

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMO NO GENE MUC1 EM BOVINOS DA RAÇA GIR

LUCAS DE VARGAS¹; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA², ARIONE AUGUSTI BOLIGON²; ANIBAL EUGÊNIO VERCESI FILHO³, LENIRA EL FARO ZADRA³, FABIO RICARDO PABLOS DE SOUZA⁴;

¹*Universidade Federal de Pelotas – lucasrincao@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – hedenluiz@gmail.com*

³*APTA – Instituto de Zootecnia/SP - lenira@iz.sp.gov.br*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – fabiopablos@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

O gene MUC1 codifica a mucina MUC1, que é uma glicoproteína transmembrana altamente glicosilada, presente na superfície apical da glândula mamária durante a lactação (MATHER et al., 2000). O gene MUC1 em bovinos é caracterizado por 7 exons e a proteína codificada consiste de 5 domínios estruturalmente distintos, dentre os quais está o domínio de variável número de repetições em tandem (VNTR; SANDO et al., 2009). As principais funções dessa glicoproteína estão relacionadas à proteção da superfície celular e lubrificação (GENDLER, 2001).

A mastite se apresenta como a doença de maior prevalência, geradora de altos custos na produção de leite no mundo todo (SHOOK, 1989). Além de prejudicial ao lucro dos produtores, a mastite prejudica a imagem do setor leiteiro, pelos danos ao bem-estar animal, diminuição na qualidade do leite e aumento do risco à saúde pública através do uso indiscriminado de antibióticos e surgimento de microrganismos resistentes (DE VLIEGHER et al., 2012).

A mastite consiste em uma resposta inflamatória à invasão da glândula mamária por microrganismos através do canal do teto, e pode se manifestar de maneira clínica ou subclínica. A forma clínica se caracteriza por sua visibilidade a olho nu, através da presença de grumos, sangue e pus no leite, podendo também estar associada a sintomas mais avançados como inchaço do úbere, febre e dor. A forma subclínica não pode ser diagnosticada a olho nu, mas pode ser detectada entre outras formas por meio da contagem de células somáticas (BRITO et al., 2008; DE VLIEGHER et al., 2012).

Tendo em vista que a erradicação da mastite é praticamente inviável devido a suas causas terem caráter multifatorial, é de interesse que se encontrem alternativas para diminuir as prevalências desta doença aos níveis mais baixos possíveis.

O objetivo deste estudo foi de identificar polimorfismos no gene MUC1 na raça de bovinos leiteiros Gir, como primeiro passo no estudo associativo deste gene com características de sanidade da glândula mamária e produção de leite.

2. METODOLOGIA

Para a execução deste trabalho foram utilizadas amostras de DNA provenientes de 18 vacas da raça Gir mantidas no APTA IZ de São Paulo. As amostras foram obtidas através extração de DNA pelo método salino (ZADWORNY & KUHNLEIN, 1990).

As amplificações do DNA coletado e suas análises foram realizadas no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética na Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. As regiões intragênicas 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'.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 μ L, 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.

A estimação do número de repetições Tandem em cada alelo foi realizada com a metodologia descrita por SOUZA et al. (2007), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ETR} = (\text{NCR})(\text{NR}) - (\text{L1036 pb})$$

Onde ETR é o tamanho (pb) da sequência não repetitiva, NCR o número de pb na sequência consenso, NR o número de repetições na sequência 1036 e L1036 pb o tamanho em pb do alelo 1036.

$$\text{NTR}(X) = \frac{\text{FNS}(X) - \text{ETR}}{60}$$

Onde X é o alelo, NTR o número de repetições e FNS o tamanho do alelo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 7 alelos com comprimentos diferentes, compondo 8 genótipos. O número de alelos observado no presente trabalho foi superior ao encontrado por SOUZA et al.(2011) em um trabalho com bovinos da raça Nelore, onde foram identificados 5 alelos, os quais compunham 10 diferentes genótipos. SANDO et al.(2009) em estudo com 630 vacas da raça Holandês observou 9 variações alélicas e 15 diferentes genótipos para o gene MUC1.

A Figura 1 apresenta uma amostra representante de cada genótipo, dispostas de forma crescente.

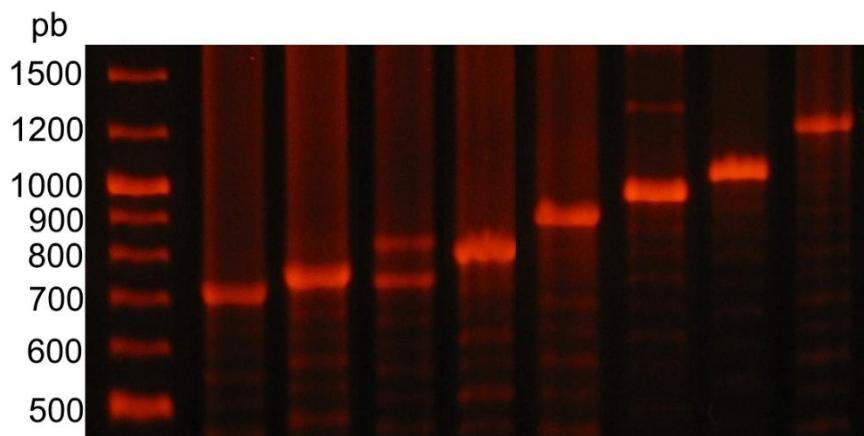


Figura 1. Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de 8 amostras de DNA. Da esquerda para a direita: DNA ladder; genótipos 1/1, 2/2, 2/3, 3/3, 4/4, 5/5, 6/6 e 7/7.

O número de unidades de VNTR variou de 4,4 a 13 nos alelos 1 e 7 respectivamente, o que resultará na produção de proteínas de tamanho consideravelmente diferentes entre os alelos. O número de repetições dos alelos 1 a 4 foi menor que o encontrado por demais autores em bovinos. Souza et al., (2007) encontrou um número de repetições em tandem variando entre 10 e 24 em seu estudo com a raça Nelore. Na raça Holandês, de maneira semelhante, o número de repetições variou de 7 a 23 entre o menor e o maior alelo identificados respectivamente (SANDO et al. 2009). A Tabela 1 demonstra o número de repetições em tandem para cada alelo encontrado.

Tabela 1 – Número de repetições em tandem por alelo no gene MUC1.

Alelos	Nº de repetições
1	4,4
2	5,2
3	6,0
4	8,0
5	9,4
6	10
7	13

4. CONCLUSÕES

Foi identificado polimorfismo para o gene MUC1 na raça Gir, tendo sido encontrados até o presente estudo 7 alelos de tamanhos distintos, com repetições em tandem variando de 4,4 a 13. Este resultado possibilita que prossigam-se os estudos de associação dos dados gênicos com características fenotípicas na busca por marcadores moleculares para resistência à mastite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Controle da mastite: como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. **Embrapa Gado de Leite** (Documentos). 2008.

DE VLIEGHER, S.; FOX, L. K.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, S. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p.1025-1040, 2012.

GENDLER, S. J. MUC1, the renaissance molecule. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.6, p.339–353, 2001.

MATHER, I. H. A review and proposed nomenclature for major proteins of milk-fat globule membrane. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.203–247, 2000.

SANDO, L.; PEARSON, R.; GRAY, C.; PARKER, P.; HAWKEN, R.; THOMSON, P. C. Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.10, p.5276-5291, 2009.

SHOOK, G. E. Selection for disease resistance. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.5, p.1349-1362, 1989.

SOUZA, F. R. P.; DENTILLO, D. B.; MEOLA, J.; BIASE, F. H.; ANDRÉA, M. V.; VOZZI, P. A.; MARTELLI, L. R. The polymorphism in MUC1 gene in Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.124, n.1, p.42-46, 2007.

SOUZA, F. R. P.; VOZZI, P. A.; VILA, R. A.; BOLIGON, A. A.; GALERANI, M. A. V.; LÔBO, R. B.; MARTELLI, L. R. Association between MUC1 gene polymorphism and expected progeny differences in Nelore cattle (*Bos primigenius indicus*). **Genetics and molecular biology**, v.33, n.1, p.68-70, 2010.

ZADWORNY, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.631-634, 1990.