem grande participação na formação de alguns grupos raciais da região, contribuindo especialmente com os animais SRD (COSTA, 2010; CASTELO BRANCO, 2011).

Entretanto, a dificuldade em manter o rebanho em condições sanitárias adequadas pode comprometer a eficiência da criação destes animais (BATISTA et al., 2014). Na região, caprinos desta raça são acometidos por uma grande variedade de agentes patogênicos, sendo relevantes as doenças causadas por endoparasitas como as protozooses e as nematodeoses gastrintestinais.

### **2.3 Características de sanidade que afetam a produção animal**

Por predominar na região Nordeste a criação extensiva, executada com infra-estrutura inadequada, baixa adoção de tecnologias e limitação nutricional e sanitária em determinados períodos do ano, é comum a ocorrência de endoparasitoses. Várias dessas alterações elevam a taxa de mortalidade em animais jovens e diminui índices produtivos nos animais adultos (SALGADO; SANTOS, 2016). Nesse âmbito ganham destaque as doenças causadas por protozoários de diferentes espécies e as verminoses gastrintestinais.

Entre as protozooses, ou seja, doenças causadas por protozoários, a coccidiose é uma das mais comuns. Lira et al. (2013) pesquisaram as doenças mais frequentes em caprinos e ovinos do semiárido nordestino e verificaram maior ocorrência de coccidiose e helmintoses

gastrintestinais. A coccidiose pode se referir a várias doenças causadas por parasitas da subclasse *Coccidia*, como por exemplo os gêneros *Eimeria*, *Isospora* e *Cryptosporidium*. Entretanto, a doença refere-se, principalmente a parasitas do gênero *Eimeria* (PAREDES, 2010).

A maioria das espécies de *Eimeria* infectam células intestinais dos ruminantes e devido ao mecanismo de ação do parasita (lesão das vilosidades intestinais responsáveis pela absorção dos nutrientes da dieta), a diarreia aparece como um dos principais sinais clínicos associados à Eimeriose (KRUININGEN, 1998), que muitas vezes podem ser confundidos com as verminoses convencionais, dificultando o diagnóstico. Os sinais clínicos incluem ainda a presença de muco ou sangue nas fezes, acompanhada por desidratação, anemia, baixa conversão alimentar, baixo ganho de peso diário, emagrecimento progressivo, fraqueza ou morte, que ocorre principalmente em animais jovens.

Entre os fatores que influenciam a ocorrência da doença estão a imunidade do hospedeiro, o manejo sanitário do sistema de exploração, o clima, a alimentação, a idade do animal, entre outros (PAREDES, 2010). Os animais jovens frequentemente são mais acometidos. Fato verificado por Hassum e Menezes (2005), que observaram intensidade de infecção por *Eimeria* baixa em adultos e proporcionalmente elevada nos jovens. Os autores concluíram ainda que a infecção foi constante, provavelmente mantida pelos animais adultos e pelas condições ambientais favoráveis à disseminação e manutenção dos oocistos.

A coccidiose está intimamente associada as práticas de manejo, ocorrendo muitas vezes situações de superlotação e contaminação de água e alimentos. Assim, a melhoria das condições higiênicas e sanitárias reduz o nível de infecção e a incidência de surtos clínicos (DENIZ, 2008). O diagnóstico deve ser baseado no conjunto de informações colhidas durante a anamnese do rebanho, nos sinais clínicos e em exame coproparasitológico, que permite a identificação de oocistos a partir de amostras de fezes (CANTELLI et al., 2007). Os animais acometidos devem receber tratamento sintomático para controle da diarreia, desidratação, infecções secundárias e pneumonias (LIMA, 2004), além disso deve ser instituído tratamento profilático e terapêutico com fármacos como sulfamidas, amprolium e triazinonas.

Feitosa et al. (2009) constataram alta carga parasitária ao avaliar o número de oocistos de *Eimeria* por gramas de fezes (OOPG) em caprinos do cariri cearense (média de 3631 para os machos). O estudo de Silva et al. (2012) acompanhou a correlação entre infecções por helmintos gastrintestinais e coccídeos no ganho de peso e hematócrito de caprinos Anglonubianos em fase de crescimento, criados na região metropolitana de Recife. Os resultados destacaram infecção por parasitos, em especial ovos tipo *Strongyloidea*, assim

como oocistos de *Eimeria* spp. além de correlação significativa entre a presença de oocistos de *Eimeria* spp e redução do ganho de peso e valores do hematócrito.

As verminoses gastrintestinais também causam problemas sanitários relevantes na caprinocultura do Nordeste brasileiro, prevalecendo os parasitos pertencentes às classes Nematoda, Cestoda e Trematoda. Os principais endoparasitas que acometem os animais são *Haemonchus contortus* (abomaso), *Trichostrongylus sp* (abomaso/intestino delgado), *Cooperia sp* (intestino delgado), *Oesophagostomum columbianum* (intestino grosso), *Trichuris sp* (intestino grosso), *Cysticercus sp* (cavidade abdominal) e *Strongyloides papillosus* (intestino delgado) (COSTA JÚNIOR et al., 2005).

Em termos de prevalência no Brasil, o *Haemonchus sp* destaca-se, apresentando grande patogenicidade (AMARANTE, 2005). O *Haemonchus contortus* mostra alto grau de hematofagismo, acarretando na incapacidade do hospedeiro em compensar as perdas sanguíneas (LAGARES, 2008). Como se alimenta de sangue, em pouco tempo os animais adquirem anemia grave e a resposta imunológica é lenta e incompleta (NEVES et al., 2008).

Geralmente os caprinos são hospedeiros de uma ou mais espécie de endoparasitas, que infectam principalmente animais jovens, visto que seu sistema imune não está completamente desenvolvido. Frequentemente, essas infecções são de caráter misto com muitas espécies atuando de maneiras diferentes sobre o organismo do animal (GIRÃO et al., 1992). A alta prolificidade, adaptabilidade e resistência a várias condições climáticas fazem com que tanto ecto quanto endoparasitas tenham ampla distribuição geográfica e alta prevalência, tanto em regiões com clima temperado como clima tropical. A maior ou menor prevalência de uma ou mais espécies parasitas depende de um conjunto de fatores como: temperatura ambiente, precipitação pluviométrica, solo, tipo e manejo da pastagem, espécie, raça, idade, estado fisiológico e nutricional e manejo dos animais (RUAS; BERNE, 2001).

Vários estudos destacam os fatores relevantes e que favorecem o aparecimento de infecções por nematoides gastrintestinais em rebanhos caprinos. Brito et al. (2009), em sua pesquisa com caprinos criados em sistema extensivo no estado do Maranhão, verificaram maior índice de parasitismo no período chuvoso do ano, devido ao aumento da umidade que ocorre neste período, oferecendo assim, um ambiente favorável aos endoparasitas. Batista et al. (2014) estudaram caprinos Anglonubianos no Piauí, buscando avaliar a sensibilidade das matrizes a nematoides gastrintestinais. Os autores verificaram que fatores como lactação aumenta a sensibilidade ao endoparasitismo. A elevação do número de ovos por grama de fezes (OPG) mostrou-se associada a maior grau de anemia detectado pelo método Famacha®, o que por sua vez, acarretava na redução da condição corporal.

Em relação a raças é relevante o estudo feito por Costa et al. (2000), que verificaram a variabilidade na resposta à infecção por nematódeos gastrintestinais, entre e dentro do mesmo genótipo, em fêmeas jovens das raças Canindé, Anglonubiana e Bhuj, expostas à infecção natural, através da contagem de ovos nas fezes, determinação do hematócrito e hemoglobina. Todos os parâmetros avaliados variaram significativamente dentro de cada uma das raças e quanto à variabilidade entre as raças, a Anglonubiana apresentou melhor resposta à infecção por nematódeos gastrintestinais que as demais.

Como resposta às nematodeoses gastrintestinais, os animais podem apresentar resistência ou tolerância (resiliência). Quando ocorre a resistência a endoparasitas, a resposta imunológica limita o estabelecimento do parasita. Já na tolerância, os animais são capazes de “conviver” com os parasitas com redução mínima da produtividade (AMARANTE, 2004).

A confirmação de resistência a verminose através da genética molecular ganhou espaço nos últimos anos, em especial a identificação de loci de característica quantitativa (QTL) associado coerentemente com resistência genética ao patógeno. Esses estudos têm sido favorecidos pela evolução nas metodologias moleculares e nas estatísticas envolvidas nas análises. Entretanto, nessas pesquisas também deve-se incluir a correta identificação da resposta fenotípica dos animais expressando resistência no ambiente onde estão sendo criados. Dentre os critérios de avaliação dessa resposta constata-se o uso de valores do OPG (LÔBO et al., 2009), o método Famacha© (BURKE et al., 2007), entre outros.

Um dos principais métodos de avaliação de helmintos gastrintestinais é a contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), que consiste na determinação do grau de infecção do animal de acordo com a carga parasitária (UENO; GONÇALVES, 1998). É uma técnica simples, rápida e de baixo custo. Alguns estudos utilizaram-se do OPG para verificar a resistência dos animais a verminose, separando-os em grupos de “resistentes e “susceptíveis”, como na pesquisa realizada por Coutinho (2012), que verificou a utilização de marcadores fenotípicos para caracterização da resposta de caprinos a nematodeoses e classificou como resistentes o animal com média de OPG igual a 763, enquanto aquele com OPG superior a 3631 foi considerado susceptível. Apesar das vantagens, o método de contagem OPG apenas permite a identificação quantitativa dos ovos e presença de oocistos de protozoários (OoP), assim, métodos alternativos de avaliação devem ser utilizados.

Devido a disseminação de populações de endoparasitos resistentes aos antihelmínticos, um enfoque de controle da verminose ganhou destaque através do Método Famacha©, que consiste em vermifugar o menor número possível de animais e com menor frequência. O método objetiva identificar clinicamente animais resistentes, resilientes e sensíveis às

infecções parasitárias e é baseado na avaliação clínica de diferentes graus de anemia decorrentes da infecção por *Haemonchus contortus* (MOLENTO et al., 2004).

Trata-se de um método bastante utilizado para o controle de verminoses por ser prático, rápido e de baixo custo. A avaliação consiste na comparação de diferentes tonalidades da mucosa conjuntiva (vermelho, rosa-vermelho, rosa, rosa-pálido e branco) com notas que indicam a necessidade de tratar os animais. Esse método permite o tratamento apenas dos animais que apresentam anemia (MAIA; MORAES; SOTOMAIOR, 2013). As notas para as diferentes tonalidades da conjuntiva variam de 1 a 5 (sendo 5, o maior grau de anemia) e são comparadas com um padrão pré-estabelecido de cores representadas em um cartão guia desenvolvido para utilização a campo (MALAN et al., 2001). Pesquisas vêm indicando que o mais alto grau de anemia Famacha<sup>®</sup> está associado a maior OPG, bem como à presença de *H. Contortus*, demonstrando que o método pode ser bastante eficiente como auxiliar no controle da hemoncose (CAVELE et al., 2009).

O peso e o escore da condição corporal são medidas indiretas de avaliação da presença de nematodeoses. O peso é um dos principais parâmetros afetados pelas verminoses. A perda de peso ocorre, pois, os helmintos causam redução no consumo voluntário de alimentos e provocam danos na digestão e absorção de nutrientes, resultando em diminuição do ganho de peso, sendo uma importante causa de mortalidade no rebanho e de redução na produtividade (LOUREIRO, 2007). Benvenuti et al. (2008; 2010) observaram um maior ganho médio de peso no grupo de caprinos considerado “resistente” a nematódeos gastrintestinais e verificaram correlações negativas entre OPG e peso.

Já a utilização do escore da condição corporal baseia-se na classificação dos animais em função da cobertura muscular e da massa de gordura, estimando assim, o estado nutricional dos animais por meio de avaliação visual e/ou tátil, constituindo uma ferramenta importante de manejo. São atribuídas notas aos animais de acordo com a quantidade de reservas teciduais, especialmente de gordura e de músculos, em determinadas regiões do corpo. Em cabras a avaliação deve ter como base a palpação da região lombar e do esterno (MACHADO et al., 2008). As notas variam de 1 a 5, sendo considerado 2,5 e 3,5 como notas ideais para a condição corporal; abaixo de 2,5 é indicativo de escore ruim. Em caprinos deve-se ter um cuidado a mais, pois mesmo quando aparentemente magros (baixa deposição de gordura subcutânea), estes animais apresentam grande quantidade de tecido adiposo no abdômen (RIBEIRO, 1998).

O controle dos nematódeos tem sido abordado de formas diversas, frequentemente associando tratamento anti-helmíntico às práticas de manejo que visem a descontaminação

das pastagens. No entanto, a frequência do tratamento anti-helmíntico é extremamente responsável pela disseminação da resistência parasitária, situação em que se encontra uma grande quantidade de nematóides gastrintestinais (SISSAY et al., 2006). Assim, recomenda-se diminuir ao máximo o número de tratamentos químicos por ano e associar o monitoramento dos animais através de métodos como OPG e Famacha®.

A obtenção de resistência ao parasitismo apresenta vantagens por focar aspectos éticos e de conservação ambiental, pois objetiva diminuir o uso de químicos, que em geral são poderosos contaminantes ambientais e que põe em risco a saúde humana. O aspecto ético está no fato de se buscar animais menos dependentes da proteção do homem e que se tornem mais versáteis diante das variações ambientais (SILVA, 2011).

Assim, a identificação de marcadores que possam assinalar uma maior resistência a doenças é de grande importância no melhoramento dos caprinos criados no semiárido. As defensas podem desempenhar papel relevante nesse sentido. A presença de polimorfismos de base única (SNPs) na sequência deste gene pode contribuir para novas descobertas acerca dos impactos que as alterações patológicas podem causar nos animais. Entretanto, os aspectos da genética molecular envolvidos com a resistência a doenças em caprinos do Nordeste brasileiro não têm recebido atenção como outros temas na região, razão pela qual a temática será abordada no tópico que segue.

## **2.4 Marcadores SNPs e o sequenciamento genético**

Os avanços tecnológicos trouxeram metodologias de elevado desempenho e acurácia para a ascensão da genética molecular, entre elas estão o sequenciamento genético e os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Esses marcadores são baseados nas alterações mais comuns da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações que mais ocorrem são as transições, onde há troca de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra. Mutações onde ocorre troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa, são chamadas de transversões e são menos frequentes, pois as enzimas de reparo do DNA podem reconhecer mais facilmente um erro de replicação devido a transversões (CAETANO, 2009).

Os SNPs representam a maior origem de variações interindividuais genéticas (BRAY; BOERWINKLE; DORIS, 2001), podendo ser usados para detectar as contribuições poligênicas em algumas doenças e funcionando como uma poderosa ferramenta na avaliação

de marcadores genéticos (SCHWARTZ; NAIR, 1999). Em geral são bi-alélicos, isto é, são encontradas apenas duas variantes em uma espécie. Tais marcadores podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, entretanto, na maioria das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (CAETANO, 2009).

A vantagem dos SNPs, comparativamente a outros marcadores, está na possibilidade de detecção de uma grande quantidade de polimorfismo entre alelos de determinado gene. Entre as desvantagens estão o custo alto relacionado a infra-estrutura da técnica e a necessidade do conhecimento prévio da sequência do gene de interesse (FALEIRO, 2007).

Entretanto, genomas mapeados de vários organismos já estão disponíveis, inclusive de caprinos (*Capra hircus*), tornando assim o uso de SNP menos trabalhoso, pois a maior parte das sequências codificantes de proteínas metabólicas ou estruturais de células de mamíferos, mantiveram-se conservadas na maior parte de sua extensão ao longo da evolução, o que permite a comparação com sequências de organismo já densamente mapeadas como o genoma humano. Desta forma, explorando-se correlações de sequências genéticas, torna-se possível a identificação de possíveis genes candidatos (TOSSER-KLOPP et al., 2014).

Um método para a detecção de SNPs é o sequenciamento direto do DNA. O sequenciamento de genoma consiste na determinação da ordem das sequências de nucleotídeos ao longo da molécula de DNA de um organismo. A história do sequenciamento iniciou-se em meados da década de 70, primeiramente com a metodologia descrita por Frederick Sanger e colaboradores em 1975, posteriormente aprimorada em 1977, que ficou conhecida por método de Sanger, didesoxi ou terminação de cadeia.

A metodologia é baseada no princípio da terminação controlada da polimerização pelo uso de didesoxinucleotídeos, o que permitia a determinação da ordem sequencial dos nucleotídeos que formam fragmentos da molécula do DNA (PEREIRA et al., 2013).

No sequenciamento de genomas complexos, como o humano, a técnica de Sanger se mostra pouco eficiente frente a plataformas fundamentadas em tecnologias de sequenciamento de próxima geração, ou de nova geração (Next-Generation Sequence – NGS). O método surgiu em meados da última década, trazendo consigo um grande desafio no que concerne a capacidade de armazenamento e processamento de dados, bem como a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de análise. Caracterizada pelo aumento na quantidade dos dados gerados, assim como por uma substancial redução nos custos para produzi-los, as novas tecnologias de sequenciamento geram sequências muito curtas, em comparação ao sequenciamento utilizando a tecnologia de Sanger (POP; SALZBERG, 2008; METZKER, 2010).

Uma etapa anterior ao sequenciamento propriamente dito é o uso de técnicas e/ou estratégias para obtenção dos fragmentos de DNA do genoma a ser sequenciado. Para tal, os cientistas utilizam duas técnicas: sequenciamento hierárquico e o sequenciamento completo por fragmentos aleatórios (*Whole Genome Shotgun Sequencing*). O sequenciamento hierárquico é comumente usado no sequenciamento de grandes genomas. Uma das primeiras etapas é a construção do mapa físico do genoma para auxiliar no momento da montagem, em seguida, grandes fragmentos do DNA genômico são clonados em vetores específicos, como os cromossomos artificiais de bactérias (BACs). O DNA desses clones são fragmentados novamente em pedaços menores; introduzidos em vetores conhecidos, como plasmídeos e submetido ao sequenciamento (TEIXEIRA; ARAÚJO, 2006).

Já o sequenciamento pelo método *shotgun*, ou WGS (*Whole Genome Shotgun*), é mais rápido e dispensa a fase de mapeamento físico, que é uma etapa laboriosa e demorada. Nesta técnica, o DNA genômico é fragmentado aleatoriamente em tamanhos entre 1 e 5 kb, inseridos em plasmídeos para a construção de bibliotecas e sequenciados. Além das bibliotecas de plasmídeos, bibliotecas de cosmídeos e/ou fosmídeos com fragmentos maiores, aproximadamente 40 kb, são construídas e sequenciadas para auxiliar na montagem e fechamento do genoma (TEIXEIRA; ARAÚJO, 2006).

As técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS) viraram realidade, com rápidos avanços tecnológicos na última década. Com a ajuda de ferramentas da bioinformática, o NGS possibilita o sequenciamento e análise de milhões de pares de bases (pb) em rodada única de leitura (PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011). A primeira geração de NGS iniciou-se com o desenvolvimento do equipamento 454 life science em 2000 ([www.454.com](http://www.454.com)). Essa plataforma de sequenciamento em larga escala de DNA permite produzir 25 milhões de pb em uma só leitura com mais de 99% de precisão (PEREIRA et al., 2013).

A segunda geração de NGS está representada por três plataformas: 454 FLX (Roche, EUA); Solexa (Illumina Inc., EUA) e SOLiD (Applied Biosystems, EUA), as quais apresentam elevada taxa de sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). Uma vez pronta as reações de sequenciamento, uma só corrida no sequenciador Applied Biosystems 3700 pode produzir sequências de mais de 1500 fragmentos de DNA de 500 pb em 48 horas com intervenção humana mínima. O corante químico para sequenciamento identificará em torno de 95% de heterozigotos. Outro corante, ligado ao primer, irá detectar 100% de heterozigotos (GRAY; CAMPBELL, 2000).

Já na terceira geração, as plataformas são capazes de produzir sequências entre 30 e 200 vezes mais extensas do que as de segunda (ROBERTS; CARNEIRO; SCHATZ, 2013). O primeiro sequenciador dessa geração foi o Heliscope™ (Pacific Bioscience, EUA), em seguida vieram outros como o SMRT™ (Pacific Bioscience, EUA) (PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011).

Para decifrar o genoma caprino, o International Goat Genome Consortium (IGGC) foi criado em março de 2010, na China. As ações iniciais do consórcio envolviam três áreas: sequenciamento do genoma caprino; mapeamento e desenvolvimento de um painel híbrido de radiação e a produção de chip de alta densidade de SNPs (RUMINANT GENOME BIOLOGY CONSORTIUM, 2010).

As tecnologias de sequenciamento vêm revolucionando diversas áreas do melhoramento genético animal. Tecnologias como as envolvidas nos estudos de associação genômica ampla (GWAS), em conjunto com os SNP chips, têm permitido a descoberta de genes com efeito significativo em determinadas características de interesse, favorecendo a utilização da informação proveniente destes marcadores na seleção. Assim, espera-se que novos avanços estejam disponíveis em poucos anos, trazendo possibilidades cada vez mais promissoras para o estudo genético dos animais domésticos (PEREIRA et al., 2013).

## **2.5 Gene da defensina e seu potencial de uso como marcador genético**

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra uma grande variedade de microrganismos e atua impossibilitando a reprodução dos agentes patogênicos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Diversas proteínas do sistema imune inato estão envolvidas em atividades contra microrganismos patogênicos, entre estas, destacam-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs), tais como catelicidinas, alfa e beta-defensinas.

São várias as ações dos AMPs, incluindo: influência sobre a expressão de moléculas de adesão; produção de adrenocorticóides; secreção de íons de cloreto; angiogênese e reparo de feridas. Além disso, eles são capazes de interagir com receptores de membrana, influenciando diferentes processos celulares como a liberação das citocinas, quimiotaxia e apresentação de antígenos (LAI; GALLO, 2009).

Baseado em sua carga total de líquidos, os AMPs podem ser diferenciados em aniônicos e catiônicos. Peptídeos catiônicos formam um grupo bastante numeroso de fatores antimicrobianos consistindo em várias famílias, incluindo as defensinas e catelicidinas. As defensinas são a família mais comum e consistem de peptídeos com estrutura em folha-beta,

estabilizadas por ligações dissulfureto intra-molecular entre os resíduos de cisteína (LEHRER; GANZ, 1999). São produzidas por leucócitos e células epiteliais e demonstram atividade direta contra bactérias, vírus envelopados e fungos (BAGNICKA et al., 2010). Dependendo do tamanho e do emparelhamento de seus resíduos de cisteína, elas podem ser classificadas em alfa, beta e teta-defensinas (ZHAO et al., 1999).

Os peptídeos antimicrobianos têm, em geral, modos de ação semelhantes, sendo baseados na interação com as membranas celulares dos microrganismos. Tal interação pode gerar uma permeabilidade na membrana pela perfuração e formação de canais pelos quais ocorre o vazamento do conteúdo celular. Outro modo de ação se dá pela ruptura total da membrana do microrganismo (BROGDEN, 2005).

A concentração é um fator que exerce grande influência sobre a atividade biológica de defensinas (GANZ, 2004). De acordo com esse autor, concentrações em torno de 25 µg/ml estimulam à síntese de DNA e em concentrações muito elevadas ( $\geq 100$  µg/ml) estes peptídeos provocam o crescimento dos queratinócitos e podem causar a lise de micróbios e algumas células tumorais (WIECHUŁA et al., 2006).

A maioria das defensinas apresentam seis resíduos de cisteína e três ligações dissulfureto que não são imprescindíveis para a atividade antimicrobiana, porém conferem elevada resistência à proteólise bacteriana (NAVA et al., 2009). As três ligações dissulfureto são essenciais para determinar e manter a configuração do núcleo da sua estrutura.

Em geral, alfa e beta-defensinas possuem estrutura tridimensional e atividade antimicrobiana semelhantes (SCHNEIDER et al., 2005), entretanto diferem na localização das pontes dissulfureto, estrutura dos seus precursores e locais de expressão (LEHRER; GANZ, 1999). Filogeneticamente a família da beta-defensina é a mais antiga (PATIL et al., 2004). Estruturalmente, beta-defensinas são pequenas proteínas catiônicas de 3 a 5 kDa em tamanho, com ligações dissulfureto que ocorrem entre as cisteínas 1-5, 2-4 e 3-6. Tais ligações são muito importantes para a manutenção das 3  $\beta$ -folhas, as quais possuem entre 38 e 42 resíduos de aminoácidos (ZHAO; LU, 2014).

Poucos estudos estão disponíveis sobre polimorfismos no gene da defensina em animais de produção e do seu efeito sobre a susceptibilidade a doenças. Em bovinos foram encontrados 10 SNPs na região do intron do gene da  $\beta$ -defensina 4. A transição na posição dos nucleotídeos de C $\rightarrow$ T na posição 2239 afetava diversas características do leite como gordura, proteína e lactose, influenciando ainda no número de células somáticas no leite. Os autores concluíram que este gene poderia ser usado como marcador para seleção precoce de

vacas leiteiras menos susceptíveis à mastite e para produção de leite de boa qualidade (BAGNICKA et al., 2007; 2008).

Ainda em bovinos, Ryniewicz et al. (2003) encontraram 20 diferentes genótipos combinados de defensina (CDGs). Os autores evidenciaram que vários destes genótipos estavam significativamente associados a características indicadoras de desempenho leiteiro em vacas holandesas, além de afetarem a contagem de células somáticas do leite (SCC). Assim, os resultados mostraram a importância dos genes da defensina como marcadores de susceptibilidade à doença e produtividade das vacas.

Em ovinos um estudo avaliou polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 2, sendo encontrados 4 SNPs: um no éxon 1 e três no éxon 2 (MONTELEONE et al., 2009). Souza et al. (2015) identificaram dois SNPs no éxon 2 e um na região terminal 3' no gene da  $\beta$ -defensina 2 em ovinos na Amazônia Brasileira e Siqueira et al. (2016) fizeram a modelagem e avaliaram as dinâmicas de três variantes da  $\beta$ -defensina 2 nos mesmos ovinos e concluíram que uma variante (GG) apresentava maior eficiência.

Em caprinos, Bagnicka et al. (2013) sequenciaram e compararam as sequências de  $\beta$ -defensinas de cabras polonesas, revelando que os íntrons dos genes de  $\beta$ -defensina 1 e 2 apresentam 99,6% de identidade, diferindo apenas em seis posições nucleotídicas. Já em humanos, associações foram relatadas entre polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina e susceptibilidade à diabetes, melanoma, carcinoma escamoso oral e câncer de próstata (SUN et al., 2006).

Assim, os genes da defensina são muito importantes como marcadores genéticos em potencial, podendo ser utilizados em programas de melhoramento com vista a seleção de animais altamente produtivos e resistentes a patologias. Desta forma, torna-se imprescindível a identificação de alterações/polimorfismos nas suas sequências genéticas.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCOBA. **Associação de criadores de caprinos e ovinos da Bahia**, 2002. Disponível em: <www.accoba.com.br> Acesso em: 09 de setembro de 2016.

AMARANTE, A. F. T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004. Pirassununga, **Anais...** Pirassununga-SP: SBMA, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle de verminose ovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília-DF, ano 11, n.34, p.19-30, 2005.

AMARANTE, M. R. V.; WOMACK, J. E. Marcadores moleculares mapeados no cromossomo Y bovino, com emprego do painel de células somáticas híbridas irradiadas (WGRH). In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004. Pirassununga, **Anais...** Pirassununga-SP: SBMA, 2004.

BAGNICKA, E. et al. The polymorphism in the b4-defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, n.3, p.150–156, 2007.

BAGNICKA, E. et al. A/C polymorphism in the  $\beta$ -4 defensin gene and its association with phenotypic and breeding values of milk production traits in Polish-Friesian cows. **Animal Science Papers and Reports**, v.26, n.4, p.239–250, 2008.

BAGNICKA, E. et al. Expression and polymorphism of defensins in farm animals. **Acta Biochimica Polonica**, v.57, n.4, p.487-497, 2010.

BAGNICKA, E. et al. A note on the organization and expression of  $\beta$ -defensin genes in Polish goats. **Journal of Applied Genetics**, v.54, n.1, p.125-127, 2013.

BATISTA, J. F. et al. Endoparasitismo gastrintestinal em cabras da raça Anglonubiana. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.2, p.318-326, 2014.

BENVENUTI, C. L. et al. Desempenho de caprinos mestiços submetidos à infecção natural por nematódeos gastrintestinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 25.; SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 2008. Curitiba, **Programas e Resumos...** Curitiba: UFPR: Universidade Estadual de Londrina, 2008. Resumo P-081.

BENVENUTI, C. L. et al. Marcadores fenotípicos para identificação de caprinos mestiços resistentes e susceptíveis à verminose gastrintestinal – terceiro lote de animais F2. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2010. Mossoró, **Anais...**Mossoró-RN, 2010.

BORGES, I.; GONÇALVES, L. C. **Manual prático de caprino e ovinocultura**. Escola de Veterinária Departamento de Zootecnia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002.

- BRAY, M. S.; BOERWINKLE, E.; DORIS, P. A. High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise. **Human Mutation**, v.17, n.4, p.296-304, 2001.
- BRITO, D. R. B. et al. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do alto Mearim e Grajau, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, p.967-974, 2009.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formation or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.3, p.238–250, 2005.
- BURKE, J. M. et al. Accuracy of the FAMACHA system for on- farm use by sheep and goat producers in the southeastern United States. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1/2, p.89-95, 2007.
- CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectiva para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.spe, p.64-71, 2009.
- CANTELLI, C. R. et al. Eimeriose ovina no município de Major Vieira, Santa Catarina: Relato de caso. **Veterinária em Foco**, v.4, n.2, p.185-190, 2007.
- CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CASTELO BRANCO, J. F. B. **Caracterização fenotípica, sistema de produção, distribuição geográfica e aceitação do caprino Nambi no estado do Piauí**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2011.
- CASTRO, A. **A Cabra**. 3. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984. 372 p.
- CAVELE, A. et al. Estudo comparativo do sistema FAMACHA entre caprinos e ovinos sob o mesmo manejo produtivo no sertão baiano. **Ciência Animal Brasileira**, p.690-694, 2009. Suplemento 1.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Superintendência Regional da Bahia e Sergipe. **Caprinocultura na Bahia**. 2006. 13 p. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/caprinocultura\\_na\\_bahia.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/BA/caprinocultura_na_bahia.pdf)> Acesso em: 8 de setembro de 2016.
- COSTA, C. A. F. et al. Variability of resistance in goats infected with *Haemonchus contortus* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.88, n.1/2, p.153-158, 2000.
- COSTA JÚNIOR, G. S. et al. Efeito de vermifugação estratégica, com princípio ativo à base de ivermectina na incidência de parasitos gastrintestinais no rebanho caprino da UFPI. **Revista de Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.4, p.279-286, 2005.
- COSTA, M. S. **Inventário e caracterização de caprinos do grupo naturalizado Gurguéia e sua relação com os principais grupos genéticos do Semi-árido do Estado do Piauí**.

2010. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2010.

COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N.; CARVALHO, F. F. R. Perspectivas e desafios para a produção de carne caprina no Brasil. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003. Santa Maria, **Anais...**, 2003.

COUTINHO, R. M. A. **Marcadores fenotípicos para caracterização de caprinos com diferentes níveis de resistência às endoparasitoses gastrintestinais**. 2012. 62p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba - RN, 2012.

DENIZ, A. **Baycox® 5% Toltrazuril coccidiocide for lamb**. Germany, 2008. (Technical Manual – Bayer Health Care, Animal Health).

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicado a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 120p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Yearbook of Production**. Rome: Fao, 2015.

FEITOSA, J. V. et al. Estimativa do número de oocistos de *eimeria* em ovinos e caprinos do cariri cearense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.3, n.2, p.7-13, 2009.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. **Comptes Rendus Biologies**, v.327, n.6, p.539–549, 2004.

GIRÃO, E. S. et al. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.197-202, 1992.

GRAY, I. C.; CAMPBELL, D. A. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Human Molecular Genetics**, v.9, n.16, p.2403-2408, 2000.

HASSUM, I. C.; MENEZES, R. C. A. A. Infecção natural por espécies do gênero *Eimeria* em pequenos ruminantes criados em dois municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.14, n.3, p.95-100, 2005.

HUTTNER, K. M. et al. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. **Gene**, v.206, n.1, p.85–91, 1998.

JANEWAY, C. A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.197-216, 2002.

KRUININGEN, H. J. V. Sistema Gastrointestinal. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**, 2ª ed., Editora Artes Médicas Sul Ltda: Porto Alegre, Brasil. Cap.1, p.60-61, 1998.

LAGARES, A. F. B. F. **Parasitoses de pequenos ruminantes na região da Cova da Beira**. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

- LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v.30, n.3, p.131-141, 2009.
- LEHRER, R. I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. **Current Opinion Immunology**, v.11, n.1, p.23–27, 1999.
- LIMA, J. D. Coccidiose dos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suppl. 1, p.9-13, 2004.
- LIRA, M. A. A. et al. Doenças do sistema digestório de caprinos e ovinos no semiárido do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.193-198, 2013.
- LÔBO, R. N. B. et al. Genetic parameters for fecal egg count, packed-cell volume and body-weight in Santa Inês lambs. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.2, p.288-294, 2009.
- LOUREIRO, C. M. B. **Redução de verminose, parâmetros hematológicos e bioquímicos de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração**. 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal - SP, 2007.
- MACHADO, R. et al. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, n.57, 16p. **Circular Técnica**, 2008.
- MAIA, D.; MORAES, F. R.; SOTOMAIOR, C. S. Revisão de literatura – O método Famacha© como tratamento seletivo de pequenos ruminantes. **Veterinária Notícias**, v.19, n.1, p.41-66, 2013.
- MALAN, F. S. et al. Clinical evaluation of anemia in sheep: early trials. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.68, n.3, p.165-174, 2001.
- MASON, I. L. **A world dictionary of livestock breeds, types and varieties**. Wallingford: CAB International, p.348, 1988.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Review Genetics**, v.11, n.1, p.31-46, 2010.
- MOLENTO, M. B. et al. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1139-1145, 2004.
- MONTELEONE, G. et al. Study of  $\beta$ -defensin polymorphisms in Valle del Belice dairy sheep. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, n.2, p.111-113, 2009.
- NAVA, G. M. et al. Molecular diversity of the antimicrobial domain of beta-defensin 3 and homologous peptides. **Comparative and Functional Genomics** (published online), 2009 doi:10.1155/2009/983636.
- NEVES, M. R. M. et al. **Controle do parasitismo em cabras leiteiras criadas a pasto**. Sobral: EMBRAPA, 2008. 6p. (Boletim de pesquisa, 38).

- OLIVEIRA, A. N. **Desempenho e características de carcaça de caprinos mestiços Anglo-Nubiano, Bôer e Caprinos Sem Padrão Racial Definido em pastagem e em confinamento**. 2006. 123p. Tese (Doutorado em Produção Animal). Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2006.
- PAREDES, P. I. G. **Coccidiose em pequenos ruminantes**. 2010. 106p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- PAREEK, C. S.; SMOZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v.52, n.4, p.413–435, 2011.
- PATIL, A. et al. Rapid evolution and diversification of mammalian  $\alpha$ -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. **Physiological Genomics**, v.20, n.1, p.1–11, 2004.
- PEREIRA, G. L. et al. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. **Ars Veterinaria**, v.29, n.3, p.190-199, 2013.
- PIRES, M. I. C. **Guerra dos Bárbaros: Resistência Indígena e conflitos no Nordeste Colonial**. Recife: FADURPE, 146p. 1990.
- POMPONET, A. Diagnósticos antigos, dilemas atuais: perspectivas para a caprinocultura no nordeste semi-árido da Bahia. **Conjuntura e Planejamento**, Salvador, n.159, p.28-35, 2009.
- POP, M.; SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. **Trends in Genetics**, v.24, n.3, p.142-149, 2008.
- RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. Nobel: São Paulo, 1998. 320p.
- ROBERTS, J. R.; CARNEIRO, M. O.; SCHATZ, M. C. The advantages of SMRT sequencing. **Genome Biology**, v.14, n.8, p.1-4, 2013.
- RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos, p.19-162. In: CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. (Eds). **Doenças de Ruminantes e Equinos**, 2ª ed., v.2, Varela: São Paulo. 573p, 2001.
- RUMINANT GENOME BIOLOGY CONSORTIUM. **The International Goat Genome Consortium**. 2010. Disponível em: [http://www.ruminants.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4:the-goat-champion-is-&catid=5&Itemid=2](http://www.ruminants.org/index.php?option=com_content&view=article&id=4:the-goat-champion-is-&catid=5&Itemid=2) Acesso em: 10 de setembro de 2016.
- RYNIEWICZ, Z. et al. Association of the polymorphism at defensin gene loci with dairy production traits and milk somatic cell count in Black-and-White cows. **Animal Science Papers and Reports**, v.21, n.4, p.209–222, 2003.

- SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.25, n.1, p.3-17, 2016.
- SCHNEIDER, J. J. et al. Human defensins. **Journal of Molecular Medicine**, v.83, n.8, p.587–595, 2005.
- SCHWARTZ, S. A.; NAIR, M. P. N. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.3, p.295-305, 1999.
- SILVA, E. M. N. et al. Evaluation of the adaptability of goats exotic and native of the semi-arid of Paraíba. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.3, p.516-521, 2006.
- SILVA, E. R. R. et al. Relação entre a infecção por helmintos gastrintestinais e coccídeos nos valores de hematócrito e ganho de peso de caprinos (*Capra hircus*) da raça Anglo Nubiana em fase de crescimento. **Biotemas**, v.25, n.4, p.175-180, 2012.
- SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, A. M. Desempenho Produtivo em Caprinos Mestiços no Semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1028-1035, 2000.
- SILVA, N. C. S. **Efeitos ambientais que interferem no endoparasitismo em matrizes da raça Anglonubiana em Teresina-Piauí**. 2011. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2011.
- SIQUEIRA, A. S. et al. Homology modeling and molecular dynamics of  $\beta$ -defensin II variants in Amazonian sheep. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.1, 15017469, 2016.
- SISSAY, M. M. et al. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: Exploitation of refugia to restore anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.135, n.3/4, p.337-346, 2006.
- SOMAN, S. S. et al. Discovery of anas platyrhynchos avian beta defensin 2 (Apl\_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions. **Molecular Immunology**, v.46, n.10, p.2029–2038, 2009.
- SOUZA, B. B. et al. Genetic polymorphisms in  $\beta$ -defensin II gene in Amazon sheep from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.4, p.12805-12810, 2015.
- SUN, C. Q. et al. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. **Cancer Research**, v.66, n.17, p.8542–8549, 2006.
- TEIXEIRA, K. R. S.; ARAÚJO, J. L. S. **Genômica e Proteômica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documentos, 213, 2006. 37p.
- TOSSER-KLOPP, G. et al. Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. **PLOSOne**, v.9, n.1, p.1-8, 2014.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Tokyo, Japan. Japan International Cooperation Agency, ed.4, p.149, 1998.

WIECHUŁA, B. E. et al. Antimicrobial peptides. **Wiadomosci Lekarskie**, v.59, n.7-8, p.542–547, 2006.

ZHAO, C. et al. Differential expression of caprine  $\beta$ -defensins in digestive and respiratory tissues. **Infection and Immunity**, v.67, n.11, p.6221–6224, 1999.

ZHAO, L.; LU, W. Defensins in innate immunity. **Current Opinion in Hematology**, v.21, n.1, p.37-42, 2014.

## **4 CAPÍTULO I**

**Polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade  
em caprinos**

## 1 Polimorfismos no gene da $\beta$ -defensina 1 e associações com características de sanidade 2 em caprinos

3  
4 **Resumo:** O objetivo com o estudo foi identificar polimorfismos em parte do íntron 1, todo  
5 éxon 2 e na região terminal 3' do gene *Goat  $\beta$ -Defensin-1* e associa-lós com características  
6 relacionadas a ocorrência de nematodeoses e protozooses em cabras da raça Anglonubiana, de  
7 um rebanho experimental localizado na região Nordeste do Brasil. O gene foi amplificado por  
8 PCR a partir do DNA extraído de amostras de sangue de 187 animais. Os seguimentos do  
9 gene foram sequenciados, alinhados, analisados e determinados os genótipos para cada  
10 polimorfismo encontrado. As análises de associação incluíram no modelo os efeitos fixos de  
11 idade do animal, grau de sangue e genótipo do marcador SNP. Como efeito aleatório,  
12 considerou-se o reprodutor e o erro aleatório associado a cada observação. As médias dos  
13 genótipos de cada SNP foram comparadas pela diferença mínima significativa de Fisher  
14 ( $P \leq 0,05$ ). Foram encontrados doze polimorfismos: dois no íntron 1; sete no éxon 2 e três na  
15 região terminal 3'. Os SNPs do éxon 2 foram responsáveis por mudanças de aminoácidos em  
16 seis códigos genéticos e as mudanças nos códons 25 e 33 afetaram a função proteica. O SNP  
17 1937 no gene da  *$\beta$ -Defensina 1* foi associado significativamente a quantidade de oocistos de  
18 protozoários, enquanto o SNP 2001 foi associado ao grau de anemia Famacha©. Já o  
19 polimorfismo 2046 apresentou associação significativa ao grau Famacha© e a quantidade de  
20 oocistos de protozoários e o SNP 2140 ao Valor máximo de OPG do animal. Deste estudo  
21 fica evidências que o gene da  *$\beta$ -Defensina 1* pode ser usado como marcador para seleção de  
22 caprinos com variação na resistência a doenças causadas por nematódeos e protozoários.

23

24 **Key words:** SNP, Imunogenética, Produção Animal, GBD-1, Gene candidato.

25

## 26 INTRODUÇÃO

27 A caprinocultura é uma atividade de reconhecida importância sócio-econômica para as  
28 regiões mais pobres do Planeta, onde se concentram os maiores rebanhos e geralmente  
29 explorados de forma extensiva (FAO 2015). No Brasil essa importância se destaca na região  
30 Nordeste, onde se concentra mais de 90% do rebanho brasileiro de caprinos (em torno de 8.8

31 milhões de cabeças) e o estado do Piauí é o 3º maior produtor, com um efetivo de 14,5%  
32 desta região.

33 Porém, o modo de criação prevalecente não obedece de forma conveniente os aspectos  
34 sanitários, razão pela qual a atividade é afetada por uma grande variedade de microrganismos  
35 patogênicos como protozoários, bactérias, nematódeos, entre outros. Dentre estas alterações,  
36 as coccidioses e as helmintoses gastrintestinais são as mais comuns na região (Lira *et al.*  
37 2013). Tais doenças causam perdas econômicas relevantes, prejudicando a saúde dos animais  
38 e o retorno econômico do setor (Salgado & Santos 2016).

39 As defensinas são peptídeos antimicrobianos (AMPs) que são produzidos por  
40 leucócitos e células epiteliais. Os AMPs têm um papel importante na resposta imune inata,  
41 atuando contra bactérias, vírus e fungos. Neste grupo, as defensinas apresentam-se como a  
42 família mais numerosa de peptídeos catiônicos (Bagnicka *et al.* 2010). Dependendo do  
43 tamanho e do emparelhamento de seus resíduos de cisteína, elas podem ser classificadas em  
44  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\theta$ -defensinas (Zhao *et al.* 1999).

45 Duas beta-defensinas foram identificadas em caprinos, as *Goat  $\beta$ -Defensin (GBD) -1 e*  
46 *-2*. Os genes de seus precursores: *preproGBD-1* e *preproGBD-2* compartilham 96,8% de  
47 identidade na sequência nucleotídica e 88,2% na sequência de aminoácidos. Há relatos da  
48 expressão de *GBD-1* transcrito na língua, traqueia, brônquios e pulmões. Já a *GBD-2* foi  
49 encontrada no estômago, intestino grosso e reto (Zhao *et al.* 1999).

50 Nos mamíferos, os genes alfa- e beta-defensina possuem dois éxons e um íntron  
51 (Huttner *et al.* 1998). O primeiro éxon codifica a região 5' não traduzida (5'UTR) além do  
52 domínio do pré-pro-peptídeo. O segundo éxon, por sua vez, contém a informação necessária  
53 para codificar o peptídeo maduro (Soman *et al.* 2009). Em caprinos, Bagnicka *et al.* (2013)  
54 sequenciaram e compararam as sequências de  $\beta$ -defensinas de cabras polonesas, revelando

55 que os íntrons dos genes de  *$\beta$ -defensina 1* e *2* apresentam 99,6% de identidade, diferindo  
56 apenas em seis posições nucleotídicas.

57 Na literatura consultada, não foram encontrados estudos com polimorfismos no gene  
58 da defensina e de seu possível efeito sobre a susceptibilidade a doenças causadas por  
59 nematódeos e protozoários em caprinos. Apesar das defensinas agirem principalmente contra  
60 bactérias e microrganismos, nessa pesquisa buscou-se verificar se há atuação também contra  
61 organismos superiores, como os nematódeos.

62 Assim, o objetivo com o estudo foi analisar a sequência de nucleotídeos em parte do  
63 íntron 1, todo éxon 2 e na região terminal 3' do gene *GBD-1* em um rebanho experimental de  
64 caprinos da raça Anglonubiana, a fim de identificar e associar SNPs com características  
65 relacionadas a infecção por nematódeos e protozoários.

66

## 67 **MATERIAL E MÉTODOS**

68 Esta pesquisa foi cadastrada no Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí -  
69 UFPI e realizada com base nas normas aprovadas pela Comissão de Ética e Experimentação  
70 Animal dessa Instituição de Ensino Superior.

71

### 72 **Animais da amostra**

73 Foram escolhidas 187 fêmeas no rebanho Experimental de caprinos da raça  
74 Anglonubiana pertencente a Universidade Federal do Piauí, localizado na cidade de Teresina.  
75 A cidade está na posição geográfica 5° 5'20" de latitude sul e 42° 48'07" de longitude oeste. A  
76 precipitação média anual é de 1.332 mm, a temperatura é em torno de 27,7 °C e a média da  
77 umidade relativa do ar é de 70% (SEMPPLAN 2015).

78 Os animais foram manejados em sistema de criação semi-intensivo, sendo recolhidos a  
79 tarde ao aprisco e liberadas para o pasto na manhã seguinte. O pastejo foi em piquetes de A.

80 *gayannum* consorciado com pastos nativos. Na época seca ocuparam piquetes de *P. maximum*  
81 Jacq e *B. brizantha*, irrigados.

82 Para complementar o manejo alimentar das matrizes visando manutenção da condição  
83 corporal para suportar lactação, nessa fase foram suplementadas com ração comercial  
84 contendo 16% de proteína bruta, oferecida no cocho coletivamente. Foi disponibilizado no  
85 aprisco, água de boa qualidade e sal mineral.

86 O manejo sanitário teve como base o valor de ovos por grama de fezes (OPG), que foi  
87 obtido em média em oito coletas ao ano. A aplicação de vermífugo ocorreu quando 10% das  
88 cabras apresentaram valor superior a 1000, como sugerido por Costa *et al.* (2011). Ocorreu  
89 rotação do princípio ativo do vermífugo no período, utilizando-se Ivermectina a 1%,  
90 Levamisole e Oxfendazole.

91

## 92 **Fenótipos utilizados**

93 Para identificar as associações entre os polimorfismos e a ocorrência de doenças foram  
94 utilizadas informações de características de sanidade disponíveis no banco de dados do  
95 rebanho experimental. O banco de dados é formado por um histórico completo dos animais,  
96 desde o nascimento até o descarte, com informações sanitárias, reprodutivas e produtivas dos  
97 animais.

98 As características utilizadas para identificar o perfil de sensibilidade dos animais a  
99 nematoides gastrintestinais e protozoários foram: Peso, Ovos Por Grama de Fezes (OPG;  
100 transformado para log na base 10; OPG +10), Escore da condição corporal, Anemia indicado  
101 pelo Famacha©, Valor máximo de OPG do animal, Percentual de contagem de OPG com  
102 valor zero e Presença de oocistos de protozoários nas fezes (OOPG).

103 A coleta de fezes ocorreu em média a cada 40 dias, sempre antes da utilização de anti-  
104 helmíntico no animal, com a retirada das fezes diretamente da ampola retal, acondicionada em

105 saco plástico individual para análise de OPG no Laboratório de Sanidade Animal -  
106 CCA/UFPI, adotando-se os procedimentos de acordo com Ueno & Gonçalves (1998).

107 Também foi registrada a variação do peso corporal (kg) e avaliado o escore da  
108 condição corporal, com atribuição de notas de 1 a 5 (sendo 1 animal muito magro e 5 obeso)  
109 por três avaliadores distintos e considerado a média (Machado *et al.* 2008). O grau de anemia  
110 pelo método Famacha<sup>®</sup> foi avaliado com a atribuição de nota de 1 a 5 à tonalidade da  
111 conjuntiva dos animais por três avaliadores, correspondendo do vermelho-rosado ao branco  
112 pálido, respectivamente, utilizando cartão guia desenvolvido para utilização a campo  
113 (Molento *et al.* 2004).

114 O fenótipo OOPG foi mensurado nas mesmas datas do OPG, atribuindo-se notas 1  
115 (ausência), 2 (valor moderado) e 3 (valor alto) à quantidade de oocistos, pela visualização em  
116 microscópio de lâminas preparadas com amostras de fezes usadas para análise do OPG.

117

### 118 **Procedimentos Laboratoriais**

119 Para a extração de DNA foram coletados 3 ml de sangue da veia jugular de cada  
120 animal utilizando-se tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram  
121 mantidas sob refrigeração até os procedimentos laboratoriais.

122 O sangue foi então centrifugado a 3.500 g por 10 min para extrair os leucócitos. Em  
123 seguida, o DNA foi extraído com o kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia,  
124 CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em  
125 gel de agarose a 1,5%, corado com Gelred (Biotium, Hayward, Califórnia, USA) e  
126 quantificada no espectrofotômetro Nanodrop (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

127 As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com o objetivo de isolar e  
128 amplificar um fragmento de 402 pb de comprimento, compreendendo parte do íntron 1, todo o  
129 éxon 2 e parte da região terminal 3' do gene  *$\beta$ -defensina 1 (GBD-1)*. Para tanto, foi desenhado

130 um par de *primers* com base na sequência GU480078.1 do GENE BANK utilizando-se o  
131 programa Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

132 Os *primers* utilizados para a PCR foram *FORWARD* 5'-  
133 GGACTCGCATCTTGTGTCA-3' e *REVERSE* 5'-ACAACCTAATGACCGTGG-3'.

134 As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL no  
135 termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), contendo tampão  
136 10X buffer; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,2 mM de cada dNTP; 5 nM de cada primer; 1,5 U de Taq  
137 DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 50-200 ng de DNA genômico.

138 As condições de temperatura foram: temperatura inicial de desnaturação a 95°C por 5  
139 minutos (min), seguido de 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1 min,  
140 hibridização a 59°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Finalizando com temperatura de  
141 extensão final a 72°C por 10 min.

142 Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5% (w/v)  
143 contendo GelRed (Biotium, Hayward, California, USA), depois foram purificados com a  
144 enzima Illustra ExoProStar 1, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante (GE  
145 Healthcare, London, UK). Os produtos purificados foram sequenciados utilizando um kit Big  
146 Dye (Life Technology, Carlsbad, CA, USA) em sequenciador de DNA automático ABI  
147 3500XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

148

#### 149 **Análises das sequências e estatísticas**

150 As sequências foram editadas e alinhadas com o programa Bioedit (Hall 1999),  
151 utilizando como referência a sequência GU480078.1, disponível no GENE BANK. Todos os  
152 SNPs detectados foram avaliados quanto às mudanças na sequência de aminoácidos em  
153 relação à sequência selvagem (protein id=ADD17356.1). Assim, todas as mutações não  
154 sinonímicas foram testadas para prever os efeitos sobre a função de proteínas devido à

155 substituição de aminoácidos através do SCORE. Utilizou-se para isso o software de  
156 classificação Sorting Intolerance From Tolerance (SIFT), considerando que pontuações  
157 menores ou iguais a 0,05 representam alterações que afetam a função proteica e pontuações  
158 maiores do que 0,05 causam mudanças toleradas (Ng & Henikoff 2003).

159 O programa GENEPOP versão 4.2 (Raymond & Rousset 1995) foi usado para  
160 determinar as frequências alélicas e genotípicas, também a heterozigosidade observada e a  
161 esperada, bem como a probabilidade dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na  
162 presença de associação aleatória de genótipos, utilizando-se o método da cadeia de Markov e  
163 o coeficiente de endogamia (FIS) no rebanho examinado. Também foram determinadas as  
164 probabilidades para o desequilíbrio de ligação entre os SNPs.

165 As análises de associação foram realizadas utilizando modelos mistos por meio do  
166 procedimento PROC MIXED do programa SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., NC, USA) e  
167 usando o método da máxima verossimilhança restrita. Foram incluídos no modelo estatístico  
168 os efeitos fixos de idade do animal, grau de sangue e o genótipo do SNP. Como efeito  
169 aleatório, considerou-se o pai de cada fêmea e o erro aleatório associado a cada observação.  
170 Quando significativas, as médias estimadas entre genótipos foram comparadas usando a  
171 diferença mínima significativa de Fisher (opção DIFF do comando LSMEANS). A  
172 significância foi declarada a  $P \leq 0,05$ .

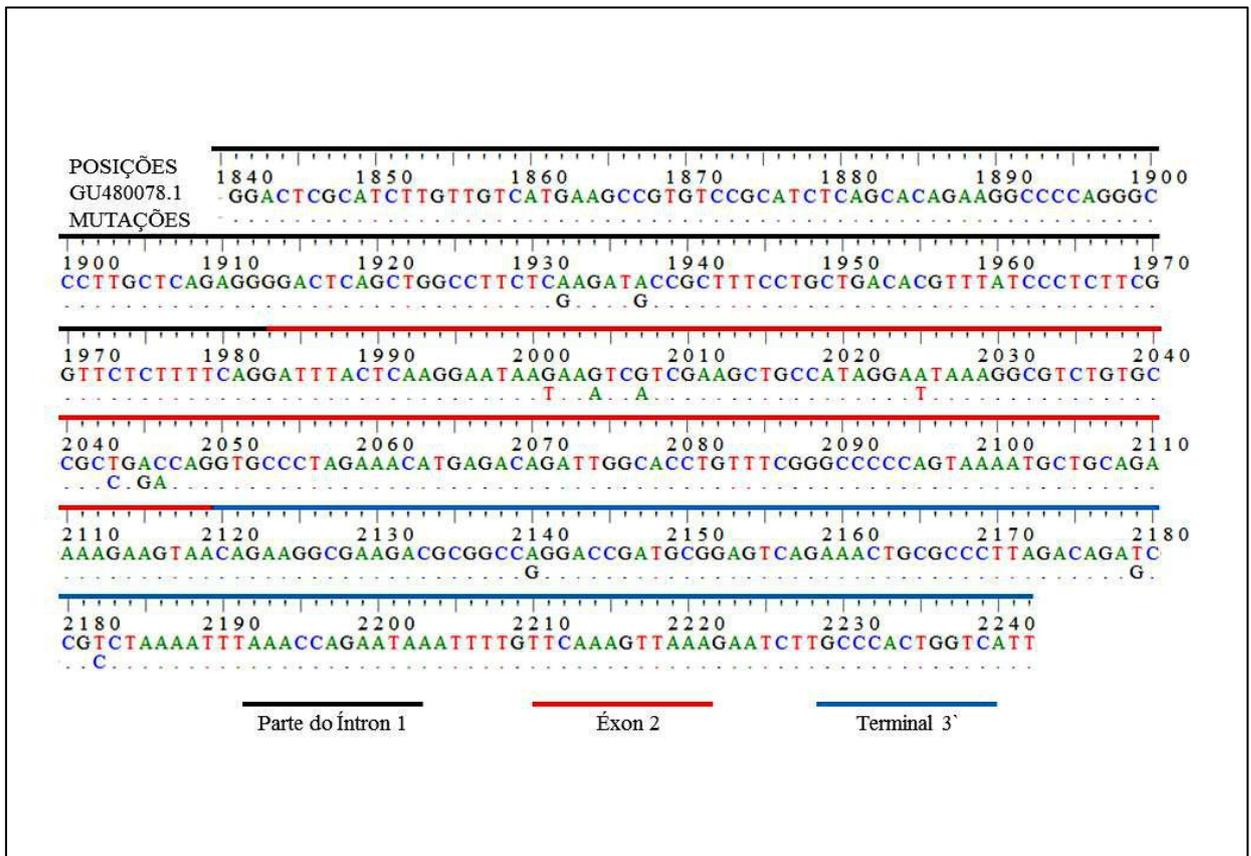
173

## 174 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

175 Dos 402 pb do gene *GBD-1* isolado, amplificado e sequenciado nos caprinos da raça  
176 Anglonubiana, foram encontrados 12 SNPs, sendo 67% do tipo transição. Este resultado  
177 concorda com Caetano (2009), quanto as transversões serem menos frequentes que as  
178 transições. Os polimorfismos foram localizados principalmente na região do éxon 2, com sete

179 SNPs. Os demais polimorfismos ocorreram no íntron 1 (dois SNPs) e na região terminal 3'  
 180 (três SNPs) (Figura 1).

181



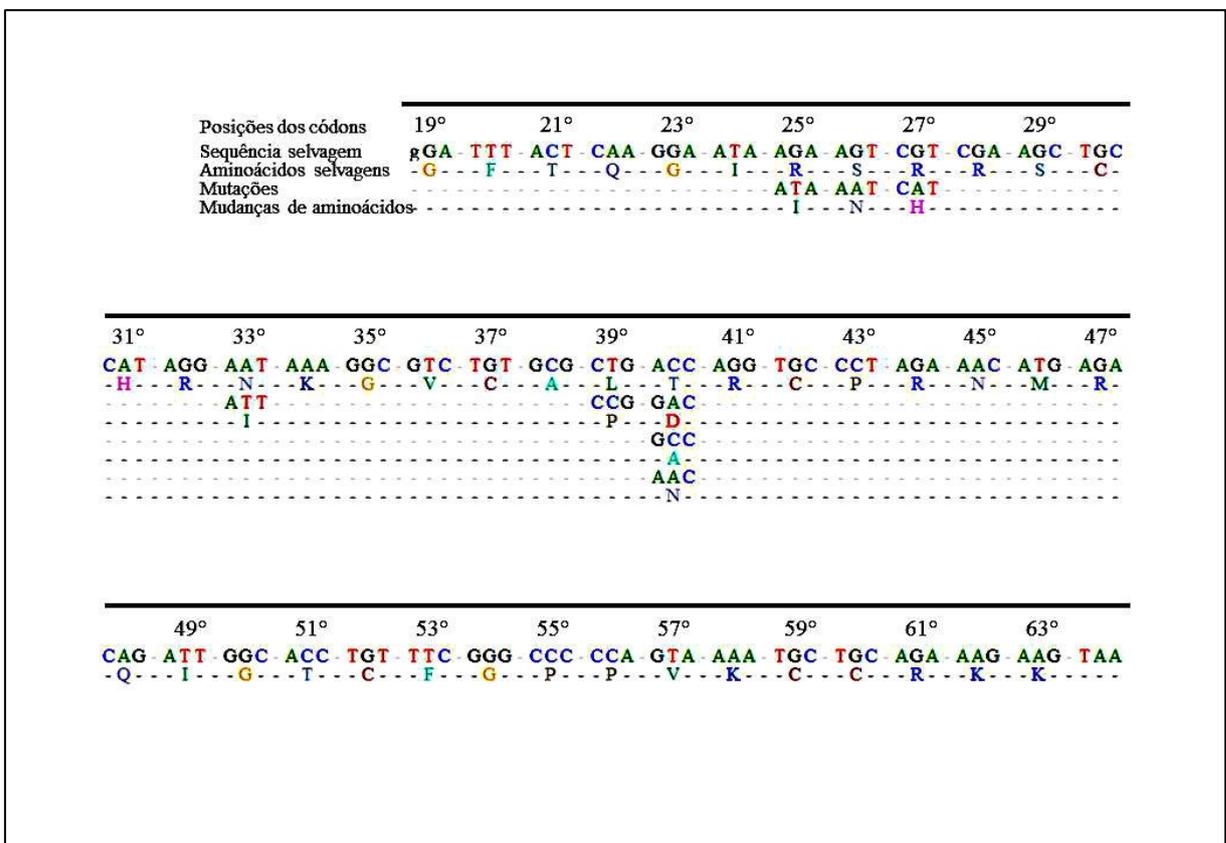
182

183 Figura 1. Sequência de 402 pb amplificada e sequenciada do *GBD-1* com indicação das  
 184 posições das bases na referência GU480078.1 e as respectivas mutações observadas em um  
 185 rebanho experimental de caprinos da raça Anglonubiana.

186

187 Em caprinos não foram encontrados estudos avaliando polimorfismos no gene *GBD-1*.  
 188 Já em ovinos, espécie mais próxima, Monteleone *et al.* (2009) descreveram 2 SNPs no gene  
 189 da *β-defensina 1*: na posição 1747 do éxon 2 e na posição 1757 da região terminal 3'. As  
 190 transições foram do tipo A→G e T→C, respectivamente. Souza *et al.* (2015), por sua vez,  
 191 relataram três SNPs em ovinos da raça Santa Inês criados na Amazônia Brasileira, sendo dois  
 192 no éxon 2 e um na região terminal 3', com transições do tipo A↔G. A variante do gene,  
 193 entretanto, era a *β-defensina 2*.

194 Os SNPs localizados no éxon 2 foram responsáveis por mudanças de aminoácidos em  
 195 6 códigos genéticos, porém, o 40° códon pode ser encontrado sob duas formas variadas e,  
 196 portanto, essa variação possibilita a adição de 4 aminoácidos diferentes (Treonina, Ácido  
 197 Aspártico, Alanina e Asparagina) (Figura 2). O códon selvagem (ACC) codifica o aminoácido  
 198 Treonina, enquanto suas variadas formas codificam os aminoácidos Aspartato, Alanina e  
 199 Asparagina.  
 200



201

202 Figura 2. Sequência do éxon 2 do gene *GBD-1* e a representação dos códons e seus  
 203 respectivos aminoácidos. Estão em destaque os SNPs que resultaram em mutações não  
 204 sinônimas e seus aminoácidos.

205

206 Souza *et al.* (2015) também verificaram que os SNPs do éxon 2 da  $\beta$ -defensina 2 de  
 207 ovinos causavam alterações de aminoácidos em duas posições: 1643 e 1659 (Isoleucina para  
 208 Valina e Arginina para Lisina, respectivamente). Da mesma forma, Monteleone *et al.* (2011)

209 observaram que alguns dos polimorfismos encontrados na *β-defensina 2* de ovelhas  
210 resultaram em substituições de aminoácidos.

211 Ao se avaliar os códigos genéticos para descobrir se as mudanças de aminoácidos  
212 foram suficientes para afetar a função proteica, constatou-se que dos 6 códigos genéticos  
213 envolvidos na mudança de aminoácidos, somente as mudanças nos códons 25 e 33  
214 apresentaram scores abaixo de 0,05, ou seja, as mudanças de aminoácidos afetam a função  
215 proteica (Tabela 1).

216 No códon 25 houve mudança de arginina para isoleucina. A arginina é um aminoácido  
217 hidrofílico básico e possui a cadeia lateral com um grupo guanidino (-NH<sub>2</sub>), carregado  
218 positivamente. A isoleucina, por sua vez, é um aminoácido hidrofóbico. Já no códon 33, a  
219 mudança foi de asparagina (aminoácido hidrofílico neutro) para isoleucina (aminoácido  
220 hidrofóbico). Segundo Nelson & Cox (2002), como consequência da diferença estrutural entre  
221 os aminoácidos, é comum as trocas causarem mudanças importantes na conformação e/ou  
222 função das proteínas.

223 Os demais códons com mudanças apresentaram scores superiores a 0,05 e são  
224 considerados toleráveis, de acordo com o software SIFT. Além disso, os resultados da Tabela  
225 1 indicam que foram encontradas medianas sequências proteicas bastante conservadas e,  
226 existem entre 19 a 23 sequências representadas para os diferentes códons que podem alterar  
227 os aminoácidos.

228

229

230

231

232

233

234 Tabela 1. Análise de predição do efeito das mudanças de aminoácidos na função da proteína  
 235 *GBD-1* em caprinos da raça Anglonubiana.

Posições dos aa	25°	26°	27°	33°	39°	40°	40°	40°
(Mudanças de aa)	R→I	S→N	R→H	N→I	L→P	T→D	T→A	T→N
Scores	0,04	1,00	0,55	0,00	0,18	0,22	0,42	0,36
Predição	Aff	Tol	Tol	Aff	Tol	Tol	Tol	Tol
Conservação de sequências medianas	3,79	3,79	3,79	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63
Sequências representadas para esta posição	19	19	19	23	23	23	23	23

aa= aminoácido; Aff= afeta a função proteica; Tol= mudança tolerada. Mudança de aminoácidos: R→I: Arginina para Isoleucina; S→N: Serina para Asparagina; R→H: Arginina para Histidina; N→I: Asparagina para Isoleucina; L→P: Leucina para Prolina; T→D: Treonina para Ácido Aspártico; T→A: Treonina para Alanina e T→N: Treonina para Asparagina.

236 Na Tabela 2 estão representados os tipos de mutações em cada SNP. Os alelos  
 237 considerados selvagens são os contidos na sequência de referência GU480078.1 do  
 238 GENE BANK. As frequências alélicas dos alelos selvagens foram em sua maioria inferiores a  
 239 0,5, sendo menos frequentes que os alelos mutantes.

240 Os genótipos homozigotos foram bem mais frequentes que os heterozigotos, ou seja,  
 241 os alelos mais frequentes prevaleceram na forma de seus homozigotos, com exceção do SNP  
 242 da posição 2043 onde os heterozigotos foram mais frequentes. A heterozigosidade observada  
 243 ( $H_o$ ) variou de 0,068 a 0,424 e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,379 a 0,500  
 244 (Tabela 2).

245

246

247

248

249 Tabela 2. Resultados das análises alélicas, genótípicas, heterozigosidades, consanguinidade e  
 250 desvios de Hardy-Weinberg.

Posição (região)	Mutação	Alelos (frequência)	Genótipos (frequência)	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>is</sub>	PHW
1932 (íntron1)	A→G	A(0,466) G(0,534)	AA(0,305)	0,322	0,498	0,360	0,009
			AG(0,322)				
			GG(0,373)				
1937 (íntron1)	A→G	A(0,492) G(0,508)	AA(0,458)	0,068	0,500	0,867	0,000
			AG(0,068)				
			GG(0,475)				
2001 (éxon 2)	G→T	G(0,526) T(0,474)	GG(0,466)	0,121	0,499	0,762	0,000
			GT(0,121)				
			TT(0,414)				
2004 (éxon 2)	G→A	G(0,371) A(0,629)	GG(0,310)	0,121	0,467	0,745	0,000
			GA(0,121)				
			AA(0,569)				
2007 (éxon 2)	G→A	G(0,465) A(0,535)	GG(0,379)	0,172	0,498	0,659	0,000
			GA(0,172)				
			AA(0,448)				
2025 (éxon 2)	A→T	A(0,627) T(0,373)	AA(0,542)	0,169	0,468	0,643	0,000
			AT(0,169)				
			TT(0,288)				
2043 (éxon 2)	T→C	T(0,449) C(0,551)	TT(0,237)	0,424	0,495	0,152	0,297
			TC(0,424)				
			CC(0,339)				
2045 (éxon 2)	A→G	A(0,585) G(0,415)	AA(0,441)	0,288	0,486	0,414	0,003
			AG(0,288)				
			GG(0,271)				
2046 (éxon 2)	C→A	C(0,449) A(0,551)	CC(0,407)	0,085	0,495	0,831	0,000
			CA(0,085)				

			AA(0,508)					
2140	A→G	A(0,305)	AA(0,136)	0,339	0,424	0,209	0,003	
(3'UTR)		G(0,695)	AG(0,339)					GG(0,525)
2179	T→G	T(0,729)	TT(0,644)	0,169	0,395	0,577	0,000	
(3'UTR)		G(0,271)	TG(0,169)					GG(0,186)
2182	T→C	T(0,746)	TT(0,678)	0,136	0,379	0,647	0,000	
(3'UTR)		C(0,254)	TC(0,136)					CC(0,186)
Todos				0,201	0,467	0,572	0,000	

251 Ho=heterozigidade observada; He=heterozigidade esperada; Fis=consanguinidade; PHW=probabilidades  
 252 dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

253

254 A média de Ho em torno de 0,20, foi similar ao constatado por Souza *et al.* (2015)  
 255 (média de 0,22) e pode ter influência do fato do rebanho avaliado ter a sua formação e manejo  
 256 reprodutivo baseados no uso de cruzamento absorvente, ou seja, as fêmeas incorporadas  
 257 foram acasaladas com reprodutor Anglonubiano puro adquirido de outro rebanho.

258 Em relação ao  $F_{is}$ , os valores variaram positivamente entre 0,152 e 0,867,  
 259 demonstrando a presença de consanguinidade no rebanho (Tabela 2), que pode ser visto como  
 260 indicativo de risco de consanguinidade se forem acasalados machos e fêmeas produzidos no  
 261 rebanho, concordando com afirmação apresentada por Moura (2017). Como os reprodutores  
 262 são adquiridos de outros rebanhos e utilizados com monta controlada, o  $F_{is}$  pode está  
 263 indicando contribuição de meias irmãs paterna na composição do rebanho.

264 A probabilidade dos desvios de Hardy-Weinberg foi significativa para a maioria dos  
 265 SNPs ( $P<0,05$ ), com exceção do SNP 2043 no éxon 2 (Tabela 2). Os desvios significativos  
 266 em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P<0,05$ ) podem ocorrer em razão da seleção nos  
 267 animais, concordado com afirmações de Turner *et al.* (2011), mas também pode indicar

268 presença de animais parentes; estratificação na população, por se utilizar cruzamento na  
 269 formação do rebanho; além de associação do fenótipo-genótipo (Balding 2006).

270 Das 66 possibilidades de pareamento entre os SNPs encontrados, somente 11  
 271 pareamentos (16,6%) apresentaram desequilíbrio de ligação (DL). O SNP na posição 2001  
 272 apresentou o maior número de combinações em DL, sendo quatro (com as posições 2004;  
 273 2007; 2045 e 2046), seguido dos SNPs 2004 (com 2001; 2007 e 2179) e 2045 com três  
 274 combinações em DL (2001; 2043 e com a posição 2140). Outros SNPs em desequilíbrio de  
 275 ligação foram os das posições 1937 com 2043 e da posição 2025 com 2179 (Tabela 3).

276

277 Tabela 3. Probabilidades do desequilíbrio de ligação entre pares de SNPs encontrados no gene  
 278 *GBD-1* em cabras da raça Anglonubiana.

Posições	1932	1937	2001	2004	2007	2025	2043	2045	2046	2140	2179
1937	0,89										
2001	0,19	0,31									
2004	0,43	0,79	<b>0,00</b>								
2007	0,74	0,27	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>							
2025	0,90	0,13	0,10	0,11	0,36						
2043	0,24	<b>0,02</b>	0,64	0,96	0,74	0,21					
2045	0,25	0,65	<b>0,03</b>	0,78	0,33	0,49	<b>0,01</b>				
2046	0,20	0,20	<b>0,01</b>	0,38	0,13	<b>0,00</b>	0,15	0,13			
2140	0,69	0,75	0,92	0,70	0,66	0,52	0,64	<b>0,00</b>	0,20		
2179	0,44	0,07	0,32	<b>0,05</b>	0,63	<b>0,03</b>	0,58	0,21	0,19	0,69	
2182	0,44	0,56	0,32	0,83	0,88	0,17	0,21	0,18	0,38	0,77	0,40

As probabilidades em negrito representam os pares de SNPs em desequilíbrio de ligação.

279

280 O DL é a associação não aleatória entre alelos de diferentes locos em uma população e  
 281 indica a probabilidade significativa que dois alelos, em particular, tendem a segregar  
 282 conjuntamente (Flint-Garcia *et al.* 2003), portanto, a ocorrência de DL reflete o potencial da

283 identificação de SNP como marcador molecular, principalmente se na população ocorre  
284 mudança na função proteica, como verificado no presente estudo.

285 Apresenta-se na Tabela 4 apenas os resultados dos SNPs nos quais constatou-se efeito  
286 significativo do genótipo sobre pelo menos um dos fenótipos estudados.

287

288 Tabela 4. Médias de características relacionadas a sanidade em caprino da raça Anglonubiana  
289 e probabilidade de significância dos genótipos de quatro SNPs localizados em diferentes  
290 posições no gene da Defensina.

Posição dos SNPs	Genótipos	Famacha <sup>©</sup>	P	OOPG	P	OPG Máx*	P
1937	AA	3.17		1.18 <sup>a</sup>		3661	
	AG	2.47	0.282	1.76 <sup>a</sup>	<b>0.042</b>	2432	0.822
	GG	3.23		0.59 <sup>b</sup>		3302	
2001	GG	3.54 <sup>a</sup>		0.77		4222	
	GT	2.60 <sup>b</sup>	<b>0.035</b>	1.01	0.692	3681	0.428
	TT	3.07 <sup>ab</sup>		1.05		2764	
2046	AA	3.11 <sup>b</sup>		0.78 <sup>b</sup>		3123	
	AC	2.23 <sup>c</sup>	<b>0.003</b>	2.04 <sup>a</sup>	<b>0.029</b>	4229	0.825
	CC	3.53 <sup>a</sup>		0.77 <sup>b</sup>		3305	
2140	AA	3.28		0.98		4392 <sup>a</sup>	
	AG	3.18	0.807	0.83	0.815	4977 <sup>a</sup>	<b>0.013</b>
	GG	3.08		1.06		920 <sup>b</sup>	

291 \*OPG Máx: Valor máximo de OPG. P é a probabilidade. Em negrito são as probabilidades significativas  
292 (P<0,05) das associações entre polimorfismos e características de sanidade. <sup>a,b</sup> Para um mesmo SNP, médias com  
293 mesma letra sobrescrita na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Fisher ao nível de significância de  
294 5%.

295

296 Na posição 1937 verificou-se diferença significativa dos genótipos na variação do  
297 OOPG. Os animais com genótipo GG apresentaram menor contagem de oocistos (0,59),  
298 sendo estatisticamente diferente dos demais genótipos (P<0,05). Assim, o polimorfismo dessa  
299 posição no gene da defensina, que se encontra em DL com SNP da posição 2043, está em

300 animais com melhor resposta imune a incidência de protozoários, conseqüentemente, pode ser  
301 visto como um SNP que tem potencial para ser marcador de resistência a esses  
302 microrganismos.

303 Já no SNP 2001, tem-se um marcador de susceptibilidade a infecção pelo parasita  
304 *Haemonchus contortus*, pois o maior grau de anemia Famacha© foi verificado no genótipo  
305 GG (3.54), sendo o seu valor superior ao heterozigoto (2.6) ( $P<0,05$ ). No período avaliado, o  
306 parasita *H. contortus* foi o mais prevalente no rebanho experimental da raça Anglonubiana  
307 (Batista *et al.* 2014).

308 Na posição 2046 ocorreu efeito significativo dos genótipos sobre o grau de anemia  
309 Famacha© e sobre o OOPG. Em relação ao Famacha©, os três genótipos diferiram entre si e  
310 o homozigoto AA apresentou o maior escore para anemia (3.11). Já no fenótipo OOPG, o  
311 genótipo heterozigoto AC diferiu significativamente dos homozigotos, apresentando a maior  
312 média para a quantidade de oocistos de protozoários presentes nas fezes (2.04) ( $P<0,05$ ).  
313 Deste modo, a transversão na posição 2046 de C → A pode ser utilizada como marcador para  
314 seleção de animais susceptíveis a protozoários.

315 Além disso, seria uma vantagem o fato de estar em desequilíbrio de ligação com o  
316 SNP da posição 2001, pois ambos apresentaram o genótipo heterozigoto com valores  
317 inferiores ao dos homozigotos no grau de anemia dos animais. Por sua vez, o SNP da posição  
318 2001 no gene da defensina pode segregar com mais três outros SNPs, com os quais se  
319 encontra em desequilíbrio de ligação.

320 Para a posição 2140, verificou-se significância estatística do genótipo sobre o fenótipo  
321 “Valor Máximo de OPG” (OPG Máx). Os animais com genótipo homozigotos AA  
322 apresentaram valor igual a 4.392 e o heterozigoto AG igual a 4.977, diferindo  
323 significativamente do homozigoto GG (920) ( $P<0,05$ ).

324 Em relação a função proteica, dos quatro SNPs (1937, 2001, 2046 e 2140)  
325 relacionados significativamente as três características de sanidade em caprinos (Tabela 4),  
326 dois estão localizados no éxon 2 (2001 R → I e 2046 T → N) (Figura 2). Dentre estes, apenas  
327 o SNP da posição 2001 estava afetando a função proteica (alteração do códon 25) (Tabela 1).  
328 O SNP 2046, correspondente ao 40° codon (ACC → AAC) resultou em mutação não-  
329 sinonímia de aminoácidos (treonina pra ácido aspártico) (Tabela 1). Embora a função proteica  
330 não tenha sido alterada, este SNP foi o único a afetar duas características de sanidade  
331 (Famacha© e OOPG).

332 Já os SNPs 1937 e 2140, localizados no íntron 1 e na região terminal 3',  
333 respectivamente, não provocaram mudanças de aminoácidos (mutações sinonímias). As  
334 mutações sinonímias dificilmente podem ser associadas com características fenotípicas.  
335 Assim, os resultados dessa pesquisa diferem do que foi verificado nos estudos de Luridiana *et*  
336 *al.* (2012) e de Zetouni *et al.* (2014), que não encontraram associações significativas entre as  
337 mutações sinonímias e os fenótipos.

338 Como não alteram a função proteica, uma provável justificativa seria que essas  
339 mutações possam se relacionar com a regulação da expressão gênica. SNPs localizados em  
340 determinadas regiões do gene podem modificar a expressão gênica, alterando a quantidade de  
341 proteínas envolvidas nas respostas a determinadas doenças. Entretanto, se os SNPs do  
342 presente estudo têm efeito direto sobre a expressão gênica não é possível ser confirmado com  
343 a metodologia utilizada.

344 Entre os polimorfismos significativamente associados com os fenótipos, o da posição  
345 2001 foi o que apresentou o maior número de combinações em desequilíbrio de ligação (DL)  
346 (Tabela 3). Uma de suas combinações foi com o SNP 2046, o qual estava associado a duas  
347 características de sanidade. O SNP 2140 também estava em DL com o 2045. Estes resultados  
348 indicam que tais SNPs segregam juntos, ou seja, são mais frequentemente herdados juntos.

349 Assim, o desequilíbrio de ligação pode ser uma justificativa pertinente para explicar a  
350 ocorrência das associações significativas verificadas. Camargo *et al.* (2014) escolheram SNPs  
351 com fortes combinações em DL para realizar análises de associação entre os polimorfismos  
352 encontrados no gene *JY-1* e características reprodutivas em bovinos. De fato, os autores  
353 verificaram que alguns dos SNPs que estavam em desequilíbrio de ligação, apresentaram  
354 associação estatisticamente significativa com características reprodutivas.

355 A atuação das defensas contra bactérias tem sido constatada, como demonstrado nos  
356 estudos de Bagnicka *et al.* (2007; 2008) e Tolone *et al.* (2016). Neste último, os autores  
357 verificaram que o polimorfismo na posição 1747 do gene da  $\beta$ -defensina 1 estava associado  
358 com susceptibilidade à mastite em ovelhas italianas, o que levou os autores a sugerir  
359 preliminarmente a utilização do gene como marcador molecular para a melhoria das  
360 características de resistência a mastite. Entretanto, o presente estudo traz o diferencial de  
361 demonstrar que defensas também podem atuar contra endoparasitas pluricelulares. Não se  
362 sabe ao certo como se dá essa ação. O mecanismo pelo qual tais polimorfismos exercem estes  
363 efeitos precisa ser investigado.

364 Em relação a resposta dos animais a incidência de verminoses, as características OPG  
365 e Percentual de contagem de OPG com valor zero, consideradas para indicar o nível de  
366 infecção e para avaliar a resposta dos animais ao tratamento anti-helmíntico, respectivamente,  
367 não foram significativamente associadas aos SNPs. Apenas o Valor máximo de OPG do  
368 animal (OPG Máx) foi associado significativamente ao SNP da posição 2140.

369 Entretanto, tal resultado pode ser consequência da disparidade entre os valores, que  
370 variaram entre 920 e 4977 (Tabela 4). Segundo Bressani *et al.* (2014), são raros os estudos  
371 associando resistência a verminose com SNPs. Os autores constataram em sua pesquisa,  
372 dentre os dez SNPs encontrados em citocinas (IL2, IL4, IL13 e IFNG) que apenas três deles  
373 podem estar associados com a resistência à verminose gastrointestinal e concordaram com

374 Regitano & Coutinho (2001), que a seleção de animais resistentes à patógenos baseada em  
375 marcadores moleculares é uma alternativa promissora, similarmente ao que decorre nessa  
376 pesquisa.

377 Assim, com os resultados deste estudo pode-se supor que os polimorfismos no gene  
378 *GBD-1* podem ser utilizados como marcadores para identificação de caprinos da raça  
379 Anglonubiana que apresentam maior sensibilidade a endoparasitas e a protozoários que  
380 acometem caprinos na região Nordeste do Brasil. Portanto, os resultados são importantes e  
381 podem estimular novos avanços e novas pesquisas com os genes da defensina, além de  
382 evidenciarem a influência do gene sobre a saúde do animal.

383

#### 384 **AGRADECIMENTOS**

385 Agradecemos muito a Universidade Federal Rural da Amazônia, em nome do Prof.  
386 Dr. Ednaldo da Silva Filho, por auxiliar em partes importantes do trabalho; ao Laboratório de  
387 Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Piauí pelo  
388 material utilizado para extração de DNA; a Embrapa Amazônia Oriental por disponibilizar  
389 laboratório para as análises moleculares; ao Instituto de Pesquisa Evandro Chagas por auxiliar  
390 no sequenciamento de DNA e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

391

#### 392 **REFERÊNCIAS**

- 393 1. Bagnicka E., Strzałkowska N., Flisikowski K., Szreder T. *et al.* (2007) The  
394 polymorphism in the b4-defensin gene and its association with production and somatic  
395 cell count in Holstein-Friesian cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **124**,  
396 150–156.
- 397 2. Bagnicka E., Strzałkowska N., Szreder T., Prusak B. *et al.* (2008) A/C polymorphism  
398 in the  $\beta$ -4 defensin gene and its association with phenotypic and breeding values of  
399 milk production traits in Polish-Friesian cows. *Animal Science Papers and Reports* **26**,  
400 239–250.

- 401 3. Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwiak A., Krzyzewski J. *et al.* (2010) Expression and  
402 polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Biochimica Polonica* **57**, 487-497.
- 403 4. Bagnicka E., Prusak B., Kościuczuk E., Jarczak J. *et al.* (2013) A note on the  
404 organization and expression of  $\beta$ -defensin genes in Polish goats. *Journal of Applied*  
405 *Genetics* **54**, 125-127.
- 406 5. Balding D.J. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies.  
407 *Nature Reviews Genetics* **7**, 781-791.
- 408 6. Batista J.F., Campelo J.E.G., Morais M.F., Silva P.O. *et al.* (2014) Endoparasitismo  
409 gastrointestinal em cabras da raça Anglonubiana. *Revista Brasileira de Saúde e*  
410 *Produção Animal* **15**, 318-326.
- 411 7. Bressani F.A., Tizioto P.C., Giglioti R., Meirelles S.L. *et al.* (2014) Single nucleotide  
412 polymorphisms in candidate genes associated with gastrointestinal nematode infection  
413 in goats. *Genetics and Molecular Research* **13**, 8530-8536.
- 414 8. Caetano A.R. (2009) Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no  
415 melhoramento animal e perspectiva para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**,  
416 64-71.
- 417 9. Camargo G.M.F., Costa R.B., Albuquerque L.G., Regitano L.C.A. *et al.* (2014)  
418 Association between JY-1 gene polymorphisms and reproductive traits in beef cattle.  
419 *Gene* **533**, 477-480.
- 420 10. Costa V.M.M., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. (2011) Controle das parasitoses  
421 gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil.  
422 *Pesquisa Veterinária Brasileira* **31**, 65-71.
- 423 11. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015) Yearbook of  
424 Production. Rome: Fao, 2015.
- 425 12. Flint-Garcia S.A., Thornsberry J.M. & Buckler E.S. (2003) Structure of linkage  
426 disequilibrium in plants. *Annual Review Plant of Biology* **54**, 357-374.
- 427 13. Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and  
428 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- 429 14. Huttner K.M., Lambeth M.R., Burkin H.R., Burkin D.J. *et al.* (1998) Localization and  
430 genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene* **206**, 85–91.
- 431 15. Lira M.A.A., Simões S.V.D., Riet-Correa F., Pessoa C.M.R. *et al.* (2013) Doenças do  
432 sistema digestório de caprinos e ovinos no semiárido do Brasil. *Pesquisa Veterinária*  
433 *Brasileira* **33**, 193-198.

- 434 16. Luridiana S., Mura M.C., Pazzola M., Paludo M. *et al.* (2012) Association between  
435 melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene polymorphism and the reproductive  
436 performance of Mediterranean Italian buffaloes. *Reproduction Fertility and*  
437 *Development* **24**, 983- 987.
- 438 17. Machado R., Corrêa R.F., Barbosa R.T. & Bergamaschi M.A.C.M. (2008) Escore da  
439 condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. Embrapa  
440 Pecuária Sudeste. *Circular Técnica* **57**, 16.
- 441 18. Molento M.B., Tasca C., Gallo A., Ferreira M. *et al.* (2004) Método Famacha como  
442 parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos  
443 ruminantes. *Ciência Rural* **34**, 1139-1145.
- 444 19. Monteleone G., Calascibetta D., Reina R. & Portolano B. (2009) Study of  $\beta$ -defensin  
445 polymorphisms in Valle del Belice dairy sheep. *Italian Journal of Animal Science* **8**,  
446 111-113.
- 447 20. Monteleone G., Calascibetta D., Scaturro M., Galluzzo P. *et al.* (2011) Polymorphisms  
448 of  $\beta$ -defensin genes in Valle del Belice dairy sheep. *Molecular Biology Reports* **38**,  
449 5405-5412.
- 450 21. Moura J.O. (2017) Genômica populacional e proposta de manejo genético para  
451 rebanhos de conservação de caprino Marota usando *chips* SNPs. 63p. *Tese* (Doutorado  
452 em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí. Teresina.
- 453 22. Nelson D.L. & Cox M. (2002) Lehninger – Princípios de Bioquímica. 3ed. São Paulo:  
454 Sarvier.
- 455 23. Ng P.C. & Henikoff S. (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein  
456 function. *Nucleic Acids Research* **31**, 3812-3814.
- 457 24. Raymond M. & Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2) - population-genetics  
458 software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- 459 25. Regitano L.C.A. & Coutinho L.L.J. (2001) *Biologia molecular aplicada a produção*  
460 *animal* 1ed. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.36.
- 461 26. Salgado J.A. & Santos C.P. (2016) Overview of anthelmintic resistance of  
462 gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Revista Brasileira de*  
463 *Parasitologia Veterinária* **25**, 3-17.
- 464 27. SEMPLAN – Secretaria Municipal de Planejamento e Coordenação. (2015) Teresina:  
465 Caracterização do Município. *Prefeitura Municipal de Teresina*, 11p.

- 466 28. Soman S.S., Arathy D.S. & Sreekumar E. (2009) Discovery of anas platyrhynchos  
467 avian beta-defensin 2 (Apl\_AvBD2) with antibacterial and chemotactic functions.  
468 *Molecular Immunology* **46**, 2029–2038.
- 469 29. Souza B.B., Barbosa E.M., Azevedo J.S.N., Campelo J.E.G. *et al.* (2015) Genetic  
470 polymorphisms in  $\beta$ -defensin II gene in Amazon sheep from Brazil. *Genetics and*  
471 *Molecular Research* **14**, 12805-12810.
- 472 30. Tolone M., Mastrangelo S., Gerlando R.D., Sutura A.M. *et al.* (2016) Association study  
473 between  $\beta$ -defensin gene polymorphisms and mastitis resistance in Valle del Belice  
474 dairy sheep breed. *Small Ruminant Research* **136**, 18-21.
- 475 31. Turner S., Armstrong L., Bradford Y., Carlson C.S. *et al.* (2011) Quality control  
476 procedures for genome-wide association studies. *Current Protocols in Human Genetics*  
477 **68**, 1-19.
- 478 32. Ueno H. & Gonçalves P.C. (1998) Manual para diagnóstico das helmintoses de  
479 ruminantes. *Japan International Cooperation Agency* **4**, 149.
- 480 33. Zetouni L., Camargo G.M., Silva F.P.D., Cardoso D.F. *et al.* (2014) Polymorphisms in  
481 the MTRN1A gene and their effects on the productive and reproductive traits in  
482 buffaloes. *Tropical Animal Health and Production* **46**, 337-340.
- 483 34. Zhao C., Nguyen T., Liu L., Shamova O. *et al.* (1999) Differential expression of  
484 caprine  $\beta$ -defensins in digestive and respiratory tissues. *Infection and Immunity* **67**,  
485 6221–6224.
- 486

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A raça Anglonubiana apresenta os seguintes polimorfismos no gene da  $\beta$ -defensina 1: 1932 (íntron 1); 1937 (íntron 1); 2001 (éxon 2); 2004 (éxon 2); 2007 (éxon 2); 2025 (éxon 2); 2043 (éxon 2); 2045 (éxon 2); 2046 (éxon 2); 2140 (3'UTR); 2179 (3'UTR) e 2182 (3'UTR). Algumas dos SNPs acarretaram em mudanças que afetam a função proteica e, portanto, ganham importância como marcador molecular nessa espécie.

O estudo mostrou que o gene *Goat  $\beta$ -Defensin 1* apresenta alguns SNPs associados a características de sanidade relacionadas a ocorrência de nematodeoses e protozooses nas cabras da raça Anglonubiana. O SNP 1937 estava significativamente associado a quantidade de oocistos de protozoários eliminado nas fezes; o SNP 2001 ao grau de anemia indicado pelo Famacha<sup>©</sup>; o SNP 2046 estava associado ao grau Famacha<sup>©</sup> e a quantidade de oocistos de protozoários e o SNP 2140 estava associado ao Valor máximo de OPG do animal. Portanto, o gene tem potencial para ser marcador molecular da resposta de caprinos a infecção por endoparasitas.

A importância do gene como marcador molecular a ser utilizado em conjunto com características fenotípicas, permitirá avanços promissores, assim como redução de custos relacionados à profilaxia de doenças. Tais avanços podem promover melhorias significativas nos rebanhos locais, facilitando assim, a vida dos produtores.