

DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO GENE MUC1 EM REBANHOS LEITEIROS NO RS

LUCAS DE VARGAS¹; DANIEL DUARTE DA SILVEIRA²; ROGERIO FÔLHA BERMUDES³; HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA⁴; FABIO PABLOS DE SOUZA⁵; ARIONE AUGUSTI BOLIGON⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – lucasrincao@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – silveira1302@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rogerio.bermudes@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – heden.luiz@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabiopablos@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – arioneboligon@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

As mucinas são definidas como glicoproteínas grandes, abundantes e filamentosas, presentes em locais de encontro entre muitos epitélios e seus ambientes extracelulares, seja o lúmen de órgãos ocos, no trato gastrointestinal ou ductos para o ambiente externo e na glândula mamária (DEKKER et al., 2002). Uma das características marcantes das mucinas de superfície celular, como a MUC1, é seu grande domínio extracelular, variando de 1.000 a 2.200 aminoácidos, com uma região de variável número de repetições em tandem (VNTR) de 20 aminoácidos, que carrega as cadeias de glicanos (GENDLER, 2001).

Polimorfismos de tamanho de sequência repetitiva consistem em locais onde o DNA se apresenta altamente repetitivo. De acordo com o tamanho da unidade de nucleotídeos repetitiva, estes polimorfismos são divididos em microssatélites e minissatélites. Entende-se por minissatélites repetições em tandem de unidades repetitivas variando de 6 a 100 pares de base (pb), e tamanho total variando entre 500 e alguns milhares de pb (CANTSILIERES, 2017). O gene MUC1, portanto, pode ser definido como um marcador molecular do tipo minissatélite.

Na ausência dos fenômenos de migração, mutação e seleção, as frequências gênicas ou alélicas e genotípicas se manterão constantes ao longo das gerações em populações grandes com acasalamentos ao acaso. Uma população que atinge estes pré-requisitos é considerada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (FALCONER, 1960).

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene MUC1 em DNA de vacas da raça Jersey, provenientes de quatro fazendas localizadas no estado do Rio Grande do Sul. Além disso, as frequências obtidas nas diferentes fazendas foram comparadas e testadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

2. METODOLOGIA

Para a execução deste trabalho foram utilizadas amostras de DNA provenientes de 135 vacas da raça Jersey criadas em quatro fazendas, sendo 56 no município de Pelotas (Fazenda 1), 46 em Aceguá (Fazenda 2), 18 em Capão do Leão (Fazenda 3) e 15 em Santa Rosa (Fazenda 4), todas localizadas no estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram obtidas através da 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 12,5 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 a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, utilizando como tampão SB 1x, 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.

As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre as quatro fazendas através do teste exato de Fisher, utilizando o módulo de diferenciação populacional, e o teste exato de Hardy-Weinberg do software GENEPOP, versão 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alelos de três diferentes tamanhos foram identificados, sendo definidos como alelos 1, 2 e 3, e originaram cinco diferentes genótipos nas populações estudadas (Figura 1). O tamanho aproximado variou de 800 a 1.050 pb, nos alelos 1 e 3, respectivamente, com um alelo 2 intermediário de 950 pb.

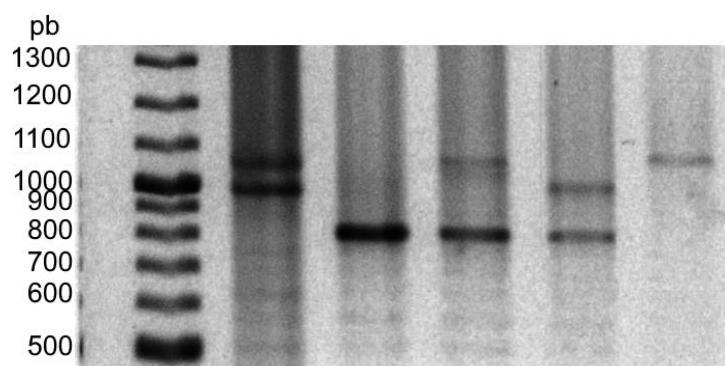


Figura 1. Gel de eletroforese mostrando produtos de PCR de cinco amostras de DNA. Da esquerda para a direita: DNA ladder, genótipos 2/3, 1/1, 1/3, 1/2 e 3/3

O alelo 3 foi o mais frequente nas quatro fazendas estudadas e o alelo 2 demonstrou ser de rara ocorrência (Tabela 1). O genótipo 3/3 teve a maior ocorrência em todas as fazendas, exceto na fazenda 4 onde sua presença foi igual ao genótipo 3/1, que por sua vez foi o segundo mais frequente nas demais fazendas. Corroborando a baixa frequência do alelo 2, não foram encontrados animais homozigotos para o mesmo.

Em estudos com a raça Holandesa e bubalinos, SANDO et al. (2009) e DA ROSA et al. (2015), respectivamente, reportaram a identificação do mesmo número de alelos para o gene MUC1, porém com tamanhos distintos dos encontrados no presente estudo. Para animais da raça Nelore, cinco alelos foram amplificados e compuseram 10 diferentes genótipos (SOUZA et al., 2012).

Tabela 1 - Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do MUC1 em cada fazenda e no total das amostras analisadas

	Alelos	Frequências alélicas	Genótipos	Frequências genotípicas
Fazenda 1	1	0,36	1/1	0,16
	2	0,02	2/1	0,02
	3	0,63	3/1	0,38
	-	-	3/2	0,02
	-	-	3/3	0,43
Fazenda 2	1	0,26	1/1	0,07
	2	0,03	3/1	0,39
	3	0,71	3/2	0,07
	-	-	3/3	0,48
Fazenda 3	1	0,14	3/1	0,28
	2	0,06	3/2	0,11
	3	0,81	3/3	0,61
Fazenda 4	1	0,40	1/1	0,20
	3	0,60	3/1	0,40
	-	-	3/3	0,40
Total	1	0,30	1/1	0,11
	2	0,03	2/1	0,01
	3	0,67	3/1	0,37
	-	-	3/2	0,04
	-	-	3/3	0,47

O teste exato de Fisher demonstrou diferença significativa ($p<0,05$) nas frequências alélicas e genotípicas e entre a fazenda 3 e as fazendas 1 e 4, não havendo diferença entre as demais. Este resultado possivelmente se atribua ao reduzido número de animais utilizados no estudo pertencentes às fazendas 3 e 4. Todas as fazendas estudadas se apresentaram em equilíbrio pelo teste de Hardy-Weinberg, o que sugere que os alelos estudados não estão sendo selecionados nesses rebanhos.

4. CONCLUSÕES

O gene MUC1 apresenta-se polimórfico na raça de bovinos leiteiros Jersey, sendo identificados três alelos nas fazendas estudadas. Os alelos 3 e 2 foram o mais frequente e o mais raro, respectivamente. A fazenda 3 diferiu das fazendas 4 e 1, tanto na análise genotípica quanto alélica, não havendo diferença entre as demais. Todos os rebanhos demonstraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANTSILIERES, S. **Genotyping methods and protocols**. Hertfordshire: Humana Press, 2017. Cap.1, p. 1-16.

DA ROSA, F., MOREIRA, C., MORTATI, M., BORQUIS, R., BOLIGON, A., TONHATI, H., MOREIRA, H., SOUZA, F. MUC1 gene polymorphism in Murrah water buffaloes and its association with milk production traits. **Journal of Animal Science**, v.93, p.801-802, 2015.

DEKKER, J., ROSSEN, J. W., BÜLLER, H. A., EINERHAND, A. W. The MUC family: an obituary. **Trends in Biochemical Sciences**, v.27, n.3, p.126-131, 2002.

FALCONER, D. S. Introduction to quantitative genetics Ronald Press, New York. 1960.

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

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.

SOUZA, F. R. P., MAIONE, S., SARTORE, S., SOGLIA, D., SPALENZA, V., CAUVIN, E., RASERO, R. MUC1 gene polymorphism in three Nelore lines selected for growth and its association with growth and carcass traits. **Molecular Biology Reports**, v.39, n.2, p.1541-1549, 2012.

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.