

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MAPEAMENTO DE UM CONJUNTO DE
GENES NO CROMOSSOMO
6 BUBALINO**

Daniela Carolina Bizari
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MAPEAMENTO DE UM CONJUNTO DE
NOVOS GENES NO CROMOSSOMO
6 BUBALINO**

Daniela Carolina Bizari

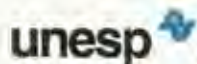
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Elisabete Jorge Amaral

Co-orientadora: Dr^a Nedenia Bonvino Stafuzza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MAPEAMENTO DE UM CONJUNTO DE GENES NO CROMOSSOMO 5 BUBA-LINO

AUTORA: DANIELA CAROLINA BIZARI

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA ELISABETE JORGE AMARAL

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA ELISABETE JORGE AMARAL
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto

Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. LUCIANE MADUREIRA DE ALMEIDA
Departamento de Agronomia e Engenharia Florestal / Universidade Estadual de Goiás / Ipameri/GO

Data da realização: 13 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DANIELA CAROLINA BIZARI - nascida em 12 de julho de 1982, na cidade de São José do Rio Preto – SP, Brasil. Graduiu-se em Ciências Biológicas Licenciatura em janeiro de 2009 pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Posteriormente, graduou-se em Ciências Biológicas Bacharelado, em janeiro de 2010 na mesma instituição. Possui experiência na área de Biologia Molecular, havendo realizado iniciação científica durante o quarto ano da graduação com o projeto “Participação de polimorfismos do gene *IL-1 β* na suscetibilidade genética ao câncer gástrico e a gastrite crônica em associação com fatores ambientais” com o qual foi bolsista PIBIC/CNPq. Durante o bacharelado, realizou estágio curricular supervisionado e defendeu sua monografia intitulada “Polimorfismos do gene *IL-1 β* e risco de câncer gástrico e gastrite crônica e interação com fatores ambientais” em dezembro de 2009. Ambos os projetos, de iniciação científica e de bacharelado, foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular do IBILCE-UNESP sob a orientação da Prof^a Dr^a Ana Elisabete Silva. Iniciou-se na pós-graduação ao ingressar no mestrado no Programa de Genética e Melhoramento Animal da UNESP câmpus de Jaboticabal em agosto de 2010. Desenvolveu o seu projeto de mestrado, intitulado “Mapeamento de um conjunto de genes no cromossomo 6 bubalino” no laboratório de Genômica Comparativa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, sob a orientação da Prof^a Dr^a Maria Elisabete Jorge Amaral e co-orientação da Dr^a Nedenia Bonvino Stafuzza.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

Dedico este trabalho à minha querida família, meus pais Carmen e Antônio e minha irmã Daiane, os quais me apoiaram em todos os momentos dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, com eles aprendi a ser forte e a lutar pelos meus sonhos. Amo vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Maria Elisabete Jorge Amaral, por ter me orientado em meu mestrado e me proporcionado conhecer o que é gostar de ciência. Cresci e aprendi muito durante esse período.

À minha co-orientadora, Dr^a Nedenia Bonvino Stafuzza, que antes de ser uma companheira de trabalho já era uma amiga de longa data, me auxiliando em diversos momentos de dúvida.

Ao Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, sob a coordenação da Dr^a Lúcia Galvão de Albuquerque. A oportunidade de fazer parte do programa me abriu novos horizontes em meu campo de visão.

Aos meus colegas do Laboratório de Genômica Comparativa pelos momentos de trabalho que compartilhamos e as conversas alegres onde descontraímos e quebramos a rotina.

Também aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Biologia Molecular, onde comecei minha vida na ciência, agradeço pelas experiências e bons momentos vividos.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida, que veio como um incentivo e reconhecimento ao presente trabalho de mestrado.

A todos os meus amigos, companheiros de todas as horas, os novos que fiz e os que eu mantive, os que estão sempre comigo não importando a distância. A amizade é uma base sólida onde podemos nos apoiar em todos os momentos. É sempre bom contar com vocês, adoro todos, cada um ao seu modo de ser.

Agradeço muito a Deus pelos momentos de luz, quando precisei de força e coragem para enfrentar os novos desafios que surgiram.

Enfim, sou grata a todos que fizeram parte desse percurso, cada pessoa em um determinado momento teve seu papel em minha vida e em minha luta. Sozinha eu não seria nada e por isso agradeço a todos vocês imensamente.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. Importância econômica do búfalo no Brasil.....	1
1.2. O genoma do búfalo.....	2
1.3. Mapeamento genômico do búfalo.....	4
1.4. O cromossomo 6 do búfalo (BBU6).....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Seleção e otimização dos iniciadores para PCR derivados do genoma bovino.....	9
3.2. Genotipagem das linhagens do painel BBURH ₅₀₀₀ e subsequente análise estatística e indicação dos genes <i>muc1</i> , <i>ppp1r7</i> , <i>psmd4</i> , <i>tshb</i> e <i>gtf2b</i> a intervalos do cromossomo 6 de búfalo.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1. Seleção e otimização dos iniciadores para PCR derivados do genoma bovino.....	13
4.2. Genotipagem das linhagens do painel BBURH ₅₀₀₀ e subsequente análise estatística e indicação dos genes <i>muc1</i> , <i>ppp1r7</i> , <i>psmd4</i> , <i>tshb</i> e <i>gtf2b</i> a intervalos do cromossomo 6 de búfalo.....	17
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30

MAPEAMENTO DE UM CONJUNTO DE GENES NO CROMOSSOMO 6 BUBALINO

RESUMO – No presente estudo, cinco novos genes codificantes de proteínas foram selecionados para o mapeamento do cromossomo 6 bubalino (BBU6). Os novos genes (*muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*) foram testados com a tecnologia de PCR resultando em produtos de PCR adequados ao mapeamento utilizando-se um painel de células somáticas híbridas irradiadas, denominado BBURH₅₀₀₀. Os resultados obtidos mostraram uma frequência de retenção (FR) do produto de PCR de cada gene nas diferentes linhagens do painel com variação de 13,3% (*gtf2b*) a 26,6% (*psmd4*). A análise comparativa entre os mapas RH do BBU6 e a sequência do cromossomo 3 bovino permitiu indicar a localização dos novos genes no cromossomo 6 bubalino.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, genômica comparativa, mapa RH, painel RH

MAPPING GENES ON BUFFALO CHROMOSOME 6

SUMMARY – In this study, five new protein coding genes were select for mapping buffalo chromosome 6. The new genes (*muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* and *gtf2b*) were tested using PCR technology resulting in PCR products suitable for mapping using a radiation hybrid panel (BBURH₅₀₀₀). The retention frequency of the PCR products in each hybrid cell line of the panel showed the percentage from 13,3% (*gtf2b*) to 26,6% (*psmd4*). Comparative analysis between the buffalo chromosome 6 RH map and the sequence from bovine chromosome 3 allowed to assign the location of the new genes on buffalo chromosome 6.

Keywords: *Bubalus bubalis*, comparative genomics, RH map, RH panel

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Importância econômica do búfalo no Brasil

Os búfalos pertencem à família Bovidae, subfamília Bovinae, tribo Bovini a qual é constituída pelos gêneros *Bison*, *Bos*, *Bubalus* e *Syncerus*. Dentro do gênero *Bubalus* encontra-se o búfalo de água asiático (*Bubalus Bubalis*), que por sua vez engloba dois tipos, o búfalo de rio e o búfalo de pântano (LENSTRA & BRADLEY, 1999). Estima-se que o búfalo de rio e o búfalo de pântano tenham divergido há aproximadamente 0,7 a 2 milhões de anos (RITZ et al., 2000), sendo que o búfalo de rio dos dias atuais seria resultado de um complexo processo de domesticação que se iniciou em torno de 5000-6000 anos atrás (KIERSTEIN et al., 2004; KUMAR et al., 2007).

Os bubalinos chegaram ao Brasil no final do século XIX provenientes da Ásia, Europa e Caribe e sua adaptabilidade a diversos ambientes, longevidade e fertilidade propulsionaram um grande crescimento do rebanho que se expandiu para diversas regiões onde são explorados para produção de carne e leite (BERNARDES, 2007). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) levantados em 2010, o rebanho bubalino no Brasil foi estimado em cerca de 1,18 milhões. Em comparação aos rebanhos dos demais países, o Brasil é o maior criador de búfalo fora da Ásia (FAO, 2011).

No Brasil são criadas e exploradas comercialmente três raças de búfalo de rio: Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (BORGHESE, 2005). As raças Murrah e Jafarabadi são originárias da Índia e possuem dupla aptidão produzindo leite e carne, contudo, a raça Murrah destaca-se mais na produção de leite. A raça Mediterrâneo teve origem na Itália e também é utilizada tanto para produção de carne quanto de leite. A raça Carabao, também encontrada no Brasil, é proveniente do sudoeste da Ásia, e é dentre as demais, a mais adaptada a regiões pantanosas sendo utilizada, no entanto, somente para tração (ANDRADE & GARCIA, 2005).

A importância econômica dos bubalinos como animais de produção no fornecimento de leite, carne e força de tração, associa-se ainda a sua capacidade de fácil adaptação a diferentes climas e condições de manejo, refletindo uma superioridade em relação aos demais ruminantes, o que tem propiciado à bubalinocultura uma expansão mundial (VALE et al., 2008).

Sob o aspecto econômico, o leite de búfala corresponde a 50% de todo leite consumido em países em desenvolvimento como Índia, Egito, Paquistão e Nepal, sendo que, no Brasil e em outros países ocidentais, o leite produzido é utilizado principalmente na obtenção do queijo muçarela (ASPILCUETA-BORQUIS et al., 2010; TONHATI 2011). A composição físico-química do leite de búfala permite um maior rendimento e alta qualidade na fabricação dos derivados lácteos (TONHATI et al., 2000).

Além das vantagens do leite, a carne de búfalo possui qualidades como menor teor de gordura, maior teor protéico e menor valor calórico em comparação à carne bovina (OLIVEIRA, 2005; BERNARDES, 2007).

No Brasil, a criação de búfalo vinha sendo destinada, principalmente, à produção de carne, porém, a partir dos anos 90, houve significativa expansão da industrialização do leite de búfalas, estimulando assim o crescimento de propriedades que visam à exploração leiteira e, conseqüentemente, uma intensificação no manejo das búfalas (BERNARDES, 2007). Nesse cenário, grande parte dos criadores de búfalo vem investindo na produção do leite e seus derivados, especialmente do queijo muçarela (GALEAZZI et al., 2010).

1.2. O genoma do búfalo

Os cariótipos do búfalo de rio e de pântano diferem com relação ao número de cromossomos, possuindo o búfalo de rio $2n=50$ e $FN=60$ (FN = número fundamental ou número de braços) e o de pântano, $2n=48$ e $FN=58$ (IANNUZZI, 2007). Com base nos

estudos do genoma bovino, o tamanho estimado do genoma bubalino é cerca de 2.621 Mbp (AMARAL et al., 2008), distribuídos em 25 pares de cromossomos.

Os 50 cromossomos do búfalo de rio incluem cinco pares submetacêntricos e 19 acrocêntricos, dentre os autossomos, mais um par de cromossomos sexuais (Figura 1). Os cinco primeiros cromossomos do búfalo de rio são submetacêntricos, resultantes de fusões entre cromossomos acrocêntricos do genoma bovínico ancestral (IANNUZZI et al., 2007).

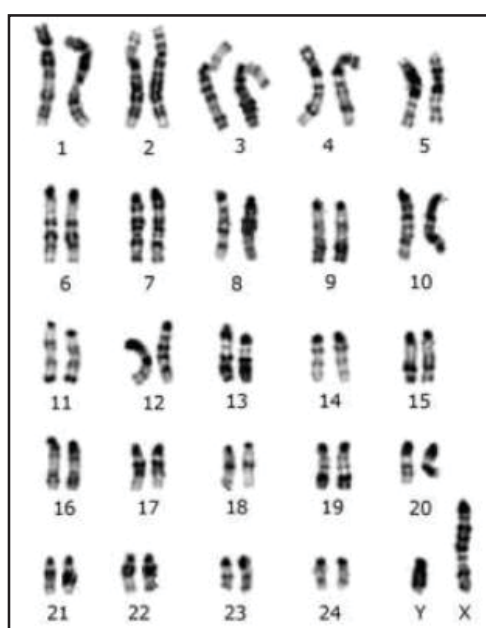


Figura 1. Representação do cariótipo normal de búfalo de rio, representado por um animal macho, obtido por meio de bandamento GBG evidenciando os 24 pares de cromossomos autossômicos (1 a 24) mais um par de cromossomos sexuais (X, Y). 1 a 5: cromossomos autossômicos submetacêntricos. 6 a 24: cromossomos autossômicos acrocêntricos (retirado de IANNUZZI, 2007).

Diversos estudos citogenéticos e de bandamento cromossômico revelaram homologia entre os cromossomos do búfalo quando comparado a outros bovídeos e evidenciaram uma extensa conservação cromossômica entre os bovinos e os bubalinos (IANNUZZI et al., 1994; IANNUZZI et al., 2000; IANNUZZI et al., 2003; PERUCATTI et al., 2009). Todos os cromossomos bubalinos possuem correspondência com cromossomos bovinos, sendo o BBU1 = BTA1/BTA27; BBU2 = BTA2/BTA23; BBU3 =

BTA8/BTA19; BBU4 = BTA5/BTA28 e BBU5 = BTA16/BTA29. Os demais cromossomos possuem correspondência um a um entre essas espécies (IANNUZZI et al., 1994).

1.3. Mapeamento genômico do búfalo

O mapeamento comparativo é uma valiosa ferramenta que pode ser utilizada para o entendimento da história evolutiva do genoma (YANG & WOMACK, 1998), podendo contribuir para a compreensão da origem evolutiva e conservação cromossômica das espécies, além de indicar regiões do genoma que influenciam o fenótipo (GOLDAMMER et al., 2009). Os mapas genômicos podem ser utilizados nos estudos de características de interesse econômico, permitindo a associação dessas características a potenciais genes candidatos (WOMACK et al., 2005). Baseado na hipótese de conservação de sintenia, o desenvolvimento de mapas comparativos entre espécies de interesse econômico e um genoma bastante informativo como o genoma humano, permite extrapolar a informação de um genoma para o outro (FARAUT et al., 2009).

A estratégia de mapeamento de genomas utilizando painéis de células somáticas híbridas irradiadas (mapeamento RH) constitui uma abordagem eficaz para a obtenção de mapas comparativos tanto de cromossomos individuais, quanto do genoma inteiro (McKAY et al., 2006), permitindo a inclusão de todos os tipos de marcadores moleculares, incluindo aqueles que não são polimórficos (YANG & WOMACK, 1998).

Um painel RH é obtido a partir da irradiação de células somáticas da espécie de interesse resultando na fragmentação dos cromossomos, que depois são incorporados ao genoma de células hospedeiras, conhecidas como receptoras, por meio de fusão celular (COX et al., 1990). O princípio básico do mapeamento RH consiste na avaliação do padrão de co-retenção de marcadores moleculares nas diferentes linhagens celulares do painel da espécie de interesse, permitindo inferir a distância entre os mesmos (FARAUT et al., 2009). Sendo assim, enquanto os mapas de ligação exploram a frequência de recombinação para o cálculo da distância entre os marcadores (JANN

et al., 2006), os mapas RH utilizam-se da probabilidade de quebra induzida pela radiação para ordenar e distribuir os marcadores, baseando-se na hipótese de que quanto menor a distância física entre dois *loci* no cromossomo, maior a probabilidade dos mesmos serem mantidos juntos durante o processo de quebra pela radiação (AGARWALA et al., 2000).

O mapeamento RH já foi utilizado com sucesso em várias espécies de animais de interesse econômico como, por exemplo, em bovinos (WOMACK et al., 1997; REXROAD et al., 1999; WILLIAMS et al., 2002; ITOH et al., 2005), suínos (YERLE et al., 1998; HAWKEN et al. 1999; YERLE et al., 2002; HAMASIMA et al., 2003), equinos (KIGUWA et al., 2000; CHOWDHARY et al., 2002) e ovinos (LAURENT et al., 2007; WU et al., 2007).

Para o búfalo, foi a construção deste tipo de ferramenta genômica, o painel RH denominado BBURH₅₀₀₀ (AMARAL et al., 2007), que iniciou o mapeamento em larga-escala do genoma bubalino (AMARAL et al., 2008). O painel BBURH₅₀₀₀ é constituído de 90 linhagens de células somáticas híbridas irradiadas com 5000rads (células doadoras), fusionadas com células de hamster (células receptoras) (AMARAL et al., 2007).

A partir do uso desta ferramenta de mapeamento, mapas RH preliminares foram construídos para os cromossomos BBU1, BBU3, BBU6, BBU7, BBU10, BBUX e BBUY (AMARAL et al., 2007; GOLDAMMER et al., 2007; MIZIARA et al., 2007; STAFUZZA et al., 2007; IANELLA et al., 2008; STAFUZZA et al., 2009). Posteriormente, a primeira geração de mapas RH de todos os cromossomos do genoma bubalino foi construída, mapeando um total de 2.621 marcadores no genoma bubalino utilizando marcadores derivados do genoma bovino (AMARAL et al., 2008).

1.4. O cromossomo 6 do búfalo (BBU6)

O cromossomo 6 bubalino (BBU6) é um cromossomo acrocêntrico, homólogo ao cromossomo bovino 3 (BTA3) (IANNUZZI, 1994). Com base em seu homólogo bovino

possui um tamanho estimado de 127 Mbp (AMARAL et al., 2008). Estudos de mapeamento preliminar do BBU6 utilizando o painel BBURH₅₀₀₀, resultaram na localização de 33 marcadores, incluindo, 19 genes codificantes de proteína, duas etiquetas de sequências expressas (ESTs = do inglês, *Expressed Sequence Tag*) e 12 microssatélites, distribuídos em dois grupos de ligação (STAFUZZA et al., 2007). Em 2008, com a publicação do mapa RH do genoma completo do búfalo, novos marcadores foram mapeados no BBU6, sendo 20 genes codificantes de proteínas, três ESTs, 12 microssatélites e 112 SNPs totalizando 147 marcadores (AMARAL et al., 2008).

De acordo com os dados de sequenciamento do genoma bovino, disponível no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (*Bos taurus* versão 5.2) encontram-se mapeados 1555 genes no BTA3, dos quais 20 desses genes apresentam a completa anotação de suas sequências (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9913&chr=3>). Dentre os genes mapeados no cromossomo 3 bovino (BTA3), mostram-se de particular interesse os genes *muc1*, do inglês - *mucin 1, cell surface associated*, *ppp1r7*, do inglês - *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7*, *psmd4*, do inglês - *proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4*, *tshb*, do inglês - *thyroid stimulating hormone, beta* e *gtf2b*, do inglês - *general transcription factor IIB*, por estarem associados com importantes vias metabólicas.

O gene *muc1*, previamente alocado ao cromossomo 6 bubalino por meio de hibridização *in situ* fluorescente – FISH (PERUCATTI et al., 2006), codifica a proteína mucina 1, sendo esta uma glicoproteína encontrada nas superfícies das mucosas onde desempenha papel protetor como barreira física aos patógenos (PATTON, 1999). A proteína mucina 1 faz parte do subgrupo de proteínas associadas à membrana, apresentando em sua estrutura um domínio citoplasmático altamente conservado entre bovinos e humanos (HOORENS et al., 2011).

O gene *ppp1r7* é codificante de uma proteína reguladora de uma das subunidades da enzima fosfatase-1 (PP1) que por sua vez, atua na desfosforilação de outras proteínas (BOLLEN, 2001).

O gene *psmd4*, por sua vez, codifica uma proteína participante do sistema ubiquitina-proteossomo, caracterizado em eucariotos como a principal rota não-lisossomal para degradação de proteínas. Esse sistema reconhece proteínas anormais as quais são ubiquitinadas e posteriormente degradadas pelo proteossomo 26S (CIECHANOVER, 1998).

O gene *tshb* codifica a subunidade β do hormônio estimulante da tireoide ou TSH (do inglês, *Thyroid-stimulating hormone*). Esse hormônio possui duas subunidades, TSH- α e TSH- β , que atuam regulando a glândula tireoide (MAGNER, 1990).

Por fim, o gene *gtf2b* codifica o fator geral de transcrição TFIIIB, o qual desempenha papel central na montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição, no recrutamento e na ativação da RNA polimerase II (ORPHANIDES et al., 1996).

No cromossomo 3 bovino (BTA3), também foram encontradas regiões contendo QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Loci*), relacionadas principalmente com características de produção e qualidade do leite, tais como porcentagem e produção de proteína e gordura (KHATKAR et al., 2004). Considerando-se que o BBU6 é o cromossomo de búfalo homólogo ao BTA3, estudos de mapeamento de novos genes e marcadores moleculares neste cromossomo são de extrema valia para as análises populacionais em búfalo, especialmente naquelas envolvendo a procura de genes candidatos. (O'BRIEN et al., 1999). Ainda, dentro da genômica comparativa, a comparação das posições e ordem entre genes homólogos contribui para a verificação de rearranjos e conservação de sintenia entre esses cromossomos.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o aproveitamento de iniciadores para PCR desenhados a partir de informações do cromossomo 3 bovino para o mapeamento de genes no cromossomo 6 do genoma de búfalo;
- Mapear um conjunto de novos genes no cromossomo 6 do búfalo utilizando estratégias de genômica comparativa e a ferramenta genômica caracterizada por um painel de células somáticas híbridas irradiadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção e otimização dos iniciadores para PCR derivados do genoma bovino

Visando o mapeamento de um conjunto de genes codificantes de proteínas no cromossomo 6 de búfalo, iniciadores para PCR disponíveis em bancos de dados públicos e desenhados a partir da sequência do cromossomo 3 bovino (BTA3) foram selecionados e avaliados. As informações sobre os genes e a respectiva sequência dos iniciadores para PCR foram obtidas a partir dos mapas genômicos do cromossomo 3 bovino disponíveis no banco de dados NCBI, *Bos taurus* versão 5.2 (inclui a versão Btau_4.2 e a anotação alternativa UMD_3.1). A sequência dos iniciadores para PCR de cada gene foram obtidas consultando o link *UniSTS* do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>).

Após a seleção dos iniciadores para PCR, procederam-se reações de PCR com gradiente de temperatura de anelamento, visando à obtenção de um produto de PCR único com DNA bubalino. Para as reações de PCR utilizou-se o termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*TM), com bloco para 96 amostras. Em cada coluna do termociclador (total de 12 colunas) foram programadas as temperaturas de anelamento variando de 50°C a 65°C (50°C, 53°C, 56°C, 59°C, 62°C e 65°C).

Nos experimentos, cada marcador foi testado com:

- DNA bovino, para verificar a qualidade dos iniciadores para PCR, uma vez que estes foram desenhados a partir da sequência do DNA do genoma bovino (controle positivo).
- DNA de hamster, provenientes das células utilizadas na construção do painel de células somáticas híbridas irradiadas de búfalo (BBURH₅₀₀₀), para verificar se possíveis amplificações poderiam interferir na interpretação dos resultados de PCR obtidos com DNA bubalino.
- DNA bubalino, para verificar a ocorrência de amplificação e assim selecionar a temperatura ideal de anelamento.

- Utilizou-se ainda, como controle negativo, uma reação sem a adição de DNA em todos os experimentos realizados.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 10µL, utilizando-se 50ng de DNA, 0,2mM de cada iniciador para PCR, 100mM de dNTP, 10mM de Tris pH9,0, 50mM KCl, 25mM de MgCL₂ e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase *True Start*TM *Hot Start* (FermentasTM). As condições das reações foram as seguintes: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50-65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, sendo a extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os géis foram fotografados e documentados no sistema de imagem composto pela câmera digital DC290 KodakTM e analisados pelo programa *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System*TM (EDAS).

3.2. Genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ e subsequente análise estatística e indicação dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* a intervalos do cromossomo 6 de búfalo

O painel BBURH₅₀₀₀ contém 90 linhagens de células somáticas híbridas irradiadas, geradas a partir da fusão de células somáticas de búfalo e de hamster como descrito por AMARAL et al. (2007). Os pares de iniciadores para PCR que geraram produtos de PCR adequados ao mapeamento foram utilizados no processo de genotipagem das linhagens híbridas búfalo/hamster do painel BBURH₅₀₀₀. A genotipagem de todas as 90 linhagens do painel foi realizada no mínimo duas vezes para cada gene, visando evitar a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos. As reações de PCR seguiram as mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se a temperatura de anelamento ideal previamente selecionada para cada par de iniciador para PCR.

A porcentagem de frequência de retenção (FR) de cada marcador nas diferentes linhagens do painel foi calculada pela razão entre o número de linhagens celulares positivas para a presença do produto de PCR do gene, dividido pelo número total de linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ (90 linhagens).

Após a genotipagem com as linhagens do painel BBURH₅₀₀₀, o padrão de presença e ausência do produto de PCR para cada gene foi registrado em uma tabela do tipo *Excel*, seguindo-se a análise estatística com o *software* CONCORDE (*Combinatorial Optimization and Networked Combinatorial Optimization Research and Development Environment*) baseado no princípio matemático TSP (do inglês, *Traveling Salesman Problem*) e no critério da máxima verossimilhança que determina parâmetros que maximizam a probabilidade (MLE – do inglês, *Maximum Likelihood Estimate*) (APPLEGATE et al., 1998; AGARWALA et al., 2000). O princípio do problema matemático TSP é o de encontrar o caminho mais curto e rápido para um vendedor percorrer frente a um conjunto de cidades a serem visitadas, sem que nenhuma cidade seja visitada mais de uma vez e retornando ao final das visitas à cidade de partida. No caso de mapas genômicos, as cidades são representadas pelos marcadores moleculares (FARAUT et al., 2009).

Os principais parâmetros utilizados pelo *software* na análise são:

- Identificação de marcadores ligados em um mesmo grupo de ligação agrupados com base em um LOD (Logaritmo (base 10) de *odds*) score $\geq 5,0$;
- Construção de um mapa consenso para cada grupo de ligação, definindo a posição de cada marcador em relação aos marcadores vizinhos com um alto suporte estatístico;
- Teste da acurácia estatística de cada mapa consenso e;
- A partir do mapa consenso, inclusão de marcadores adicionais.

Para indicação dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* no BBU6 realizou-se um mapeamento comparativo por intervalo entre o cromossomo 6 bubalino e o cromossomo 3 bovino, utilizando-se a mais recente versão do mapa RH do BBU6 (AMARAL et al., 2008) e o mapa de sequência do BTA3 (*Bos taurus* versão 5.2)

disponível no banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913).

Foram obtidas as coordenadas físicas da localização dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* no *bta3*, assim como daqueles marcadores que flanqueavam os genes e já se encontravam previamente mapeados no BBU6. As informações das coordenadas foram utilizadas para a construção gráfica dos cromossomos 6 bubalino e 3 bovino, com o auxílio do *software MapChart* (VOORRIPS, 2002). Os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* foram adicionados manualmente ao mapa RH do BBU6, indicando o intervalo com a provável localização desses genes de acordo com o observado na comparação com o mapa de sequência do BTA3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção e otimização dos iniciadores para PCR derivados do genoma bovino

Foram selecionados e testados pares de iniciadores para PCR de cinco genes codificantes de proteínas previamente mapeados no cromossomo 3 bovino, sendo eles: *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*. A Tabela 1 mostra as informações dos genes selecionados, incluindo o símbolo dos genes, a sequência dos iniciadores para PCR e seu número de referência no *UniSTS* do banco de dados NCBI.

Tabela 1. Genes selecionados a partir do cromossomo 3 bovino para o mapeamento no cromossomo 6 bubalino e seus respectivos iniciadores para PCR disponíveis do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Símbolo do gene	Sequência do iniciador para PCR Direto (F) e Indireto (R)	*Número de Referência
<i>muc1</i>	F: 5'-TGGGCCTCTCAGAGATCAAG-3' R: 5'-TATAACTGGCTGCGTGTGCT-3'	UniSTS:278798
<i>ppp1r7</i>	F: 5'-ATGAACGACAACCTCCTGGACTGC-3' R: 5'-CGATCTGCCGCACGCTGGG-3'	UniSTS:278945
<i>psmd4</i>	F: 5'-CCAAGCATTATTTAGGGCGCAG-3' R: 5'-AGATGGCAAGAAGGACAAGAAG-3'	UniSTS:278980
<i>tshb</i>	F: 5'-GACTTCATGTACAAGACTGC-3' R: 5'-GTCAGTATTACACTTGCCAC-3'	UniSTS:279221
<i>gtf2b</i>	F: 5'-AACAAGGACCTCTATCAGCTTT-3' R: 5'-GGTACGCATTCCAGGGCTA-3'	UniSTS:279370

**UniSTS* refere-se ao número de identificação da respectiva sequência de iniciadores para PCR no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>).

Dos cinco genes selecionados e testados utilizando-se gradiente de temperatura de anelamento, todos apresentaram amplificações por PCR de produtos específicos com o DNA bubalino, mostrando-se adequados aos experimentos com as linhagens celulares do painel de células híbridas irradiadas (BBURH₅₀₀₀). A Figura 2 mostra os

géis de agarose com o resultado do PCR com gradiente de temperatura para os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* respectivamente.

Para o gene *muc1*, foi obtido produto de PCR búfalo-específico com todas as temperaturas testadas. Já os genes *ppp1r7* e *psmd4* as temperaturas mais altas foram mais adequadas para gerar produtos de PCR específicos com o DNA de búfalo. Sendo assim, para esses três genes foi selecionada a temperatura de 65°C. Para o gene *tshb*, foram obtidos produtos de PCR adequados com as temperaturas de 50°C a 59°C, tendo sido selecionada para o mapeamento a temperatura de 59°C. Com relação ao gene *gtf2b*, os iniciadores para PCR geraram produto de PCR com as temperaturas de 50°C a 62°C e a temperatura de 62°C foi escolhida (Tabela 2).

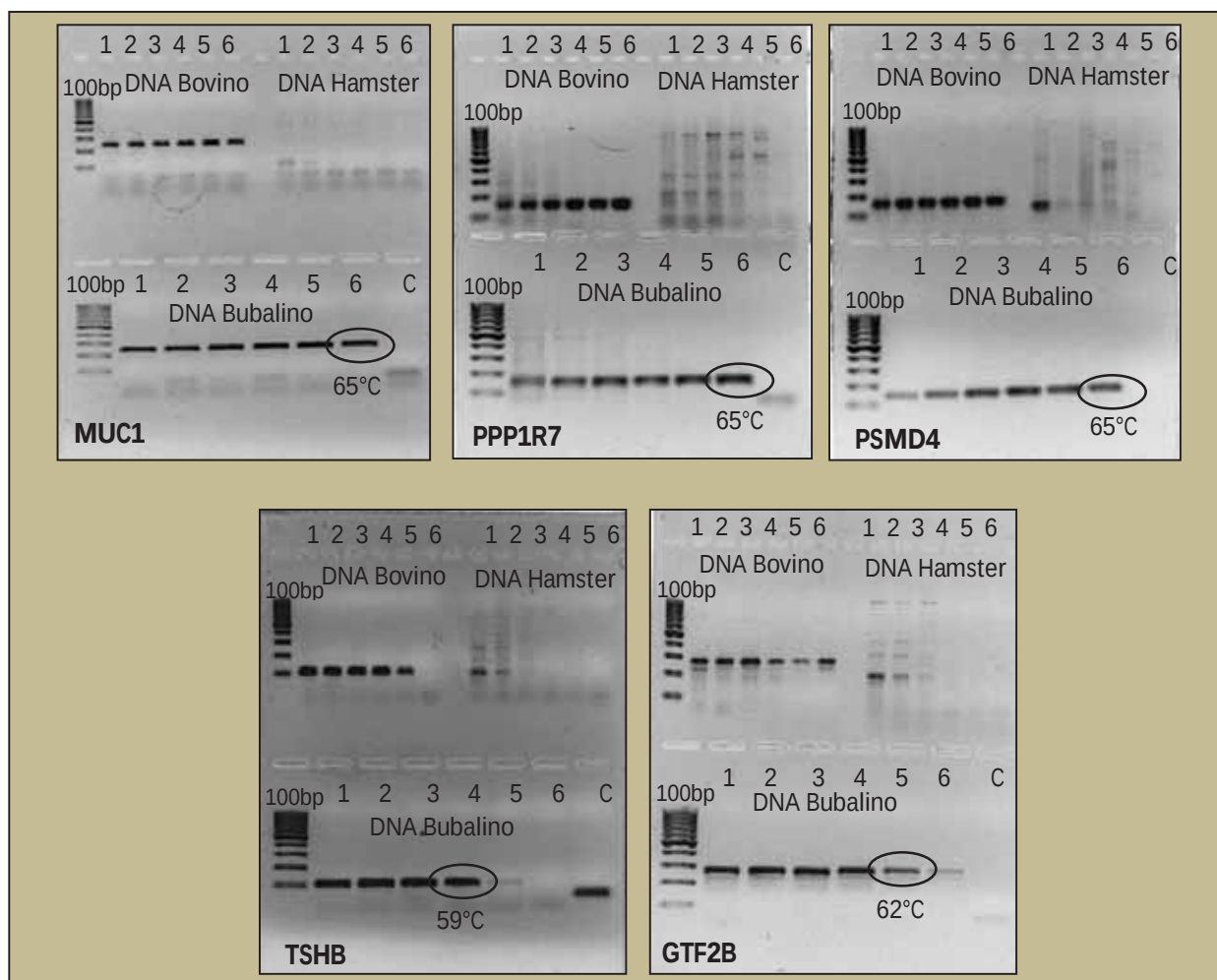


Figura 2. Representação do Gel de Agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados obtidos a partir dos experimentos com gradiente de temperatura de anelamento para os iniciadores para PCR dos genes selecionados (*muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*). Temperaturas utilizadas: colunas **1** - 50°C, **2** - 53°C, **3** - 56°C, **4** - 59°C, **5** - 62°C e **6** - 65°C. **DNA bovino**: controle positivo da reação, **DNA de hamster** das células receptoras do painel. **DNA bubalino** das células doadoras do painel. **100bp**: marcador molecular (*Gene Ruler*TM, FermentasTM). **C**: controle negativo (reação de PCR sem adição de DNA). Para cada marcador foi selecionada uma temperatura ideal para utilização no painel BBURH₅₀₀₀.

Tabela 2. Temperaturas de anelamento e tamanho aproximado dos produtos de PCR obtidos com os genes *muc1*, *psmd4*, *tshb*, *gtf2b* e *ppp1r7*.

Símbolo do gene	Nome do gene em <i>Bos taurus</i> *	Temperatura de anelamento selecionada	Tamanho aproximado em búfalo
<i>muc1</i>	<i>mucin 1, cell surface associated protein phosphatase 1,</i>	65°C	250bp
<i>ppp1r7</i>	<i>regulatory (inhibitor) subunit 7 proteasome (prosome,</i>	65°C	160bp
<i>psmd4</i>	<i>macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4</i>	65°C	150bp
<i>tshb</i>	<i>thyroid stimulating hormone, beta</i>	59°C	110bp
<i>gtf2b</i>	<i>general transcription factor IIB</i>	62°C	270bp

*De acordo com o banco de dados Gene do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

A otimização da reação de PCR dos marcadores com DNA de búfalo foi importante, pois, estes foram originalmente desenhados para bovinos. A escolha por temperaturas de anelamento altas é recomendável, pois, diversos estudos já constataram que, o aumento da temperatura de anelamento promove a especificidade do iniciador para PCR (XIANG-JUN et al., 2009; NUNAN & LIGHTNER, 2011).

Além disso, como pode ser observado, o aproveitamento dos iniciadores que foram testados foi de 100%, similar a trabalhos anteriores. Por exemplo, para o cromossomo BBU6, STAFUZZA et al. (2007) obtiveram um aproveitamento de 91% dos marcadores testados (entre eles, genes codificantes e microssatélites). Em outro trabalho feito com genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), todos os 10 marcadores testados também se mostraram adequados ao mapeamento (RODRIGUES-FILHO et al., 2008).

4.2. Genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ e subsequente análise estatística e indicação dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* a intervalos do cromossomo 6 de búfalo

Os cinco genes foram utilizados no processo de genotipagem das linhagens celulares híbridas do painel BBURH₅₀₀₀ para determinar o padrão de presença e ausência do produto de PCR nas diferentes linhagens. As Figuras 3, 4 e 5 mostram os géis de agarose com os resultados de um dos experimentos de genotipagem para os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*, com as respectivas linhagens do painel. As linhagens que resultaram em produto de PCR equivalente ao produto obtido com o DNA de búfalo apresentam-se assinaladas com o sinal de positivo (+). As linhagens que apresentaram um produto de PCR com menor intensidade em relação ao produto de PCR presente no controle com o DNA de búfalo estão assinaladas com o ponto de interrogação (?).

A partir dos resultados apresentados na figura 3, para o gene *muc1*, pode ser observado que 23 linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ apresentaram produto de PCR equivalente ao produto de PCR obtido com o DNA do búfalo (controle positivo) e foram consideradas linhagens positivas. Três linhagens apresentaram um produto de PCR de menor intensidade quando comparado ao produto obtido com o DNA do búfalo e por isso não puderam ser consideradas como linhagens positivas.

Para o gene *ppp1r7*, de acordo com o observado, 19 das 90 linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ apresentaram produto de PCR equivalente ao produto presente no controle com o DNA de búfalo, enquanto que, três linhagens apresentaram produtos de PCR com intensidade menor comparado ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo (Figura 3).

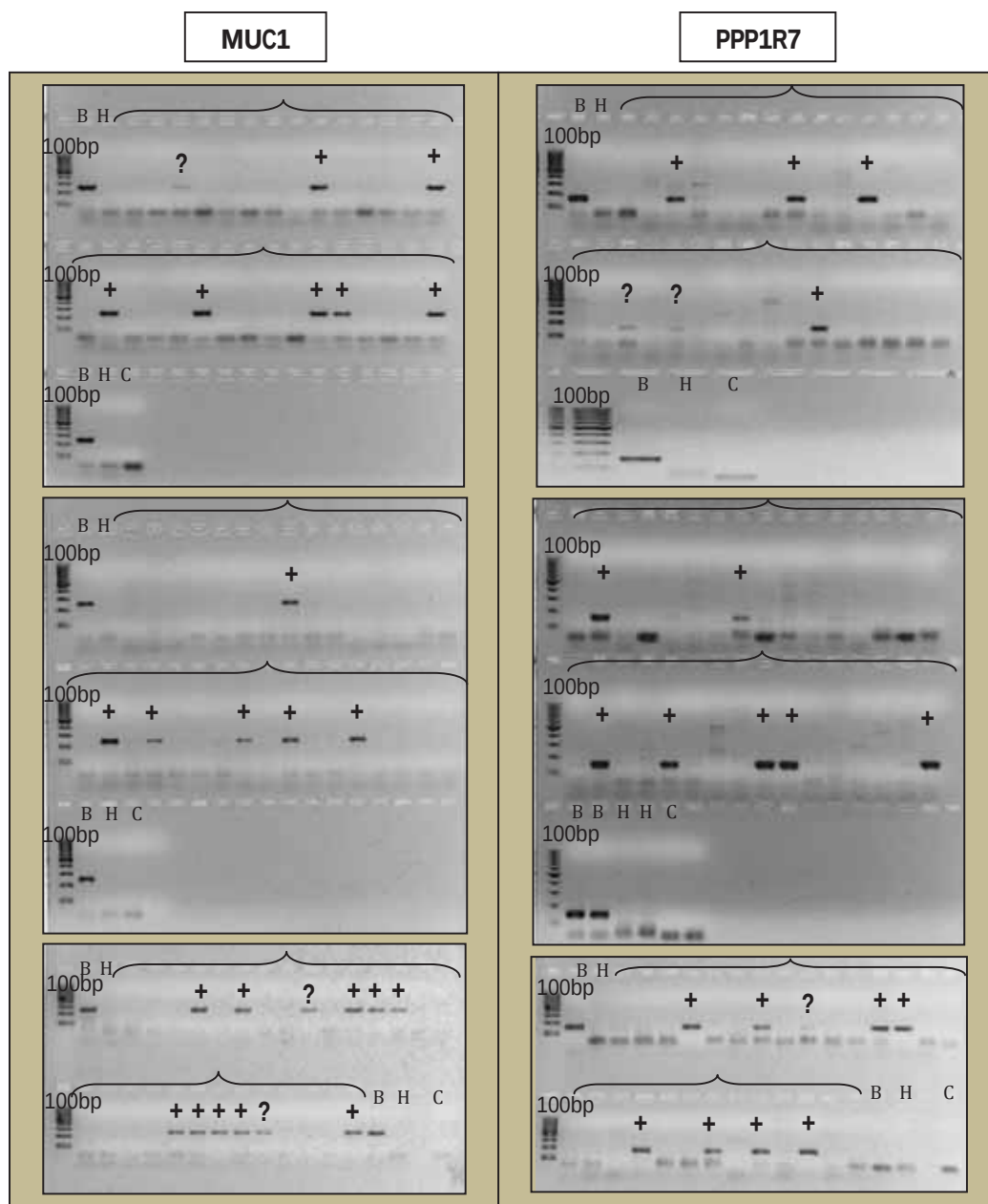


Figura 3. Representação do Gel de Agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados de um dos experimentos de genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ para os genes *muc1* e *ppp1r7*. **B:** DNA bubalino das células doadoras do painel (controle positivo). **H:** DNA de hamster das células receptoras do painel. **C:** controle negativo (reação de PCR sem adição de DNA). As chaves mostram as diferentes linhagens do painel que foram genotipadas. **100bp:** marcador molecular (*Gene Ruler*, FermentasTM). Os sinais positivos (+) indicam as linhagens que apresentaram produto de PCR equivalente ao produto obtido no controle com o DNA de búfalo. As linhagens que apresentaram um produto de PCR com menor intensidade em relação ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo estão assinaladas com o ponto de interrogação (?).

A Figura 4 representa os géis de agarose para os genes *psmd4* e *tshb*. Para o gene PSMD4 foi observado a presença de produto de PCR equivalente ao produto de PCR obtido com o controle positivo em 24 das 90 linhagens do painel BBURH₅₀₀₀. Oito linhagens apresentaram um produto de PCR de menor intensidade comparado ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo.

Os resultados observados para o gene TSHB demonstram que 22 dentre as 90 linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ apresentaram produto de PCR equivalente ao produto observado com o DNA bubalino sendo consideradas linhagens positivas. Três linhagens apresentaram um produto de PCR de menor intensidade que o produto de PCR presente no controle positivo (Figura 4).

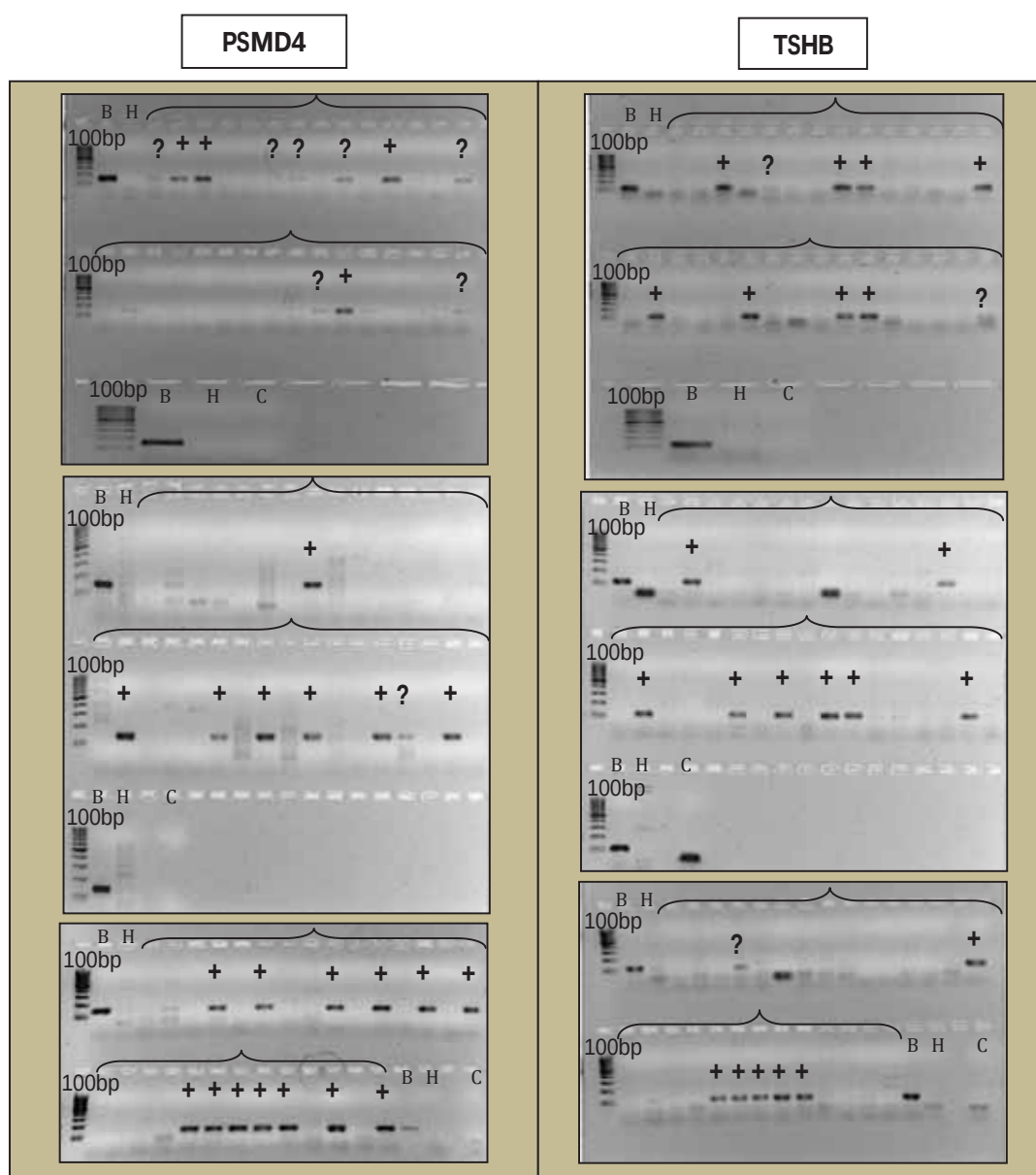


Figura 4. Representação do Gel de Agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados de um dos experimentos de genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ para os genes *psmd4* e *tshb*. **B:** DNA bubalino das células doadoras do painel (controle positivo). **H:** DNA de hamster das células receptoras do painel. **C:** controle negativo (reação de PCR sem adição de DNA). As chaves mostram as diferentes linhagens do painel que foram genotipadas. **100bp:** marcador molecular (*Gene Ruler*, FermentasTM). Os sinais positivos (+) indicam as linhagens que apresentaram produto de PCR equivalente ao produto obtido no controle com o DNA de búfalo. As linhagens que apresentaram um produto de PCR com menor intensidade em relação ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo estão assinaladas com o ponto de interrogação (?).

A Figura 5 ilustra o gel de agarose com os resultados da genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ para o gene *gtf2b*. Como pode ser observado, das 90 linhagens do painel, 11 apresentaram produto de PCR com a mesma intensidade do produto de PCR obtido com o DNA do búfalo, consideradas positivas. Oito linhagens apresentaram produtos de PCR com menor intensidade que o produto observado no controle positivo com o DNA bubalino e estão indicadas na figura com o ponto de interrogação.

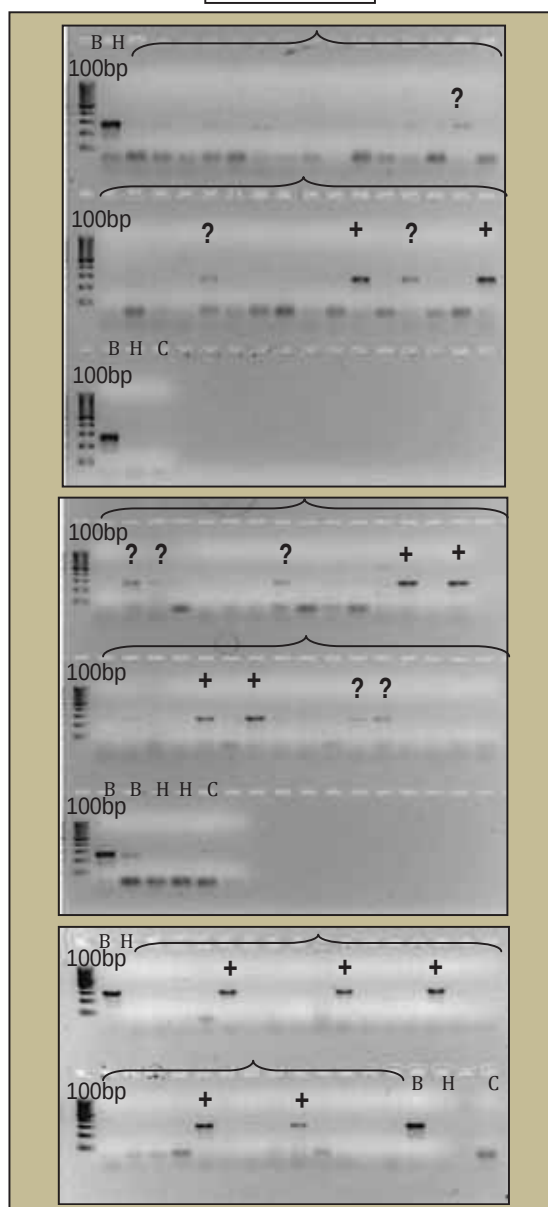


Figura 5. Representação do Gel de Agarose 2% corado com brometo de etídio mostrando os resultados de um dos experimentos de genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ para o gene *gtf2b*. **B:** DNA bubalino das células doadoras do painel (controle positivo). **H:** DNA de hamster das células receptoras do painel. **C:** controle negativo (reação de PCR sem adição de DNA). As chaves mostram as diferentes linhagens do painel que foram genotipadas. **100bp:** marcador molecular (*Gene Ruler*, FermentasTM). Os sinais positivos (+) indicam as linhagens que apresentaram produto de PCR equivalente ao produto obtido no controle com o DNA de búfalo. As linhagens que apresentaram um produto de PCR com menor intensidade em relação ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo estão assinaladas com o ponto de interrogação (?).

O padrão de presença e ausência do produto de PCR dos genes observados no mínimo em dois experimentos de genotipagem das diferentes linhagens do painel foi registrado em uma tabela do tipo *Excel* (Figura 6). As linhagens foram classificadas como positivas (1) quando da presença do produto de PCR equivalente ao produto de PCR obtido com o DNA de búfalo, negativas (0) quando da ausência do produto de PCR e, quando houve um produto de PCR com menor intensidade em comparação ao produto observado com o DNA de búfalo, classificou-se com o número 2. A porcentagem da frequência de retenção de cada marcador no painel foi obtida a partir do número de linhagens do painel consideradas positivas (1) para o respectivo gene em relação ao número total de linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ (90).

Os resultados mostraram que, as frequências de retenção dos marcadores no painel variaram de 13,3% (*gtf2b*) a 26,6% (*psmd4*) com média de 19,7%. As frequências obtidas para cada gene foram: 18,8% para o *muc1*, 17,7% para o *ppp1r7*, 26,6% para o *psmd4*, 22,2% para o *tshb* e 13,3% para o *gtf2b*. Em trabalhos anteriores as frequências de retenção observadas variaram de 7,8% a 52,2%. No estudo realizado para o cromossomo BBUX (IANELLA et al., 2008), por exemplo, esses valores ficaram entre 7,8% (*huwe1*) a 28,9% (MAF45, INRA30 e TGLA325) e para o BBU1, as frequências foram de 17,8% (*sr140*) a 52,2% (BM6432) (MIZIARA et al., 2007). Considerando também o obtido para o BBU6, um mapeamento preliminar mostrou valores de 14,4% para o gene *rps8* a 40% para o gene *nras* (STAFUZZA et al., 2007).

Linhagem	2	5	8	9	15	17	21	22	23	24	25	26	27	30	31	33	38	39	44	47	48	51	53	55	62	63	66	67	70	71
MUC1	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	0	0	2
PPP1R7	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
PSMD4	2	1	1	0	0	2	2	0	1	0	1	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2
TSHB	0	2	1	0	2	1	0	2	1	0	0	0	2	1	1	1	2	0	2	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	2
GTF2B	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1

Linhagem	72	75	76	78	79	80	81	82	85	86	87	89	90	91	92	93	94	95	97	98	100	102	103	104	105	106	110	111	112	113
MUC1	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	2	1	0	0	2	1	0	1	0	0	1	0	0
PPP1R7	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
PSMD4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
TSHB	2	1	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	2	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
GTF2B	0	1	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0

Linhagem	114	116	117	120	121	122	123	126	127	131	132	133	134	137	138	139	141	143	144	145	146	147	148	150	151	153	158	159	162	163
MUC1	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	0	0	0	1
PPP1R7	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	2	1	2	1	0	0
PSMD4	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
TSHB	1	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
GTF2B	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

Figura 6. Representação, a partir de uma tabela *Excel*, do padrão de presença e ausência do produto de PCR obtido em dois experimentos de genotipagem das linhagens do painel BBURH₅₀₀₀ para os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*. A primeira linha corresponde à numeração de cada linhagem no painel (2 a 163). 1: presença do produto de PCR equivalente ao produto obtido com o DNA de búfalo (destacado em amarelo). 0: ausência do produto de PCR. 2: produto de PCR com menor intensidade em relação ao produto de PCR presente no controle com o DNA de búfalo (destacado em azul). A presença do produto de PCR (1) para cada gene em determinada linhagem indica que o fragmento de DNA bubalino contendo o referido gene foi retido nessa mesma linhagem após a fragmentação do cromossomo por raio X. A porcentagem de frequência de retenção, representado pelo número de linhagens em que um marcador estava presente no painel, variou de 13,3% (*gtf2b*) a 26,6% (*psmd4*).

A subsequente análise estatística realizada com os dados da genotipagem das linhagens celulares do painel BBURH₅₀₀₀ para os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* não resultou no estabelecimento das posições desses genes no cromossomo 6 de búfalo. Esse fato deve-se principalmente a qualidade da genotipagem uma vez que, como pode ser observado na Figura 6, a quantidade de produtos de PCR que apresentaram menor intensidade com relação ao produto obtido com o DNA de búfalo foi elevada, resultando na designação de muitas linhagens como número 2. Esse dado, fornece ao pacote estatístico a condição de extrema incerteza da presença ou ausência do produto de PCR naquelas linhagens, resultando na impossibilidade de gerar grupos de ligação com o suporte estatístico mínimo ($LOD \geq 5$) para a construção dos mapas genômicos. Assim, de acordo com o obtido na análise estatística pelo *software* CONCORDE, foram gerados os mesmos grupos de ligação já relatados anteriormente para o BBU6 (AMARAL et al., 2008), sem a inclusão dos novos genes em nenhum desses grupos de ligação.

A partir disso, procedeu-se então ao mapeamento comparativo desses genes no cromossomo 6 de búfalo, analisando-se o mapa RH do BBU6 e o mapa de sequência do BTA3 para a indicação do intervalo da provável localização dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b*, com base na posição desses genes, assim como de seus marcadores adjacentes no cromossomo 3 bovino (BTA3), homólogo ao BBU6.

A Figura 7 representa o mapa RH do cromossomo 6 de búfalo (AMARAL et al., 2008) comparado com o mapa de sequência do cromossomo 3 bovino (*Bos taurus* versão 5.2, disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913), indicando os intervalos e as possíveis localizações dos genes avaliados neste trabalho. Foram representados no mapa RH do BBU6, somente 16 marcadores, dentre eles, 13 genes codificantes de proteínas (incluindo os cinco genes do presente estudo) e três microssatélites. A tabela 4 apresenta a posição dos marcadores que flanqueiam os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* no BBU6 e no BTA3.

No BTA3 o gene *muc1* encontra-se mapeado na posição 16809920 bp, entre os microssatélites IDVGA-53 e RM019 que estão localizados respectivamente nas

posições 16125636 bp e 18262294 bp. No BBU6, os microssatélites IDVGA-53 e RM019 estão mapeados nas posições 272 cR e 350 cR respectivamente. Sendo assim, foi indicado no mapa RH do BBU6 o intervalo no qual o gene MUC1 estaria provavelmente localizado, ou seja, entre os microssatélites IDVGA-53 e RM019.

Com relação ao gene *ppp1r7*, o mesmo encontra-se localizado na posição 126285644 bp no BTA3 entre os genes *sag* (*S-antigen; retina and pineal gland (arrestin)*) e *nedd5* (*Septin 2*) que encontram-se localizados nas posições 120351767 bp e 126405358 bp, respectivamente. No BBU6 os genes *sag* e *nedd5* estão mapeados a 1860 cR e 1914 cR delimitando o intervalo no qual o gene *ppp1r7* estaria localizado.

Outro gene do presente estudo, o *psmd4*, encontra-se mapeado no BTA3 na posição 21066868 bp. Flanqueando esse gene encontram-se o gene *tuft1* (*tuftelin 1*) e o microssatélite BMS963 na região que vai de 20710070 bp (*tuft1*) a 21857792 bp (BMS963). No cromossomo 6 bubalino, essa região corresponde a posição de 358 cR (*tuft1*) a 366 cR (BMS963), a partir da qual foi indicado o gene *psmd4*.

O gene *tshb* está mapeado na posição 30777425 bp do cromossomo 3 bovino, entre os genes *ngfb* (*nerve growth factor (beta polypeptide)*) e *nras* (*neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*). Essa região compreende da posição 30489050 bp (*ngfb*) a 31061009 bp (*nras*) do BTA3 e corresponde ao intervalo entre 599 cR (*ngfb*) e 626 cR (*nras*) no cromossomo 6 bubalino. Com base na comparação da posição desses marcadores no BTA3, o intervalo no qual o gene TSHB estaria localizado foi inferido entre os genes *ngfb* e *nras*.

No cromossomo 3 bovino, o gene *gtf2b* está mapeado entre os genes *dpyd* (*dihydropyrimidine dehydrogenase*) e o gene *uox* (*urate oxidase*) na posição 58439130 bp. No mesmo cromossomo, os genes *dpyd* e *uox* encontram-se nas posições 48404070 bp e 63697398 bp, respectivamente. No BBU6 esse intervalo corresponde as posições de 997 cR (*dpyd*) a 1083 cR (*uox*) no mapa RH. A partir dessa informação, inferiu-se o intervalo de localização do gene *gtf2b* entre esses marcadores no mapa RH do cromossomo 6 do búfalo.

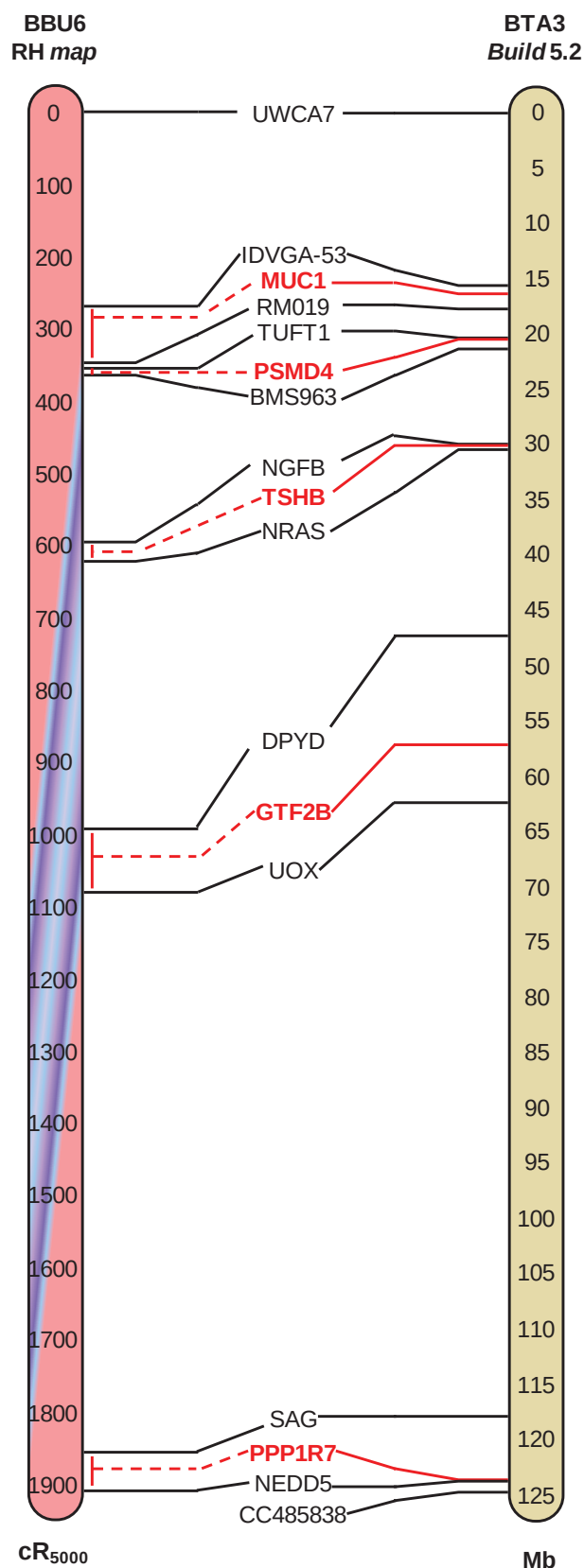


Figura 7. Comparação do mapa RH do cromossomo 6 de búfalo (AMARAL et al., 2008) com o mapa de sequência do cromossomo 3 bovino (*Bos taurus* versão 5.2) obtido a partir do *software MapChart*. Os marcadores destacados em vermelho consistem dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* que foram adicionados manualmente ao BBU6 por meio de mapeamento comparativo com o BTA3. A linha tracejada em vermelho indica a região com a provável localização no BBU6 para cada gene do presente estudo. As posições dos marcadores no BBU6 estão em centiRay (cR) e no BTA3 em Megabases (Mb).

Tabela 4. Posição dos marcadores que flanqueiam os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* no mapa de sequência do cromossomo bovino 3 (*Bos taurus* versão 5.2) e respectiva posição desses marcadores no mapa RH do cromossomo 6 de búfalo (AMARAL et al., 2008).

Símbolo do marcador	Posição no BTA3 (bp)	Posição no BBU6 (cR)
UWCA7	10794216	211
IDVGA-53	16125636	272
RM019	18262294	350
<i>tuft1</i>	20710070	358
BMS963	21857792	366
<i>ngfb</i>	30489050	599
<i>nras</i>	31061009	626
<i>dpyd</i>	48404070	997
<i>uox</i>	63697398	1083
<i>sag</i>	120351767	1860
<i>nedd5</i>	126405358	1914

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* foram pela primeira vez testados com o DNA de búfalo e apresentaram produto de PCR adequados ao mapeamento com as linhagens do painel BBURH₅₀₀₀. Sendo assim, consistem agora em novos marcadores que podem ser utilizados em estudos de polimorfismos em populações bubalinas;
- A análise estatística dos cinco novos genes resultou na não inclusão dos mesmos no atual mapa RH do BBU6, devido à qualidade da genotipagem obtida com os experimentos de PCR. Procedeu-se então, a análise comparativa entre a posição em cR dos marcadores no mapa RH do cromossomo 6 bubalino com a posição em bp dos marcadores correspondentes no mapa de sequência do cromossomo 3 bovino, a qual permitiu indicar o intervalo da provável localização dos genes *muc1*, *ppp1r7*, *psmd4*, *tshb* e *gtf2b* no cromossomo 6 de búfalo.

6. REFERÊNCIAS¹

AGARWALA, R. et al. A Fast and Scalable Radiation Hybrid Map Construction and Integration Strategy. **Genome Research**, v. 10, p. 350-354, 2000.

AMARAL, M. E. J. et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v. 38, p. 311-314, 2007.

AMARAL, M. E. J. et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, 11p, 2008.

ANDRADE, V. J.; GARCIA, S. K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p. 39-45, 2005.

APPLEGATE, D. et al. On the solution of traveling salesman problems. **Documenta Mathematica**, extra volume International Congress of Mathematics III, p. 645-656. 1998.

ASPILCUETA-BORQUIS, R. R. Genetic parameter estimates for buffalo milk yield, milk quality and mozzarella production and Bayesian inference analysis of their relationships. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1636-1644, 2010.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 293-298, 2007.

BOLLEN, M. Combinatorial control of protein phosphatase-1. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 26, p. 426-431, 2001.

¹Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR: 6023, Referências – Elaboração, Rio de Janeiro, agosto 2002.

BORGHESE A. Buffalo population and strategies in the world. In: **Buffalo production and research**, REU Technical Series 67. Rome: Food and Agriculture Organization Of The United Nations, 2005, 50p.

CHOWDHARY, B. P. et al. Construction of a 5,000(rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11. **Mammalian Genome**, v. 13, p. 89–94, 2002.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 7151-7160, 1998.

COX, D. R. et al. Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. **Science**, v. 250, p. 245-250. 1990.

FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Faostat agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 01 Julho 2011.

FARAUT, T. et al. Contribution of Radiation Hybrids to Genome Mapping in Domestic Animals. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, p. 21-33, 2009.

GALEAZZI et al., Genetic parameters for stayability in Murrah buffaloes. **Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 252-256, 2010.

GOLDAMMER, T. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 119, p. 235-241, 2007.

GOLDAMMER, T. et al. A high-resolution radiation hybrid map of sheep chromosome X and comparison withh and cattle. **Cytogenetic and Genome Research**, v.29, p.40-45, 2009.

HAMASIMA, N. et al: Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel. **Animal Genetics**, v. 34, p.216–220, 2003.

HAWKEN, R. J. et al. A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 824-30, 1999.

HOORENS, P. R. et al. Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile. **BMC Genomics**, v. 12, 12p., 2011.

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, v. 39, p. 196-200, 2008.

IANNUZZI, L. Standard Karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L. 2n=50). Report of the committee for the standardization of banded karyotypes of the river buffalo. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 102-113, 1994.

IANNUZZI, L. et al. Sixteen type I loci from six human chromosomes were comparatively fluorescence in-situ mapped to river buffalo (*Bubalus bubalis*) and sheep (*Ovis aries*) chromosomes. **Chromosome Research**, v.8, p. 447-450, 2000.

IANNUZZI, L. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n=50) cytogenetic map:assignment of 64 loci by fluorescence is situ hybridization and R-banding. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 65-75, 2003.

IANNUZZI, L. The water buffalo: evolutionary, clinical and molecular cytogenetics. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 227-236, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, 2010, 65p.

ITOH, T. et al. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. **Genomics**, v. 85, p. 413–424, 2005.

JANN, O. C. et al. A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of the bovine genome sequence. **BMC Genomics**, v. 7, 15p., 2006.

KHATKAR, M. S. et al. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 163-90, 2004.

KIERSTEIN, G. et al. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, 308-324, 2004.

KIGUWA, S. L. et al. A horse whole-genome radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. **Mammalian Genome**, v. 11, p. 803–805, 2000.

KUMAR, S. et al. Phylogeography and domestication of Indian river buffalo. **BMC Genomics**, v. 7, 8p., 2007.

LAURENT, P. et al. A 12,000-rad whole-genome radiation hybrid panel in sheep: application to the study of the ovine chromosome 18 region containing a QTL for scrapie susceptibility. **Animal Genetics**, v. 38, p. 358–363, 2007.

LENSTRA, J. A.; BRADLEY, D. G. Systematics and Phylogeny of Cattle. **The genetics of cattle**, 14p., 1999.

MAGNER, J. A. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. **Endocrine Reviews**, v.11, p. 354-385, 1990.

McKAY, S. D. et al. Construction of bovine whole-genome radiation hybrid and linkage maps using high-throughput genotyping. **Animal Genetics**, v. 38, p. 120-125, 2006.

MIZIARA, M. N. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 119, p. 99-104, 2007.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. *Map Viewer: Bos taurus* versão 5.2, Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913. Acesso em: 20 Fevereiro 2011.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. *UniSTS*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>. Acesso em: 20 Fevereiro 2011.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. *Gene*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Acesso em: 18 Agosto 2011.

NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, v. 171, p. 318-321, 2011.

O'BRIEN, S. J. et al. The promise of comparative genomics in mammals. **Science**, v. 286, p. 458-480, 1999.

OLIVEIRA, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 122-134, 2005.

ORPHANIDES, G.; LAGRANDE, T.; REINBERG, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. **Genes & Development**, v. 10, 2657-2683, 1996.

PATTON, S. Some Practical Implications of the Milk Mucins. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1115-1117, 1999.

PERUCATTI, A. et al. Comparative FISH mapping of mucin 1, transmembrane (MUC1) among cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes: comparison between bovine chromosome 3 and human chromosome 1. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 102-105, 2006.

PERUCATTI, A. et al. FISH-mapping comparison between river buffalo chromosome 7 and sheep chromosome 6: assignment of new loci and comparison with HSA4. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 124, p. 106-111, 2009.

REXROAD, C. E. et al. A radiation hybrid map of bovine chromosome one. **Animal Genetics**, v. 30, p. 325–332, 1999.

RODRIGUES-FILHO, E. A. et al. Mapping MHC genes in river buffalo. **Animal Genomics for Animal Health**, v. 132, p. 343-346, 2008.

RITZ, L. R. et al. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 31, p. 178-185, 2000.

STAFUZZA, N. B. et al. Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. **Animal Genetics**, v. 38, p. 406-409, 2007.

STAFUZZA, N. B. et al. Comparative RH Maps of the River Buffalo and Bovine Y Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, p. 132-138, 2009.

TONHATI, H. et al. Parâmetros Genéticos para a Produção de Leite, Gordura e Proteína em Bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 2052-2056, 2000.

TONHATI, H. et al. Milk fatty acid characterization and genetic parameter estimates for milk conjugated linoleic acid in buffaloes. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 178-183, 2011.

VALE, W. G. et al. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p.141-155, 2008.

VOORRIPS, R. E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, v. 93, p. 77-78, 2002.

WILLIAMS, J. L. et al: A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. **Mammalian Genome**, v.13, p. 469–474, 2002.

WOMACK, J. E. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 854-856, 1997.

WOMACK, J. E. Advances in livestock genomics: Opening the barn door. **Genome Research**, v. 15, 1699-1705, 2005.

WU, C. H. et al. An ovine whole-genome radiation hybrid panel used to construct an RH map of ovine chromosome 9. **Animal Genetics**, v. 38, p. 534–536, 2007.

XIANG-JUN, H. E. et al. Increasing specificity of real time PCR to detect microRNA through primer design and annealing temperature increasing. **Journal of Pekingun University (Health sciences)**, v. 41, p. 691-698, 2009.

YANG, Y.; WOMACK, J. E. Parallel radiation hybrid mapping: A powerful tool for high-resolution genomic comparison. **Genome Research**, v. 8, p.731-736, 1998.

YERLE, M. et al. Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 82, p. 182–188, 1998.

YERLE, M. et al. Generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid panel for fine mapping in pig. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 97, p. 219–228, 2002.