

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

Caracterização molecular de genes associados com hemostasia e resposta imune em búfalo¹

Nedenia Bonvino Stafuzza², Mariana Maciel Borges³, M. Elisabete Jorge Amaral⁴

¹Trabalho financiado pela FAPESP

²Pós-doutoranda do Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. Bolsista FAPESP. e-mail: nedeniabs@gmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Bolsista CAPES. e-mail: marianamborges@gmail.com

⁴Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP. e-mail: amaral@ibilce.unesp.br

Resumo: Embora as principais proteínas que atuam no sistema imune sejam codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade, diversas outras proteínas desempenham papéis cruciais na imunidade, atuando tanto na hemostasia quanto no sistema imune em conjunto com os genes do MHC. Visando contribuir para o entendimento das relações existentes entre patógeno-hospedeiro e como as diferenças em nível molecular afetam essas interações, o presente trabalho teve com objetivo a caracterização molecular dos genes CAPZA1, CD44, DPYD, FCGR2, F2, IRF1, MX1, NCK1, PSMD4, SLC20A2, SOD1, SPARC, SST e VAV3 a partir de uma biblioteca genômica construída com DNA de búfalo. Por meio das técnicas de PCR e eletroforese, foram identificados 18 clones positivos para os genes em estudo. Esses clones foram purificados e submetidos ao pirosequenciamento. A caracterização molecular desses genes em búfalo possibilita o desenvolvimento de estudos de variabilidade genética nos rebanhos bubalinos associando os polimorfismos encontrados com características de resistência a parasitas. Esses estudos permitirão a elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais os animais resistentes bloqueiam a instalação de uma alta taxa de infestação de parasitas.

Palavras-chave: biblioteca genômica, parasitas, resistência, sequenciamento, sistema imune

Molecular characterization of genes associated with hemostasis and immune response in buffalo

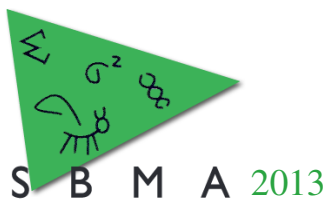
Abstract: Although the main proteins of immune system are encoded by major histocompatibility complex genes, several other proteins play crucial roles in immunity, acting on hemostasis and/or immune systems together with MHC genes. In order to better understand the complex relationships between host-pathogen and how the differences at the molecular level affect these interactions, this study aimed to characterize the CAPZA1, CD44, DPYD, FCGR2, F2, IRF1, MX1, NCK1, PSMD4, SLC20A2, SOD1, SPARC, SST and VAV3 genes from a buffalo genomic library. Were identified a total of 18 clones containing these genes by PCR and electrophoresis techniques. The clones were purified and sequenced by pyrosequencing. The molecular characterization of these genes in buffalo allows the development of genetic variability studies in buffalo herds in association with characteristics of parasite resistance. These studies will enable the elucidation of molecular mechanisms which the resistant animals prevent a high rate of parasites infestation.

Keywords: genomic library, immune system, parasites, resistance, sequencing

Introdução

O sistema de produção em bovinos e bubalinos sustenta-se, principalmente na saúde animal, no melhoramento genético e em uma alimentação adequada. O sucesso da relação de parasitas hematófagos com hospedeiros ocorre devido à habilidade dos parasitas em interferir nas reações anti-hemostáticas e inflamatórias do seu hospedeiro vertebrado, modulando, evadindo ou restringindo sua resposta imune (Wikel et al., 1996). O processo de hemostasia se caracteriza pela interrupção da hemorragia por meio do processo de coagulação sanguínea em consequência de traumas, infecções, rupturas espontâneas ou de seções cirúrgicas.

Embora as principais proteínas que atuam no sistema imune sejam codificadas por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*), há diversas outras proteínas atuantes na resposta imune inata e adaptativa que desempenham papéis cruciais na resposta a patógenos. Por exemplo, os genes SOD1 (*superoxide dismutase 1, soluble*), CAPZA1 (*capping protein muscle Z-line, alpha 1*), F2 (*coagulation factor II*), IRF1 (*interferon regulatory factor 1*),



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

SPARC (*osteonectin*) e VAV3 (*guanine nucleotide exchange factor VAV3*) atuam na hemostasia, participando da ativação, sinalização e agregação de plaquetas para contenção de hemorragias. Genes como, por exemplo, CD44 (*CD44 antigen*), NCK1 (*NCK adaptor protein 1*), MX1 (*myxovirus resistance 1, interferon-inducible protein p78*) e PSMD4 (*26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4*) atuam no sistema imune inato e/ou adaptativo em conjunto com os genes do MHC.

Uma vez que divergências genéticas podem ser responsáveis por diferenças existentes na susceptibilidade a parasitas, a elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais os animais resistentes previnem uma alta infestação de parasitas é um ponto crucial para o desenvolvimento de programas de seleção, uma vez que a resistência é uma característica herdável.

Visando contribuir para o entendimento das relações existentes entre patógeno-hospedeiro e como as diferenças em nível molecular afetam essas interações, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 14 genes de búfalo que atuam na hemostasia e/ou no sistema imune em conjunto com os genes do MHC, participando ativamente no processo de resposta imunológica do hospedeiro a patógenos.

Material e Métodos

A identificação de clones da biblioteca genômica de búfalo contendo os genes CAPZA1, CD44, DPYD, FCGR2, F2, IRF1, MX1, NCK1, PSMD4, SLC20A2, SOD1, SPARC, SST e VAV3 foi realizada por meio de reações de PCR, utilizando os pares de *primers* descritos em Amaral et al. (2008). 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. (2012).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL utilizando 0,2 mM de cada *primer*, 100 mM de dNTPs; 10 mM de Tris-HCl; 1,5 mM de MgCl₂, 1,25 U da DNA polimerase AmpliTaqGold™ (*Life Technologies*) e 2 µL do material biológico dos clones. Os ciclos para amplificação utilizados foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 50-65°C (dependendo do par de *primers*) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguida de uma extensão final a 72°C por 6 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 tampão TBE 0,5X a 120 V durante 40 minutos. Identificados os clones que continham os genes de interesse, seguiu-se com os experimentos de extração de DNA dos clones, utilizando o kit PhasePrep™BAC DNA (*Sigma-Aldrich*). Os DNA dos clones foram então purificados, quantificados e preparados para o pirosequenciamento (*454-Roche*).

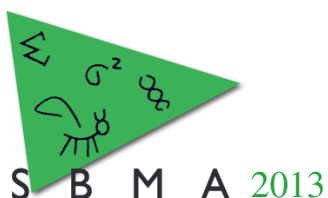
Resultados e Discussão

A avaliação dos 52.224 clones que compõem a biblioteca genômica de búfalo resultou na identificação de 18 clones positivos para os 14 genes em estudo, sendo identificados dois clones positivos para os genes CAPZA1, FCGR2, F2 e IRF1 e um clone positivo para os demais genes-alvo. Os clones identificados foram purificados, quantificados e as sequências de DNA desses genes foram determinados por pirosequenciamento.

A Tabela 1 apresenta o cromossomo bubalino que esses genes foram mapeados, a sequência dos pares de *primers* utilizados na identificação dos clones positivos e as vias de atuação de cada uma das proteínas codificadas por esses genes.

A identificação de 18 clones contendo marcadores relacionados com hemostasia, resposta imune, imunorreatividade e metabolismo de drogas demonstra que a biblioteca genômica de búfalo é uma poderosa ferramenta para o isolamento e caracterização de genes relacionados com essas características.

A caracterização molecular desses genes em búfalo possibilitará o desenvolvimento de estudos de variabilidade genética nos rebanhos bubalinos associando os polimorfismos encontrados com características de resistência e/ou susceptibilidade a parasitas. Posteriormente, as sequências de DNA geradas no presente trabalho serão utilizadas no desenho de chips de SNPs exclusivos para estudos de associação com imunidade em búfalos, permitindo a elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais os animais resistentes bloqueiam a instalação de uma alta taxa de infestação de parasitas.



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

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na identificação dos clones de interesse, o cromossomo bubalino (BBU) onde o gene foi mapeado e a(s) via(s) de atuação da proteína codificante

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	BBU	Atuação da proteína codificante
SLC20A2	F: ctgcaggcttaggaatcaga R: tctttgtgtgccctggatg	1p	Interação vírus-hospedeiro
SOD1	F: gtttggcctgtggttaattgaa R: ggccaaaatacagagatgaatgaa	1q	Hemostasia; ativação, sinalização e agregação de plaquetas
SST	F: catgtttacgggtgcgaaagtc R: gggctctattgaggattggaggg	1q	Imunorreatividade
MX1	F: ccgtagtctctgctgtctctta R: ggaatgaccttctacagtgtct	1q	Sistema imune inato
NCK1	F: cgctcttctctgctctctaa R: tgcagaagtaactaaggtgg	1q	Sistema imune inato e adaptativo
CAPZA1	F: tgacgtgtgttggaggaagac R: ggtttattggcaggtacaggtg	6	Sistema imune inato; hemostasia; produção de plaquetas
DPYD	F: aaggccagagtgttcagtaacc R: ggctttaaccagagttccatcc	6	Metabolismo de drogas
FCGR2	F: cctgaaatcctgaagctctctg R: agagtcctactgatgaacgtgc	6	Sistema imune inato
PSMD4	F: ccaagcattattagggcgcag R: agatggcaagaaggacaagaag	6	Sistema imune adaptativo; processamento e apresentação de antígenos
VAV3	F: aagggtgtctctggagtggga R: tgctctctgtaacagttgg	6	Sistema imune inato; hemostasia; ativação, sinalização e agregação de plaquetas
IRF1	F: gggcacacaggtagtcacat R: atgtgctaggaccatacagag	9	Sistema imune inato; hemostasia; indução de apoptose
SPARC	F: gtcaaaactctcacaccgtggc R: ttcaaatcaatgggatggtcgc	9	Hemostasia; ativação, sinalização e agregação de plaquetas
CD44	F: gtgtaaacactactctcatgacc R: cagtagcacattgcatctg	16	Infecção viral
F2	F: cgctgaagaagtgatacaga R: tcattactggattggcctc	16	Hemostasia; ativação, sinalização e agregação de plaquetas

Conclusões

Um dos grandes obstáculos para a seleção de animais resistentes está na quantidade limitada de dados disponíveis na literatura sobre os mais variados tipos de doenças que afetam os rebanhos bubalinos. A partir da caracterização desses genes em búfalo, será possível a prospecção e identificação de SNPs associados com a diversidade funcional, permitindo traçar um direcionamento nas estratégias de combate e prevenção de doenças que acometem os búfalos, além do desenvolvimento de vacinas e fármacos mais eficientes.

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 pela bolsa de pós-doutorado concedida à Dra. Nedenia B. Stafuzza (Processo: 2011/02478-0).

Literatura citada

- AMARAL, M.E.J.; GRANT, J.R.; RIGGS, P.K. et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v.9, 2008.
- 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, 2012b.
- WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.1-22, 1996.