

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Exploração da biblioteca genômica de búfalo para marcadores moleculares do sistema imune¹

Mariana M. Borges², Nedenia B. Stafuzza³, Bruna C. M. Naressi⁴, M. Elisabete J. Amaral⁵

¹Trabalho financiado pela FAPESP

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Bolsista CAPES. e-mail: marianamborges@gmail.com

³Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. Bolsista FAPESP. e-mail: nedeniabs@gmail.com

⁴Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento – FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Bolsista CAPES. e-mail: brunanaressi@hotmail.com

⁵Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. e-mail: amaral@ibilce.unesp.br

Resumo: A caracterização molecular dos genes do sistema imune de búfalo possibilita a construção de ferramentas para análise da variabilidade genética nos rebanhos, permitindo, por exemplo, a criação de um painel de SNPs para estudos de polimorfismos associados com resistência a doenças. Visando determinar a estrutura molecular dos genes do sistema imune de búfalo, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e sequenciamento de clones positivos para esses marcadores a partir da biblioteca genômica de búfalo. Foram identificados 12 clones positivos para 11 marcadores do sistema imune por meio das técnicas de PCR e eletroforese. Os clones foram purificados e sequenciados via pirosequenciamento. Os resultados obtidos serão utilizados na construção de chips de SNPs específicos para o sistema imune de búfalo, os quais serão aplicados em estudos de seleção genômica em rebanhos bubalinos.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, complexo principal de histocompatibilidade, MHC, PCR, sequenciamento

Exploring a buffalo genomic library for molecular markers related to immune system

Abstract: The molecular characterization of immune system genes in buffalo enables the construction of tools to study genetic variability of herds, allowing the development of a SNP panel to study polymorphisms associated with disease resistance. In order to determine the molecular structure of immune system genes in buffalo, this study aimed to identify and sequence clones containing these markers from a buffalo genomic library. We identified 12 clones for 11 immune system markers by PCR and electrophoresis techniques. The clones were purified and sequenced by pyrosequencing. The results will be applied on the construction of SNP chip to study the buffalo immune system, which will be used in genomic selection studies of buffalo herds.

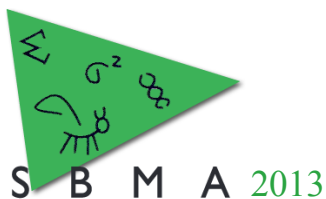
Keywords: *Bubalus bubalis*, major histocompatibility complex, MHC, PCR, sequencing

Introdução

Atualmente, a utilização de ferramentas genômicas vem gerando informações moleculares em larga escala e em um curto intervalo de tempo, as quais podem ser aplicadas na criação e no aperfeiçoamento das estratégias de seleção em programas de melhoramento genético.

Uma das principais ferramentas genômicas utilizadas para elucidar a estrutura molecular de genes e regiões do genoma, são as chamadas bibliotecas genômicas, as quais são formadas por uma coleção de clones contendo fragmentos de DNA inseridos em um vetor de clonagem (Shizuya et al., 1992). No Brasil, esta ferramenta genômica foi construída recentemente com o genoma do búfalo (*Bubalus bubalis*), contribuindo com avanços significativos nos estudos moleculares do genoma bubalino (Stafuzza et al., 2012a).

Dentre os genes de interesse econômico a serem estudados utilizando essa biblioteca genômica, destacam-se aqueles associados à resposta imune, localizados na região conhecida como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). O alto número de polimorfismos presentes nesses genes permite o reconhecimento de um vasto repertório de patógenos. Além disso, o MHC também influencia o balanço entre fertilidade e imunidade, resultando em implicações no índice de prenhez e produção de embriões (Bainbridge et al., 2001).



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

No sistema reprodutor das fêmeas, as proteínas que atuam na imunorregulação estão presentes desde a deposição dos espermatozoides até o nascimento do bezerro, desempenhando um papel chave na manutenção da gestação. Qualquer modificação de forma direta ou indireta pode acarretar alterações no processo reprodutivo, manifestando clinicamente um amplo espectro de patologias que vão desde a redução da capacidade de prenhez até abortamentos de repetição. Desse modo, a quantidade e a variabilidade das proteínas do sistema imune da fêmea são determinantes no sucesso ou não da prenhez.

Visando gerar novos marcadores moleculares para estudos populacionais em búfalos, o presente trabalho teve como objetivo identificar e sequenciar clones da biblioteca genômica de búfalo que contenham marcadores do sistema imune. A caracterização desses marcadores possibilitará a criação de painéis de SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) que serão utilizados na avaliação da variabilidade genética dos rebanhos, atuando como novos marcadores moleculares do sistema imune de búfalo.

Material e Métodos

O primeiro passo para o sequenciamento de marcadores do sistema imune de búfalo foi a avaliação de 33.792 clones da biblioteca genômica quanto à presença desses marcadores. Tal procedimento foi realizado por meio das técnicas de PCR e eletroforese, utilizando os mesmos pares de *primers* empregados no mapeamento desses marcadores no genoma de búfalo (Stafuzza et al., 2012b). As reações de PCR foram realizadas em três etapas seguindo o modelo de organização e armazenamento dos clones da biblioteca genômica de búfalo, descrito por Stafuzza et al. (2012a).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ L, utilizando 2 μ L de clone BAC, 0,2 mM de cada *primer*; 100 mM de dNTPs; 10mM de Tris-HCl; 1,5 mM de $MgCl_2$ e 0,05U/ μ L de DNA polimerase AmpliTaqGold™ (*Life Technologies*). Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C-65°C por 30 segundos (de acordo com os pares de *primers* utilizados), extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. A qualidade dos produtos de PCR obtidos foi visualizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e submetido à eletroforese horizontal em TBE 0,5X a 120V durante 40 minutos. Os resultados foram fotodocumentados com câmera digital DC290 KODAK™.

Após a identificação, os clones positivos para os marcadores do sistema imune foram purificados e sequenciados via pirosequenciamento (*Roche*).

Resultados e Discussão

A avaliação de 33.792 clones da biblioteca genômica resultou na identificação de 12 clones positivos para 11 marcadores do sistema imune de búfalo, sendo eles: 11.05, 12.05, 13.00, 50.15, 55.15, 57.40, 58.00, 61.00, 65.00, 65.05 e DMA. A Tabela 1 apresenta a relação desses marcadores, assim como as sequências dos pares de *primers* utilizados e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Os pares de *primers* utilizados nesse trabalho também poderão ser aplicados em estudos de variabilidade genética realizados em populações de búfalos de qualquer uma das raças presentes no Brasil, contribuindo para o avanço no entendimento de como os polimorfismos presentes nesses genes podem estar relacionados à suscetibilidade e resistência a doenças de interesse econômico.

Os resultados obtidos neste trabalho serão utilizados na construção de chips de DNA contendo SNPs específicos do sistema imune de búfalo, os quais serão aplicados em estudos de seleção genômica, contribuindo de maneira expressiva na criação e no aperfeiçoamento de programas de melhoramento genético de búfalos no Brasil.

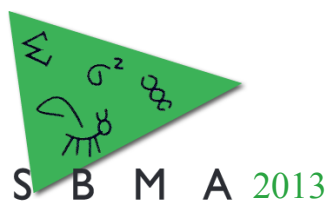


Tabela 1. Relação dos marcadores do sistema imune de búfalo identificados na avaliação da biblioteca genômica, com as respectivas sequências e temperatura de anelamento dos pares de *primers* utilizados

Marcadores	Sequências dos pares de <i>primers</i> (5'→ 3')	Temperatura de anelamento
11.05	F: GTTTCACCTCGGATGGAGATACA R: AGGCAGGATGTAGAGACTGA	56°C
12.05	F: CTAAGGTGACAGATGTGGGTGT R: AAAGCGAAGTAGGGTAGTGAGG	54°C
13.00	F: CTCACCGTTTTAAGAGCTTCT R: CTTTCCCATTAACTGTTCTC	56°C
50.15	F: GCAAAGAATTGATTTCCACACA R: AAACAGTCGGATGGCATTACTT	56°C
55.15	F: CTTCTGGAAGTCTTATCATGC R: TGACAGTGCATACAGAGGTGAG	54°C
57.40	F: ATGATGACTCCAGGTGATTCTG R: ACATACTAGGAAAAGGGGTGGA	56°C
58.00	F: CCTGAAACTCAGCCTTTTGC R: GCCTGGAGAGTCAGACCAAG	56°C
61.00	F: TCCTCAGAAACCAGAGTGTGTT R: GGCCTTGGTGAGTGAAACTT	56°C
65.00	F: GGCTTCTGCTCCTAAGTATGGT R: CATAGGTTCTTGACTGCTTTGG	56°C
65.05	F: CACTGATTGCACTGATATGG R: AGACCTTCTGGGCTCATTAGAG	56°C
DMA	F: TTTGTCTCCGCGTTGATGG R: CCAAGCCAACAATGATGCC	54°C

Conclusões

A partir da identificação e caracterização dos clones contendo genes do sistema imune de búfalo será possível determinar a estrutura molecular de tais genes, o que permitirá um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência e susceptibilidade a diversas doenças, além de possibilitar estudos de variabilidade genética dos rebanhos, representando uma importante ferramenta para a criação de programas de melhoramento genético de búfalos no Brasil.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido à Profa. Dra. M. Elisabete J. Amaral para a realização desse trabalho (Processo: 2011/11889-3) e à CAPES pela bolsa de mestrado concedida a aluna Mariana M. Borges.

Literatura citada

- BAINBRIDGE, D.R.J.; SARGENT, I.L.; ELLIS, S.A. Increased expression of major histocompatibility complex (MHC) class I transplantation antigens in bovine trophoblast cells before fusion with maternal cells. **Reproduction**, v.122, p.907-913, 2001.
- SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; KIM, U.J. et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.8794-8797, 1992.
- STAFUZZA, N.B.; ABBEY, C.A.; GILL, C.A. et al. Construction and preliminary characterization of a river buffalo bacterial artificial chromosome library. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.3013-3019, 2012a.
- STAFUZZA, N.B.; GRECO, A.J.; GRANT, J.R. et al. A high-resolution radiation hybrid map of the river buffalo major histocompatibility complex and comparison with BoLA. **Animal Genetics**, 2012b. doi: 10.1111/age12015 (in print).