

## IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE MUC1 EM BÚFALOS DA RAÇA MURRAH

FERNANDA TRINDADE DA ROSA<sup>1</sup>; ARIONE AUGUSTI BOLIGON<sup>2</sup>; CARLA MOREIRA<sup>3</sup>; MARINA MORTATI DIAS<sup>4</sup>; GREGÓRIO MIGUEL FERREIRA DE CAMARGO<sup>5</sup>; HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA<sup>6</sup>; HUMBERTO TONHATI<sup>7</sup>; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA<sup>8</sup>; FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – fernandadarosa@zootecnista.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - arioneboligon@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista – carlafarma@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista – ma\_mortati@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Estadual Paulista – gregoriocamargo@hotmail.com

<sup>6</sup>Universidade Estadual Paulista

<sup>7</sup>Universidade Estadual Paulista – tonhati@fcav.unesp.br

<sup>8</sup>Universidade Federal de Pelotas – heden.luiz@gmail.com

<sup>9</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabiopablos@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A mucina MUC1 é uma glicoproteína expressa em tecidos epiteliais de mamíferos, como por exemplo, na glândula mamária. Sua principal função é proteger a superfície da célula contra os microrganismos do ambiente, assim como, pode atuar também na diferenciação epitelial (HANISCH; MULLER, 2000). A molécula do gene MUC1 é bem definida em bovinos e em ovinos, que tem sido associado com um número variável de repetições em tandem (VNTR), altamente polimórficas e altamente conservadas (RASERO et al., 2002).

Na bovinocultura leiteira, a mastite é a principal doença infecciosa que acomete a produção de leite e acarreta severos prejuízos econômicos. Caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária, no qual apresenta duas formas: clínica e subclínica. Sua etiologia pode estar relacionada a problemas durante o manejo de ordenha, do ambiente de criação dos animais e à fatores inerentes ao animal (HARMON, 1994).

Considerando que a erradicação dessa doença é bem difícil de ser alcançada, pois trata-se de uma doença complexa de caráter multifatorial, envolvendo diversos patógenos e o ambiente, o foco dos profissionais na área leiteira é em manter a prevalência da mastite mais baixa possível.

Portanto o objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase) para analisar polimorfismos no gene MUC1 em búfalos, e através da associação dos genótipos com os fenótipos, desenvolver marcadores moleculares para a resistência à mastite.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização deste estudo foram utilizados 200 búfalos mantidos no Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, na cidade de Jaboticabal, SP, Brasil. A extração de DNA foi realizada pelo método de extração salino descrito por Zadworny & Kuhnlein (1990). O teste de pureza e a quantificação do DNA foram realizadas em espectrofotômetro pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

As ampliações do DNA coletado e suas checagens foram realizadas no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética na Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. As regiões específicas do gene MUC1 foram amplificadas pela técnica de PCR, utilizando *primers* desenhados a partir das sequências deste gene, proveniente do banco de dados do site do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI); *primer forward*: 5' – CGCAGAACTACGCCA GTTTC – 3' e *primer reverse*: 5' – AGAGCGGGTGGTCATGGA – 3'.

Para estabelecer a melhor temperatura de anelamento para estes *primers* foi realizado em termociclador um gradiente de PCR, com temperaturas entre 55 e 66 graus *Celcius*. As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25ul, com uma incubação inicial de 95°C, por 15 minutos, seguidos de 37 ciclos, com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão por 1 minuto e 30 segundos e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

A checagem da amplificação foi realizada em gel de agarose 2%, utilizando como tampão TBE 0,5x, como corante o *GelRed* (Biotium) e como marcador de peso molecular o *GeneRuler* (ladder mix). A observação do gel foi realizada em transluminador de UV.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisado a amplificação nas diferentes temperaturas testadas (figura 1) optou-se por estabelecer a temperatura de anelamento a 58°C.

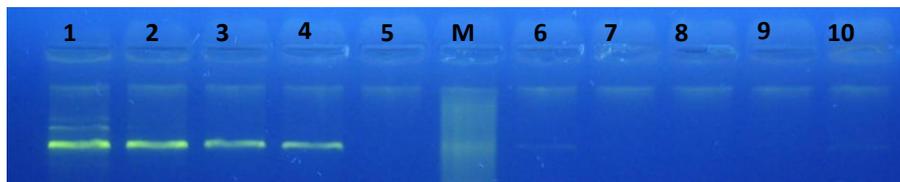


Figura 1. Ilustração do gradiente de PCR observados em gel de agarose 2%. M = marcador de peso molecular Ladder Mix; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10 referem-se às temperaturas de 55,7; 56,6; 57,9; 59,4; 61,2; 62,9; 64,1; 65,1; 65,7 e 66,0 graus Celsius, respectivamente.

Verificado a excelente amplificação dos primers baseados em *Bos taurus* para búfalos, e tendo a identificação da melhor temperatura de anelamento dos mesmos, a técnica de PCR testada foi utilizada como modelo padrão para a identificação de polimorfismos no gene MUC1 em búfalos.

Três alelos de diferentes tamanhos (nº de pares de base (pb)) foram amplificados e nomeados de alelo 1,2 e 3 (figura 2). O alelo 2 (800 pb) foi o alelo de maior prevalência (tabela 1), seguido do alelo 3 (900 pb) com uma frequência de 0,56 e 0,32, respectivamente. O genótipo 2/3 com uma frequência de 0,41 foi o mais frequente na população estudada, seguido pelo genótipo 2/2 com uma frequência de 0,33. O genótipo 1/3 foi o de menor prevalência.

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas do gene MUC1 no total de amostras na raça Murrah.

Genótipos	Frequências genotípicas	Alelos	Frequências alélicas
1/1	0,07	1	0,12
2/2	0,33	2	0,56
3/3	0,10	3	0,32
1/2	0,07		
1/3	0,03		
2/3	0,41		

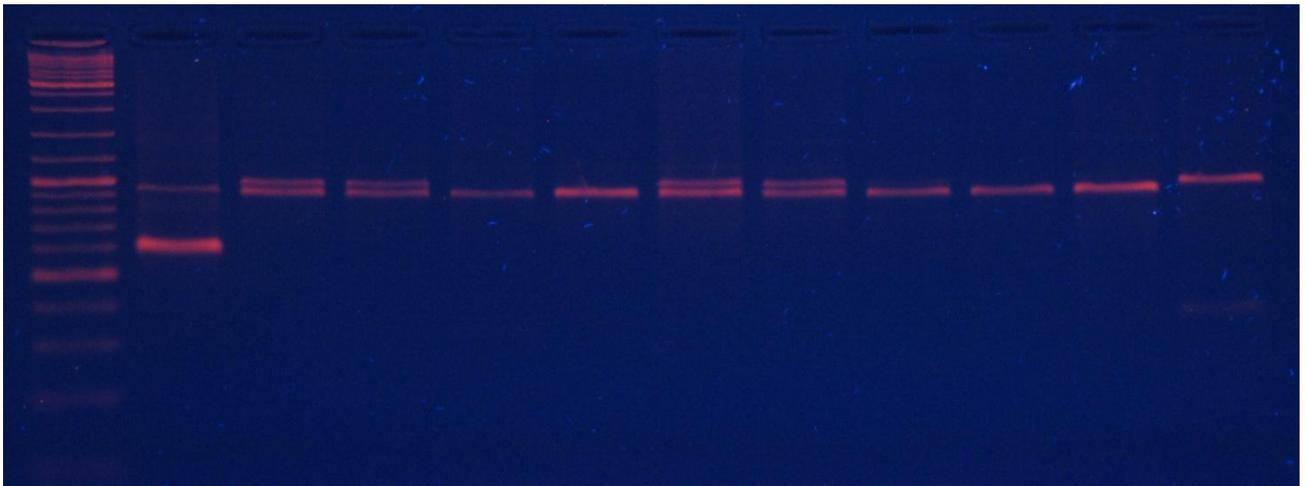


Figura 2. Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de 11 amostras de DNA. Da esquerda para a direita: DNA ladder; alelos 1/2, 2/3, 2/3, 2, 2, 2/3, 2/3, 2,2,2 e 3.

Genes de mucina são caracterizados pela presença anormal de repetições intragênicas dentro do transcrito (VERSTREPEN et al., 2005). Em cabras e bovinos, a MUC1 tem sido associada com características de rendimento e características reprodutivas (SACCHI et al., 2004). Assim como, sua transcrição pode ser controlada pela prolactina e por hormônios esteroides como a progesterona e o estrogênio (GENDLER, 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo até o momento foi observado polimorfismo no gene MUC1, e identificados três alelos, portanto, objetiva-se analisar a associação dos dados gênicos obtidos com as características fenotípicas dos animais em estudo, para que seja possível avaliar a utilização destes polimorfismos como marcadores moleculares para a resistência à mastite em búfalas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GENDLER, S.J. MUC1, the Renaissance Molecule. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.6, p.339-353, 2001.

HANISCH, F-G., MÜLLER, S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. **Glycobiology**, v.10, p.439-449, 2001.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-2112, 1994

RASERO, R., SACCHI, P., ROSATI, S., CAUVIN, E., MAIONE, S. Molecular analysis of the length polymorphic MUC1 gene in cattle. **Journal of Animal Breed and Genetics**, v.119, p.342-349, 2002.

SACCHI P., CAROLI A., CAUVIN E., MAIONE S., SARTORE S., SOGLIA D., RASERO R. Analysis of the MUC1 gene and its polymorphism in *Capra hircus*. **Journal of Dairy Science**, 87, 3017–3021, 2004.

VERSTREPEN K.J., JANSEN A., LEWITTER F., FINK G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.**, 37, 986–990, 2005.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa- casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theor. Appl. Genetic**, v.80, p.631-634, 1990.