



**Escola Superior
Agrária**

Politécnico de Coimbra

Licenciatura em Biotecnologia

Relatório de Estágio

Identificação de SNPs em genes dos fatores de crescimento dos fibroblastos e seus recetores. Associação com a produção e qualidade do leite em ovelhas Assaf.

Ana Beatriz Rodrigues Tavares

2017061874

Coimbra, 2020



**Escola Superior
Agrária**

Politécnico de Coimbra

Licenciatura em Biotecnologia

Relatório de Estágio

Identificação de SNPs em genes dos fatores de crescimento dos fibroblastos e seus recetores. Associação com a produção e qualidade do leite em ovelhas Assaf.

Orientador interno: Professor Pedro Nuno d'Almeida Monteiro Pinto Bravo

Orientador externo: Doutora Maria do Rosário Fernandes Marques

Co-orientador externo: Doutora Ana Teresa Colaço de Castro Pereira Carmona Belo

Local do estágio: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Ana Beatriz Rodrigues Tavares

2017061874

Coimbra, 2020

Agradecimentos

Chegando ao fim esta etapa do meu percurso académico, não poderia deixar escapar a oportunidade de agradecer a todos aqueles que muito contribuíram para o meu sucesso e a minha chegada até aqui.

À Doutora Ana Teresa Belo, investigadora responsável pelo projeto ALT20-03-0145-FEDER-000019 – GenPrOv: “Marcadores Genéticos para a Produção e qualidade do leite em Ovelhas da raça Assaf”, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), Portugal 2020 e Alentejo 2020¹, pela oportunidade de realizar este estágio no âmbito do projeto. Agradeço-lhe também a ela, ao Doutor Carlos Carmona Belo, ao Doutor José Ribeiro e ao Doutor Pedro Louro Martins pela recolha de amostras e análises referentes à qualidade do leite.

À minha orientadora, Doutora Maria do Rosário Marques, e à Doutora Ana Teresa Belo, o meu muito obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiram, por toda ajuda e apoio que me deram e por todo o carinho e preocupação que tiveram comigo. Ficarei para sempre muito grata.

Ao meu orientador interno, Professor Pedro Pinto Bravo, por toda a disponibilidade e apoio prestado durante a realização deste trabalho.

À Eng. Maria de Fátima Santos Silva, responsável pelo laboratório de Genética Molecular, pelas facilidades cedidas durante o desenvolvimento do trabalho laboratorial. À Dr^a Maria da Conceição Oliveira e Sousa, Eng. Ana Paula Jacob e D. Esperança Maurício, toda a simpatia e ajuda que disponibilizaram na realização das tarefas laboratoriais.

Aos meus pais e irmão, o meu muito obrigada por todo o apoio incondicional que sempre me deram e por me incentivarem sempre a lutar pelos meus sonhos. Sem eles não teria sido possível concluir esta etapa.

¹ Este projeto é financiado por:



Ao meu namorado, por todas as palavras de incentivo ao longo deste percurso.

Às minhas amigas, Salomé, Mariana, Inês e Sandra pela amizade e companheirismo ao longo destes três anos. Foram muitos os bons momentos que partilhámos.

Às minhas amigas Tânia e Inês, por todo o apoio e por estarem sempre presentes.

A toda a minha família, pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Resumo

Neste trabalho foram estudados SNPs não sinónimos (nsSNPs) nos genes dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) e seus recetores (FGFRs), os quais são reguladores chave no desenvolvimento e apresentam um papel fundamental na proliferação celular. Assim, procurou-se estabelecer uma associação entre alguns nsSNPs nestes genes e a produção e qualidade do leite em ovelhas Assaf.

A escolha dos nsSNPs a genotipar foi efetuada através de análises *in silico* de 32 SNPs distribuídos pelos genes *FGF1*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF7*, *FGF21*, *FGFR1*, *FGFR2* e *FGFR3*. Os SNPs mais promissores do ponto de vista funcional foram localizados nos FGFRs. Optou-se por genotipar os nsSNPs rs1086115993, rs1091382468, rs1086048844, rs588343813 e g.128784747A>T no gene *FGFR3*. Fragmentos de ADN contendo estes nsSNPs foram amplificados por PCR-multiplex e genotipados por análise de SNaPshot® em 560 ovinos Assaf. Foi encontrado polimorfismo em todos os SNPs e um novo nsSNP: g.128784747A>C (V559G).

Amostras de leite foram colhidas mensalmente durante os três primeiros meses da lactação e foram determinados por Milk-o-Scan os seus teores em gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos totais isentos de matéria gorda. A análise estatística mostrou a existência de associações significativas entre o nsSNP g.128784747A>C e o teor em proteína do leite, tendo sido os animais heterozigóticos os que apresentam teores mais elevados de proteína no leite.

Os resultados obtidos parecem indicadores de que o novo nsSNP g.128784747A>C (V559G) encontrado no gene *FGFR3* poderá vir a ser útil em programas de melhoramento da raça Assaf com o objetivo de aumentar o teor em proteína do leite.

Palavras-chave: SNPs; fatores de crescimento dos fibroblastos; recetores dos fatores de crescimento dos fibroblastos; marcadores para a proteína do leite.

Abstract

In this work, 32 non synonymous SNPs (nsSNPs) from fibroblast growth factors (FGFs) genes and their receptors (FGFRs) were studied. These genes are key regulators in development, playing a fundamental role in cell proliferation. Thus, the objective was to establish an association between some nsSNPs in these genes and the milk production and quality in Assaf sheep.

The choice of nsSNPs to be genotyped was made through *in silico* analyses of 32 nsSNPs distributed by the *FGF1*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF7*, *FGF21*, *FGFR1*, *FGFR2* and *FGFR3* genes. The most promising SNPs from the functional point of view were located in the FGFRs. We chose to genotype the nsSNPs rs1086115993, rs1091382468, rs1086048844, rs588343813 and g.128784747A> T in the *FGFR3* gene. DNA fragments containing these nsSNPs were amplified by multiplex PCR and genotyped by SNaPShot® analysis on 560 Assaf sheep. Polymorphism was found in all SNPs and a new nsSNP: g.128784747A>C (V559G) was identified.

Milk samples were taken monthly during the first three months of lactation and their contents in fat, protein, lactose, total solids and total fat-free solids were determined by Milk-o-Scan. Statistical analysis showed the existence of significant associations between nsSNP g.128784747A>C and the milk protein content, with heterozygous animals having the highest levels of milk protein.

The results obtained seem to indicate that the new nsSNP g.128784747A>C (V559G) found in the *FGFR3* gene may prove to be useful in Assaf breeding programs aiming of increase milk production and quality.

Keywords: SNPs; fibroblast growth factors; fibroblast growth factors receptors; milk protein markers.